

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

ANDERSON DE BRITO RIBEIRO

EFEITOS DO COBRE NO COMPORTAMENTO DE *POECILIA VIVIPARA*

Recife,  
2012

ANDERSON DE BRITO RIBEIRO

EFEITOS DO COBRE NO COMPORTAMENTO DE *POECILIA VIVIPARA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo S. M. de Carvalho

Recife,  
2012

ANDERSON DE BRITO RIBEIRO

EFEITOS DO COBRE NO COMPORTAMENTO DE *POECILIA VIVIPARA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo S. M. de Carvalho

Defendida em: 24/07/2012

BANCA EXAMINADORA:

---

Dra. Letícia Veras Costa Lotufo (Titular externo)  
Universidade Federal do Ceará

---

Dr. Giovanni Amadeu Paiva dos Santos (Titular interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Antônio da Silva Souto (Titular interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Bruna Martins Bezerra (Suplente interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Mônica Lúcia Adam (Suplente externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Ribeiro, Anderson de Brito**  
**Efeitos do cobre no comportamento de *Poecilia vivipara* Anderson de Brito Ribeiro– Recife: O Autor, 2012.**

**66 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Paulo S. M. de Carvalho**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Animal, 2012.**

**Inclui bibliografia**

**1. Ecotoxicologia 2. Cobre 3. Guaru I. Carvalho, Paulo M.S. de (orientador) II. Título**

**571.95**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2013- 047**

A Deus, como um dos frutos gerados,  
promessa para este tempo em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Louvo ao meu amado Jesus que em sua infinita misericórdia conduz a minha vida pelos caminhos mais surpreendentes. Ao Espírito Santo por gerar o desejo em meu coração de sempre cumprir a Santa Vontade do Pai. A minha querida Mãe Maria por sempre me ensinar a ser cada vez melhor e ter a certeza de sua intercessão. E meu querido São José por ser sempre canal da providência divina.

A toda a minha família, em especial a minha mãe (Marcia) e a vóia (Avó Leolisa), pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos e amigos da Comunidade Shalom e da Paróquia N. Sra. da Piedade pelas orações, que foram pedidas muitas vezes. Em especial ao meu acompanhador vocacional Diego Rodrigo e o amigo Felipe Monsão por todas as partilhas.

Ao Prof. Paulo Carvalho pelas experiências de vida que pôde me proporcionar ao seu lado nestes cinco anos de trabalho no Labecotox, pela sua amizade e orientação.

Aos amigos de todo dia nestes dois anos de trabalho, em especial a Pessôa (Priscila), Fuinha (Gaby), Maninha (Lis), Kika (Cristiane), Ju, Rafa, Helena, Ana e João. Agradeço a Deus pela vida e amizade de vocês que são anjos para mim.

A todos os professores que compõem o programa de pós-graduação em biologia animal por ensinar a produzir ciência.

Aos professores da banca pela aceitação do convite e sugestões para um melhor trabalho científico.

À FACEPE pelo apoio financeiro nestes dois anos para que existisse a presente pesquisa.

Ao INCT-TA e CNPq pelos financiamentos para o Labecotox.

E a todos que não citei em nome, mas que sabem que em meu coração sempre terá um desejo de gratidão.

## RESUMO

O metal cobre está entre os modelos químicos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Toxicologia Aquática do CNPq (INCT-TA). É um elemento de significativa relevância ambiental, especialmente por contaminar ambientes aquáticos na forma solúvel catiônica  $\text{Cu}^{+2}$ , pelo escoamento e/ou lixiviação dos processos de mineração, seu uso na agricultura, pintura de embarcações e geração de esgotos domésticos e industriais. Seus principais sítios de ação tóxica são o sistema sensorial olfatório e as brânquias, ambos em contato direto com a água. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos de concentrações subletais do cobre em juvenis do peixe estuarino *Poecilia vivipara* através da análise de respostas de defesa contra predadores nos peixes expostos. Estas respostas baseiam-se em reações de alarme ao extrato de pele da mesma espécie, avaliadas pela presença de estresse natatório, paralisia natatória e agrupamento de indivíduos. Também foram analisados os comportamentos relacionados à natação e alimentação, sendo quantificado o comportamento natatório espontâneo, a capacidade de nadar contra corrente de água em velocidades crescentes, e a eficiência na captura de presas. As presas utilizadas foram náuplios de *Artemia* sp., quantificados previamente para cada peixe. A resposta de alarme avaliada pela frequência de ocorrência de estresse natatório nos indivíduos de *P. vivipara* diminuiu com a exposição ao cobre nas concentrações de 5, 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , com uma concentração de efeito observado (CEO) de 5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A velocidade de natação espontânea diminuiu nas concentrações 100 (CEO), 200 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre, tendo sido detectada uma hipoatividade dos indivíduos relativa aos controles. Uma redução da resistência natatória foi observada após exposição ao cobre nas concentrações de 20 (CEO), 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Foi detectado um decréscimo no número de náuplios capturados pelos peixes expostos ao cobre nas concentrações de 20 (CEO), 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Conclui-se que a exposição a concentrações subletais de cobre na faixa de 5 a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  causa alterações no comportamento dos juvenis de *P. vivipara* relativos ao sistema olfatório, a habilidade natatória e a capacidade de captura de presas. Alterações na reação de alarme, que simulam defesa a um ataque de predador, foram afetadas com maior intensidade com base na frequência de estresse natatório em todas as concentrações de cobre, sendo o parâmetro mais sensível. Estes efeitos comportamentais mal-adaptativos sugerem que possa ter havido modificações nos epitélios olfatórios e branquial ocasionado pelo cobre, que podem comprometer a sobrevivência e crescimento dos indivíduos.

**Palavras-chave:** Cobre; *Poecilia vivipara*; Reação de alarme; Natação

## ABSTRACT

The copper metal is among the chemical models of the National Institute of Science and Technology - Aquatic Toxicology of CNPq (INCT-TA). It is a significant element of environmental relevance, especially for contaminating aquatic environments in soluble form cation  $\text{Cu}^{+2}$ , by outflow and/or leaching of mining processes, its use in agriculture, craft paint and generation of domestic and industrial sewage. Its main sites of toxic action are the olfactory sensory system and the gills, both in direct contact with water. This study aimed to evaluate the effects of sublethal concentrations of copper in juvenile estuarine fish *Poecilia vivipara* by analyzing responses of defense against predators in fish exposed. These responses are based on alarm reactions to skin extract of the same species, as assessed by the presence of swimming stress, paralysis and cohesion. We also analyzed the behaviors related to swimming and feeding, and quantified the spontaneous swimming behavior, the capacity to swim against flow water at increasing speeds, and efficiency in prey capture. The prey used was *Artemia sp.*, previously quantified for each fish. The alarm response assessed by frequency of occurrence of swimming stress in individuals of *P. vivipara* decreased with exposure to copper at concentrations of 5, 20, 40 and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , with a lowest effect concentration (LOEC) of 5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . The spontaneous swimming speed decreased at concentrations 100 (LOEC), 200 and 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  of copper, having detected a hypoactivity of individuals in comparative of the controls. A reduction in swimming performance was observed after exposure to concentrations of 20 (LOEC), 40 and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . It was detected a decrease in the number of *Artemia* nauplii captured by the fish exposed to copper concentrations of 20 (LOEC), 40 and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . It is concluded that exposure to sublethal concentrations of copper in the range 5 to 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  causes changes in the behavior of juvenile *P. vivipara* on the olfactory system, the swimming ability and the ability to capture prey. Changes in the alarm reaction, which simulates the defense of predator attack, were affected more strongly based on the frequency of stress swimming at all concentrations of copper, being the most sensitive parameter. These maladaptive behavioral effects suggest that there may have been changes in the olfactory and gill epithelium caused by copper, which can compromise the survival and growth of individuals.

**Keywords:** Copper; *Poecilia vivipara*; Alarm reaction; Swimming

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Objetivos e Hipótese.....	10
1.1.1 Objetivo geral.....	10
1.1.2 Objetivos específicos.....	10
1.1.3 Hipótese.....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	12
2.1 Ecotoxicologia .....	12
2.2 Peixes como organismos-teste em estudos ecotoxicológicos .....	13
2.2.1 <i>Poecilia vivipara</i> Bloch e Schneider, 1801 .....	14
2.3 Contaminação dos sistemas aquáticos e modelagem ecotoxicológica para metais .....	15
2.4 Características do cobre .....	17
2.5 Qualidade das águas e emissão do cobre no ambiente .....	18
2.6 Efeitos ecotoxicológicos do cobre .....	19
2.6.1 Efeitos do cobre a nível molecular e bioquímico.....	19
2.6.2 Efeitos do cobre a nível fisiológico.....	20
2.6.3 Efeitos do cobre a nível histológico no epitélio olfatório .....	21
2.6.4 Efeitos do cobre a nível histológico no epitélio branquial .....	22
2.7 Efeitos do cobre a nível comportamental .....	24
2.7.1 Sistema sensorial olfatório .....	25
2.7.1.1 Efeitos olfatórios relacionados à reação de alarme .....	27
2.7.1.2 Efeitos olfatórios relacionados à evasão a contaminantes.....	28
2.7.2 Atividade e resistência natatória .....	29
2.7.3 Captura de presas .....	31
3 EFITOS DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DO COBRE NO COMPORTAMENTO DE JUVENIS DO PEIXE <i>POECILIA VIVIPARA</i> .....	33
3.1 Introdução .....	33
3.2 Metodologia .....	35

3.2.1	Obtenção e manutenção dos <i>Poecilia vivipara</i> .....	35
3.2.2	Exposição ao cobre.....	35
3.2.3	Sistema de gravação de vídeo .....	36
3.2.4	Avaliação da resposta de alarme .....	36
3.2.4.1	Obtenção do extrato de pele .....	36
3.2.4.2	Desenho experimental .....	36
3.2.4.3	Quantificação da Resposta de Alarme.....	37
3.2.5	Atividade natatória espontânea .....	38
3.2.6	Avaliação da resistência natatória .....	38
3.2.7	Captura de presas .....	40
3.2.8	Análises estatísticas.....	40
3.3	Resultados.....	41
3.3.1	CL50-96h para juvenis de <i>Poecilia vivipara</i> .....	41
3.3.2	Reação de Alarme .....	41
3.3.2.1	Frequência de Estresse Natatório .....	41
3.3.2.2	Paralisia Natatória.....	42
3.3.2.3	Agrupamento .....	43
3.3.3	Atividade natatória espontânea .....	44
3.3.4	Resistência natatória.....	45
3.3.5	Captura de presas .....	47
3.4	Discussão .....	48
3.4.1	CL50-96h do cobre.....	48
3.4.2	Reação de Alarme .....	49
3.4.3	Atividade natatória espontânea .....	50
3.4.4	Resistência natatória.....	51
3.4.5	Captura de presas .....	53
3.5	Conclusão.....	54
	REFERÊNCIAS .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

Este trabalho está dividido em dois capítulos, sendo o primeiro uma fundamentação teórica que busca-se dispor uma base de conceitos fundamentais sobre a ecotoxicologia, apresenta alguns exemplos de ensaios ecotoxicológicos com peixes e sua importância para a ecotoxicologia, a temática de contaminação aquática por metais, as características do cobre e seus efeitos nos mais diversos níveis de organização biológica como também a nível comportamental.

No segundo capítulo é apresentado o artigo a ser submetido, especificando os testes realizados em laboratório com juvenis da espécie *Poecilia vivipara* exposta a concentrações subletais do metal cobre, de modo que se avaliaram suas respostas de defesa contra predadores pelo comportamento olfatório através da reação de alarme ao extrato de pele da mesma espécie. Também foram analisados os comportamentos relacionados à natação e alimentação.

### 1.1 OBJETIVOS E HIPÓTESE

#### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos ecotoxicológicos do metal cobre, modelo químico de contaminantes, em parâmetros comportamentais durante a fase juvenil do barrigudinho *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801.

#### 1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a CL50 (96h) para os juvenis de *P. vivipara*
- Avaliar os efeitos de concentrações subletais do cobre em parâmetros comportamentais relacionados ao sistema sensorial olfatório com ênfase na resposta de alarme relacionada à evasão ao risco de predação.
- Avaliar os efeitos de concentrações subletais do cobre em parâmetros comportamentais relacionados ao sistema motor baseados na atividade de natação espontânea e na resistência natatória.
- Avaliar os efeitos de concentrações subletais do cobre na habilidade de captura de presas.

### **1.1.3 Hipótese**

Juvenis de *Poecilia vivipara* após 96 horas de exposição ao cobre apresentam uma perda na resposta de reação de alarme quando comparados aos organismos controle, relativo à frequência de estresse natatório, de paralisia natatória e do agrupamento de indivíduos. Uma hipoatividade natatória quando comparados aos organismos controle, resultado de um déficit relativo da velocidade de natação. A exposição dos indivíduos desta espécie ao cobre diminui a resistência natatória e a capacidade de capturar presas.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ECOTOXICOLOGIA

A ecotoxicologia como uma ciência multidisciplinar que estuda os efeitos deletérios não intencionais das mais diversas substâncias químicas, tenta caracterizar a toxicidade encontrada nos organismos e ecossistemas (ZAGATTO, 2006). Através da integração da ecologia com a toxicologia, procura-se compreender os mecanismos de ação tóxica de compostos químicos em conjunto com avaliações de impacto ambiental (RODRIGUES ET AL., 2003).

Devido à constante descarga de contaminantes no ambiente aquático, ensaios de toxicidade vêm sendo incluídos como ferramentas úteis em programas de monitoramento ambiental focando no efeito de poluentes. Nestes ensaios de toxicidade inúmeros aspectos podem ser abordados, desde avaliações de frequência de mortalidade em diferentes concentrações dos compostos ou amostras sendo avaliadas, até avaliações de efeitos deletérios a nível subletal, para os quais o termo biomarcador tem sido usado na ecotoxicologia.

Biomarcadores podem desta forma, ser definidos como parâmetros quantitativos dos efeitos de compostos químicos variando de níveis subcelulares de organização biológica até o nível de indivíduos. Eles abrangem efeitos bioquímicos, celulares, fisiológicos, ou comportamentais que podem ser medidos em tecidos ou amostras biológicas (DEPLEDGE ET AL., 1995).

O conceito de bioindicadores de poluição como parâmetros quantitativos que podem ser medidos é mais frequentemente associado a níveis mais altos de organização biológica (VAN GESTEL E BRUMELLEN, 1996), como em estudos de diferentes populações e comunidades de ecossistemas impactados por compostos químicos. Neste caso, o enfoque está em níveis biológicos superiores ao indivíduo, sendo avaliados parâmetros populacionais. Tais parâmetros são relacionados à presença e ausência do organismo ou às taxas de variação populacional que resultam dos processos de fecundidade, nascimento e mortalidade.

Os peixes são usados como excelentes modelos para quantificação de biomarcadores e bioindicadores em estudos ecotoxicológicos, por acumular em seu organismo frações disponíveis de metais e contaminantes orgânicos presentes nos ecossistemas aquáticos (ERICKSON ET AL., 2008). Desta forma, podem trazer informações importantes para retratar de um modo eficiente a saúde do meio ambiente em que estão vivendo (SCOTT E SLOMAN, 2004).

A aquisição de dados em ensaios ecotoxicológicos pela avaliação de biomarcadores e bioindicadores, gera uma base de dados para o conhecimento dos diferentes mecanismos de efeito de contaminantes químicos nos organismos. O maior desafio para a ecotoxicologia é a utilização das informações adquiridas para avaliação de risco ambiental, visando auxiliar nas tomadas de decisão pelos órgãos governamentais, de modo a proporcionar a proteção das populações das espécies que se quer preservar e impedindo que elas diminuam ou desapareçam (CLARK ET AL., 1999).

## 2.2 PEIXES COMO ORGANISMOS-TESTE EM ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS

A entrada de metais nos ambientes aquáticos vem aumentando com as atividades mineradoras, agrícolas, e pelo crescimento industrial e urbano (WHO, 1998). Estas atividades antrópicas se tornam fontes significativas de contaminação por despejar metais pelos esgotos, em especial o cobre, no estuário da Ilha de Vitória – ES (JESUS ET AL., 2004). Chegando à água estes metais são incorporados à biota, podendo causar efeitos tóxicos em parâmetros biológicos (MARTINS, 2008), como biomarcadores ou bioindicadores, quantificados em espécies modelo de peixes (WALKER ET AL., 2005).

Os peixes tem importâncias ecológicas e econômicas, e representam o grupo de vertebrados mais diverso (NELSON, 2006), podendo ser encontrados nos diferentes ambientes marinhos, de água doce ou estuarinos através do globo. Algumas espécies, por serem considerados consumidores de topo na cadeia alimentar, podem biomagnificar grandes quantidades de metais como o metilmercúrio para os seus tecidos (BARAK E MANSOUR, 1990; MANSOUR E SIDKY, 2002). Em termos ecológicos, exercem uma variedade de funções em seu habitat atuando no equilíbrio de teias alimentares como predadores e como presas, se tornando assim um importante grupo para estudos de avaliação dos efeitos de contaminantes nos sistemas biológicos (RAND, 2008).

Vários critérios são levados em consideração para a seleção e utilização das espécies de peixes nos testes toxicológicos como: (I) A sensibilidade de organismos em desenvolvimento inicial à alterações ambientais ser maior que em indivíduos adultos (PAYNE ET AL., 2003); (II) A utilização de espécies como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos (ROMÉO ET AL., 2000; WEIS E WEIS, 1989); (III) A abundância da espécie para estudos de campo e a facilidade de manuseio para estudos em laboratório (FLAMMARION ET AL., 2002); (IV) O extenso conhecimento na literatura sobre a fisiologia e estratégias comportamentais de alimentação e reprodução (RAND, 2008).

Testes de toxicidade que utilizam peixes nativos através da avaliação de diferentes estratégias comportamentais, e da exposição a concentrações letais e subletais de compostos químicos, geram respostas de efeito que podem auxiliar na tomada de decisões para avaliações de risco ambiental. Estes testes aplicados em laboratório apresentam a grande vantagem da exibição de um realismo que é incorporado nas alterações das atividades biológicas, em exposições a concentrações abaixo das que apresentam uma resposta letal presente nos cenários de uma possível exposição em campo (RAND, 2008).

### **2.2.1 *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801**

O barrigudinho ou guaru, como é vulgarmente conhecida a espécie de peixe eurialina *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801, pertence a família Poeciliidae e ordem Cyprinodontiformes. Ele se distribui nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (MEFFE E SNELSON JR, 1989). Estão presentes nos mais diversos habitats, desde ambientes em salinidade 0 até 30 se mostrando bem adaptado, também apresentam uma tolerância a variações termais (AMARAL ET AL., 2001). *P. vivipara* são considerados onívoros e apresentam uma tendência à ingestão de larvas de insetos, alimentando-se principalmente de invertebrados aquáticos, detritos, algas e plantas (NASCIMENTO E GURGEL, 2000).

Para o estuário do Rio Catuama em Pernambuco, *P. vivipara* foi classificada como uma espécie frequente e abundante (FALCÃO, 2007). São mais comumente encontrados em córregos principalmente junto às suas margens (FISCHER ET AL., 2004; NASCIMENTO E GURGEL, 2000).

Os Poecilídeos apresentam uma variedade de adaptações reprodutivas e se reproduzem ao longo de todo o ano (MENDONÇA E ANDREATA, 2001), apresentando um mecanismo reprodutor bissexuado e viviparidade (VAZZOLER, 1996). Os machos possuem um gonopódio como órgão copulador, formado a partir do prolongamento do terceiro raio da nadadeira anal (IHERING, 1938). Nas fêmeas a gestação dura aproximadamente 30 a 40 dias e após este período os filhotes já nascem totalmente formados.

Os indivíduos desta espécie apresentam um corpo alongado e comprimido posteriormente. O dimorfismo sexual na espécie é observado a partir de aproximadamente 15 mm de comprimento, onde os machos apresentam uma coloração padrão levemente alaranjada e podem atingir uma média de 6,0 cm de comprimento total, enquanto as fêmeas

apresentam uma coloração verde oliva, medindo até 8,0 cm de comprimento (MENDONÇA E ANDREATA, 2001; NASCIMENTO E GURGEL, 2000).

Segundo Meffe e Snelson Jr (1989) os Poecilídeos são bastante utilizados em pesquisas científicas, e atualmente vêm sendo utilizados como espécies-modelo por apresentar sensibilidade a contaminantes e capacidade de resposta à presença de poluentes nos ambientes aquáticos (BARBIERI, 2004; BILA ET AL., 2005; PAULO ET AL., 2012).

Podemos encontrar uma significativa formação de micronúcleos em células do sangue do *P. vivipara* expostos a  $47,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre (ADAM ET AL., 2010). Em Mattos et al., (2010) é visualizado um aumento significativo das concentrações de glutathione s-transferase (GST) e ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) nas brânquias destes peixes expostos a 10% de uma fração de óleo diesel acomodada em água.

### 2.3 CONTAMINAÇÃO DOS SISTEMAS AQUÁTICOS E MODELAGEM ECOTOXICOLÓGICA PARA METAIS

A partir do século XX percebeu-se que muitos dos metais participavam das funções biológicas nos organismos, sendo encontrado nas reações metabólicas como cofatores ou parte integral da estrutura das enzimas. Alguns metais foram classificados como metais essenciais (Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cr, Ge, Rb, V) por serem requeridos para a homeostasia dos seres vivos (JEFFERY, 2001). Outro grupo de metais é classificado como não essenciais (Ag, Cd, Sn, Au, Hg, Pb, Bi, Al) por não apresentam funções biológicas definidas (WOOD, 2012).

Dentre os metais essenciais, Na, K, Ca e Mg também são conhecidos como macronutrientes, estando presente em elevadas concentrações e servindo como construtores do meio intracelular. Os outros metais essenciais são conhecidos como micronutrientes por serem necessários em concentrações muito baixas, e o excesso destes pode ser tóxico (BIANCHINI ET AL., 2009).

Os metais nos sistemas aquáticos podem ser incorporados de modo natural por processos geoquímicos como o intemperismo de rochas e solos (DREVER, 1988). Processos antropogênicos como a mineração (BIDONE ET AL., 2001), e o crescimento urbano e industrial desordenado das últimas décadas, também têm aumentado a introdução destes compostos nos ambientes aquáticos através do carregamento de seus produtos nos esgotos domésticos e industriais (BETTINI ET AL., 2006; MAZET ET AL., 2005).

No ambiente aquático os metais são frequentemente encontrados em concentrações subletais, e de diversas formas como, por exemplo, associados a complexos orgânicos e inorgânicos (KARIUKI ET AL., 2001; SCHEFFER, 2006). Ainda podemos encontrar sob a forma de íons livres, que são as espécies químicas dos metais mais tóxicas e biodisponíveis para a fauna presente (CROSS E SUNDA, 1982). Deste modo, os estudos ecotoxicológicos buscam compreender o comportamento dos metais encontrados nos recursos hídricos, uma vez que características físico-químicas da água, o tipo de metal, o tempo de exposição, a forma biodisponível encontrada e os processos metabólicos das diversas espécies de peixes são fatores que alteram a disponibilidade e toxicidade destes elementos (KANE ET AL., 2005).

Os metais são contaminantes aquáticos importantes que podem ser quantificados por meio de análises de sedimento, da água ou da biota (PHILLIPS, 1980). As análises das amostras biológicas podem retratar a biodisponibilidade destes metais encontrados nos ambientes, e a presença deles nos tecidos permite avaliar possíveis interações dos mesmos contaminantes com os sítios de ação nos organismos para avaliação de riscos toxicológicos (DI TORO ET AL., 2000).

O modelo “Gill Surface Interaction Model” (GSIM), proposto por Pagenkopf (1983) relaciona a entrada do cobre nas brânquias com a sua toxicidade para peixes de água doce, considerando que estes órgãos são um importante ligante biótico ou sítio de ação onde os metais exercem toxicidade (DI TORO ET AL., 2000; PAQUIN ET AL., 2002).

Dando seguimento ao trabalho de Pagenkopf, foi desenvolvido um programa matemático computacional, o Modelo do Ligante Biótico (BLM), uma ferramenta de cálculos que funciona como uma planilha no Excel, que permite prever a toxicidade de metais para espécies padronizadas de peixes e invertebrados aquáticos (BIANCHINI ET AL., 2009). Esta previsão de toxicidade é feita a partir da concentração total deste metal dissolvido na forma iônica na água, e das características desta água em termos de parâmetros fundamentais que controlam a biodisponibilidade dos íons metálicos responsáveis pelos efeitos tóxicos. Estudos detalhados de química e especiação de metais em conjunto com testes de toxicidade com estas espécies padronizadas proporcionaram dados para o algoritmo do modelo, permitindo que seja estimado o acúmulo destes íons metálicos no seu sítio de ação, principalmente as brânquias nos organismos aquáticos, e a consequente toxicidade em termos de letalidade esperada (BIANCHINI ET AL., 2009).

A agência de proteção ambiental americana (USEPA) prevê que as indústrias avaliem o potencial de toxicidade de seus efluentes através do BLM, uma vez que tenham sido

estabelecidas as relações entre concentrações totais dos íons metálicos com as características da água utilizada, e também com a toxicidade aguda decorrente para organismos padronizados, passando-se a poder aplicá-lo sem a necessidade de executar ensaios de toxicidade, o que já é uma realidade para ambientes de água doce (BIANCHINI ET AL., 2009).

Os parâmetros químicos da água como pH, salinidade e dureza influenciam a especiação dos metais nos ambientes aquáticos. O pH é inversamente proporcional à concentração iônica dos metais no meio aquático. A salinidade está diretamente relacionada com a formação de complexos de ânions cloreto com metais, diminuindo sua biodisponibilidade e toxicidade. A dureza é um fator de grande importância para a toxicidade de metais, pois o aumento desta leva a um aumento da concentração dos íons cálcio e magnésio e maior competição com os íons metálicos pelos sítios de ação no ligante biótico, como as brânquias, e diminuindo sua disponibilidade (BIANCHINI ET AL., 2009).

#### 2.4 CARACTERÍSTICAS DO COBRE

O elemento cobre (Cu) é classificado na tabela periódica como um metal de transição juntamente com outros metais como cromo (Cr), manganês (Mn), ferro (Fe), níquel (Ni), zinco (Zn), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e outros. Apresenta um número atômico 29 e massa atômica 63,6.

O cobre é liberado no ambiente através de fontes naturais e antropogênicas. As fontes naturais correspondem a emissões vulcânicas, vegetação em decomposição e incêndios florestais (WHO, 1998). O cobre é frequentemente extraído pelo homem por atividades mineradoras que pode ser realizada a céu aberto, onde o minério apresenta baixos teores, ou por extração subterrânea, que apresenta teores mais elevados (RIBEIRO, 2001). A partir do seu minério é fundido, refinado e comercializado em diversas indústrias, e então descarregado em esgotos industriais e urbanos. O metal cobre pode contaminar ambientes aquáticos na forma solúvel catiônica  $\text{Cu}^{+2}$ , pelo escoamento ou lixiviação a partir dos produtos em que entra na constituição, tanto na indústria como nos processos de mineração (BIDONE ET AL., 2001).

As primeiras utilizações do cobre pela civilização mundial datam de aproximadamente 8.000 anos A.C., sendo considerado um dos mais antigos metais conhecido pelo homem (RIBEIRO, 2001). O Cu tem uma elevada relevância social, devido a suas características que lhe permite uma ampla aplicabilidade. Deste modo é utilizado nas indústrias de agrotóxicos

como fungicida, bactericida e algicida, de transportes, de tintas, na indústria eletrolítica, na construção civil e outras (PEDROZO E LIMA, 2001).

O cobre é um dos principais metais presente no ambiente aquático (SCHLENK E BENSON, 2001). Várias formas químicas de cobre podem ser formadas nos sistemas aquáticos, entre elas encontramos íon metálico livre, complexos orgânicos, inorgânicos, e compostos cuprosos como sulfato cúprico, óxido cuproso, hidróxido de cobre e cloreto de cobre (PEDROZO E LIMA, 2001).

Para a USEPA o cobre é um dos contaminantes mais danosos (PAIS E JONES JR., 1997). Nos ambientes aquáticos existem diferentes características físico-químicas que influenciam a disponibilidade e toxicidade deste metal. A forma inorgânica mais abundante para águas salinas e de pH elevado é o cobre carbonatado ( $\text{CuCO}_3$ ) (LIBES, 1992). A forma mais tóxica presente nos sistemas aquáticos é o íon cúprico livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), que atinge maiores concentrações quanto menor for o pH, menor concentração de carbono orgânico dissolvido, e menor salinidade (DE SCHAMPHELAERE ET AL., 2002; HALL E ANDERSON, 1999; PAQUIN ET AL., 2002). A forma solúvel catiônica ( $\text{Cu}^{2+}$ ) é absorvida pelos organismos aquáticos rapidamente e quando em excesso no ambiente pode causar toxicidade em um curto período de exposição (BLANCHARD E GROSELL, 2005).

O metal cobre é um elemento essencial para os organismos vivos, sendo fundamental em diversos processos metabólicos celulares (KARAN ET AL., 1998; MCGEER ET AL., 2000). Em vários animais de água doce ou marinha a principal rota de entrada de cobre e local de acumulação dentro do organismo é a brânquia, onde está associado a alterações iônicas e osmorregulatórias (DE BOECK ET AL., 2007; GROSELL E WOOD, 2002; LARSEN ET AL., 1997).

## 2.5 QUALIDADE DAS ÁGUAS E EMISSÃO DO COBRE NO AMBIENTE

O órgão responsável pela regulamentação dos níveis máximos permitidos de contaminantes nos corpos de água brasileiros é o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Este Conselho estabelece limites de concentração química de diferentes substâncias para diferentes classes de uso destes ambientes aquáticos baseados em padrões internacionais (VON SPERLING, 1998). Entretanto, esta legislação não garante a proteção das espécies locais mais sensíveis aos contaminantes, uma vez que boa parte dos critérios presentes no CONAMA não levou em conta espécies nativas locais, nem tampouco os

conceitos relatados acima referentes à influência das características dos diferentes corpos de água na biodisponibilidade de metais (MARTINS, 2008).

A resolução n°20 (CONAMA, 1986) estabelece para águas doce de classe 1 o valor máximo de 0,02 mg/L de cobre, mas Boock e Machado-Neto (2000) em seu trabalho encontraram acumulação e toxicidade do metal no *Oreochromis sp.* para esta concentração afirmando que os limites prescritos não são totalmente seguros.

A resolução n°357 (CONAMA, 2005) classifica os corpos de água e dispõe sobre diretrizes ambientais para seu enquadramento, estabelecendo condições e padrões de lançamento de efluentes. Para águas salinas e salobras de classe 1 a concentração máxima permitida de cobre dissolvido nestes ambientes aquáticos em que visa a preservação das comunidades aquáticas é de 5 µg/L de cobre.

Com relação a concentração máxima de cobre permitida em efluentes, o valor estabelecido é de até 1000µg/L de cobre. Para as resoluções do CONAMA ainda são encontradas muitas falhas no que diz respeito à emissão de metais dissolvidos nos ambientes aquáticos, sendo necessários ensaios ecotoxicológicos com espécies locais buscando avaliar a sensibilidade destas para refinar os critérios de qualidade de águas brasileiras (MARTINS, 2008).

## 2.6 EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO COBRE

### 2.6.1 Efeitos do cobre a nível molecular e bioquímico

O efeito da exposição ao cobre sobre aspectos subcelulares pode ser avaliado com base em parâmetros bioquímicos nos organismos, incluindo a concentração de proteínas participantes da regulação da homeostasia e da detoxificação de íons metálicos como as metalotioneínas (DE BOECK ET AL., 2003). A atividade de enzimas relacionadas ao processo de osmorregulação também é importante, especialmente a  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ , cuja alteração pode refletir em mudanças no funcionamento de células, tecidos e órgãos (DANG ET AL., 2000A).

A exposição de diferentes espécies de peixe ao cobre tipicamente induz a síntese de metalotioneínas, levando a um aumento da concentração destas proteínas em diferentes tecidos (CARVALHO ET AL., 2004; DE BOECK ET AL., 2003). Além disso, espécies de peixe mais resistentes ao cobre têm uma maior capacidade de indução de metalotioneínas, por exemplo no tecido branquial, que sequestram os íons de cobre, diminuindo seu potencial de interagir com outras proteínas, como as da própria enzima  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ . Desta forma, a

enzima  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPase pode ser classificada como um dos biomarcadores bioquímicos clássicos de exposição ao cobre (DANG ET AL., 2000A). A exposição ao cobre também pode levar a um aumento da atividade da  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPase, uma vez que a perda de íons durante a exposição inicial resulta em mecanismos para a recuperação da capacidade de transporte de íons das brânquias, incluindo o aumento do número de células cloreto nas brânquias (MCGEER ET AL., 2000).

A exposição do *Oncorhynchus mykiss* ao cobre levou a um decréscimo da quantidade do receptor muscarínico de acetilcolina no cérebro, e existe alguma evidência de que o cobre pode levar a uma inibição da acetilcolinesterase (JONES ET AL., 1998), apesar deste não ser um típico mecanismo de ação tóxica deste metal. Ainda a nível subcelular, foi detectada a formação de micronúcleos em células de sangue do *P. vivipara* expostos a  $47,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre (ADAM ET AL., 2010), e ainda a formação de binúcleos em células das brânquias e do fígado de *Carassius gibelio* expostas a  $250 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre (CAVAS ET AL., 2005).

### 2.6.2 Efeitos do cobre a nível fisiológico

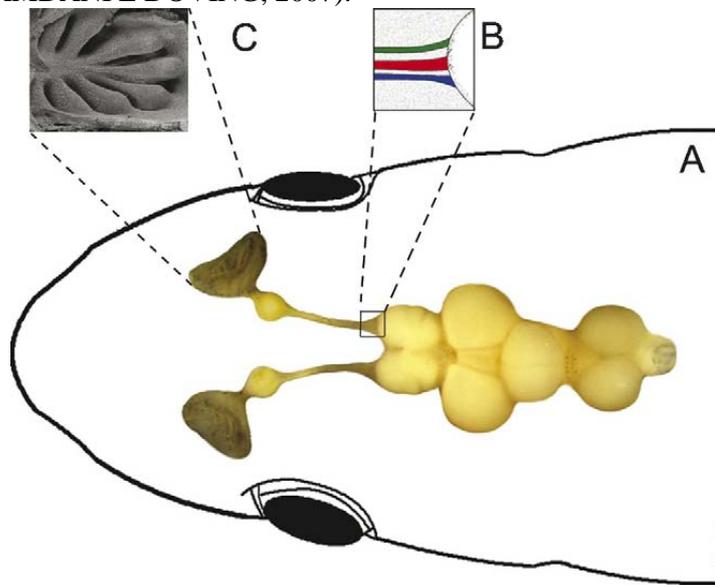
Uma inibição na absorção de íons de cálcio nos peixes *Hypomesus transpacificus* (CONNON ET AL., 2011) e *Colossoma macropomum* (MATSUO ET AL., 2005) foi encontrada após a exposição ao cobre. Beaumont et al. (2000) encontraram um acúmulo de amônia no plasma do *Salmo trutta*, além de um prejuízo na coordenação eletrofisiológica da função muscular após 96 horas de exposição ao cobre. O acúmulo deste metal nas brânquias pode causar danos no epitélio branquial resultando em distúrbios respiratórios, iônico e osmorregulatórios (HANDY, 2003; MCGEER ET AL., 2000).

De acordo com Beaumont et al. (2000), concentrações subletais de cobre comprometem a capacidade de nadar de *S. trutta*, mesmo em condições normais de oxigenação. O consumo de oxigênio aumenta devido a alterações nas funções respiratórias e ionoregulatórias ocasionadas nas brânquias, provocando uma redução na resistência natatória (BEAUMONT ET AL., 1995; HANDY, 2003). Respostas como a redução do crescimento e perda de apetite foram encontradas por McGeer et al. (2000) e De Boeck et al. (1995) em *O. mykiss* e *Cyprinus carpio*, respectivamente.

### 2.6.3 Efeitos do cobre a nível histológico no epitélio olfatório

A maioria dos peixes teleósteos possuem órgãos olfativos bem desenvolvidos por estarem cercados de muitos odores no ambiente aquático (TIERNEY ET AL., 2010). Fazem parte do sistema olfatório o epitélio olfatório na roseta olfatória, o bulbo olfatório, o trato olfatório e a região do telencéfalo no cérebro (Figura 1).

**Figura 1** – Esquema do sistema olfatório de carpa. A. Vista dorsal da cabeça. B. Desenho esquemático dos feixes do nervo olfatório entrando no telencéfalo. C. microscopia eletrônica de varredura da roseta olfatória. Fonte: (HAMDANI E DOVING, 2007).



No epitélio olfatório se encontram duas áreas distintas: uma área sensorial, e outra não sensorial. A área sensorial contém três tipos de neurônios sensoriais olfatórios chamados ciliados, microvilos e cripta, que expressam moléculas de receptores olfativos e projetam seus axônios para o bulbo olfatório (HUSSAIN, 2011; TIERNEY ET AL., 2010). Na parte central da área sensorial é medida a reação de alarme (HAMDANI ET AL., 2000), e nas áreas laterais os comportamentos reprodutivo e alimentar (HAMDANI ET AL., 2001; WELTZIEN ET AL., 2003).

A percepção olfativa inicia-se com o reconhecimento de odores por receptores odorantes, que pode ocorrer por difusão ou por ligação a proteínas receptoras que se associam a estruturas idênticas ou diferentes. A informação do odorante é passada através do bulbo olfatório por neurônios que atravessam o trato olfatório até o telencéfalo, onde é identificado o odor e há uma resposta comportamental (HAMDANI E DOVING, 2007; HUSSAIN, 2011).

Estudos ecotoxicológicos têm dado atenção ao efeito da exposição a poluentes químicos ou águas acidificadas sobre o sistema sensorial olfatório de peixes devido à vulnerabilidade

deste órgão por estar em contato direto com a água (BETTINI ET AL., 2006). Entre os compostos que causam danos no sistema olfatório, os metais estão entre os mais estudados (TIERNEY ET AL., 2010).

Metais pesados, em especial o cobre, têm prejudicado os neurônios receptores olfativos alterando suas respostas neurofisiológicas pela necrose das células do epitélio olfatório e induzindo a apoptose celular em várias espécies de peixes (BETTINI ET AL., 2006; CARRANZA-ROSALES ET AL., 2005; DE OLIVEIRA RIBEIRO ET AL., 2002; JULLIARD ET AL., 1996; SAUCIER E ASTIC, 1995; SCOTT ET AL., 2003), como para o *O. kisutch* em apenas 10 minutos de exposição a  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre (BALDWIN ET AL., 2003). Análises histológicas realizada por Bettini e colaboradores (2006) no peixe *Tilapia mariae* expostos a concentração de cobre de  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  por 96 horas apresenta sinais de degeneração de neurônios receptores olfativos. Em  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre foi revelado um dano extensivo no epitélio olfatório, e processos degenerativos em todos os tipos celulares.

#### **2.6.4 Efeitos do cobre a nível histológico no epitélio branquial**

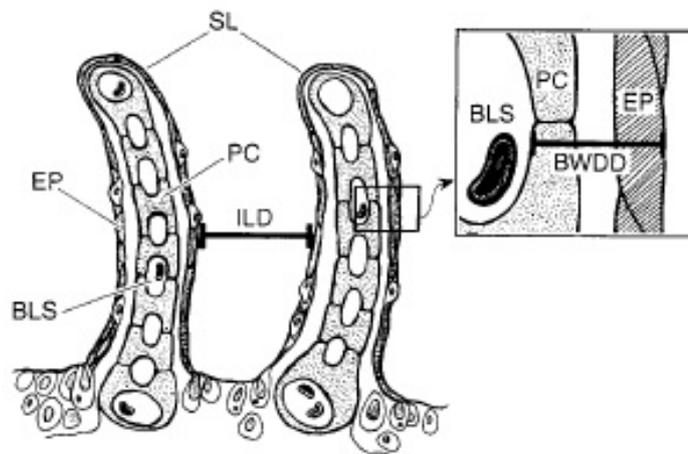
O conhecimento da morfologia branquial de peixes é uma das formas que contribuem para explicar os mecanismos de adaptação dos indivíduos a alterações ambientais (ARAÚJO ET AL., 2001). Este conhecimento permite que a histopatologia de brânquias seja utilizada como biomarcadores histológicos apropriados para avaliar os efeitos de contaminantes em ambientes aquáticos (CAMARGO E MARTINEZ, 2007).

A formação do epitélio branquial tem origem ectodérmica e endodérmica (GONZÁLEZ ET AL., 1996), onde quatro arcos de ambos os lados da cavidade bucal são formados a partir do rompimento do contato com a faringe, abrindo-se até o meio externo (ARAÚJO ET AL., 2001; GONZÁLEZ ET AL., 1996). Duas linhas de filamentos branquiais que partem dos arcos branquiais são chamadas de lamelas primárias e secundárias, e são cobertas por dois tipos de epitélio respiratório, simples e estratificado (SABÓIA-MORAIS ET AL., 2011). As lamelas secundárias originam-se das superfícies superior e inferior da lamela primária, e são orientadas perpendicularmente a estas. Seu revestimento epitelial encontra-se sobre uma membrana suportada pelas células pilar. As células pilares regulam o fluxo sanguíneo através do controle do diâmetro com contração ou expansão do filamento da lamela. A direção do fluxo de sangue é oposta à do fluxo de água sobre as lamelas. A distância de difusão sangue-água promove a troca eficiente de oxigênio e resíduos metabólicos solúveis (YONKOS ET AL., 2000).

As brânquias exercem sua função para os animais aquáticos relacionada a respiração, excreção e regulação iônica. São as principais vias de entrada dos contaminantes e se classificam como um ligante biótico importante na acumulação de metais e consequente toxicidade (MARTINS, 2008; ROMÉO ET AL., 1994). Existe uma relação dose-resposta clara com relação ao cobre e o epitélio branquial, sendo que quanto mais longa a exposição ao metal maior o efeito no epitélio branquial (NIKL E FARRELL, 1993).

Metais pesados causam consideráveis mudanças na estrutura das brânquias. Entre elas podemos listar a diminuição da distância interlamelar, a fusão lamelar, o aumento da distância de difusão sangue-água (Figura 2), o espaçamento da camada de muco, a necrose celular e a ruptura de células na lamela (BEAUMONT ET AL., 1995; MALLATT, 1985; NIKL E FARRELL, 1993; SKIDMORE E TOVELL, 1972; WILSON E TAYLOR, 1993; WOOD, 2001).

**Figura 2** – Diagrama simplificado de duas lamellas secundárias em seção transversal, ilustrando os parâmetros usados para estudos de histopatologia de brânquias. Abreviações: EP, epitélio; BLS, espaços sanguíneos; PC, células pilar; SL, lamella secundária; ILD, distância interlamelar; BWDD, distância de difusão sangue-água. Fonte: (NIKL E FARRELL, 1993).



As distâncias interlamelar e a distância de difusão sangue-água são efeitos branquiais frequentemente mensurados para avaliar efeitos de contaminantes. Para juvenis de salmonídeos expostos a 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole a distância entre as lamelas foram reduzidas a 74%, e a distância de difusão sangue-água nas brânquias foram aumentadas para 276% com relação aos peixes controle (NIKL E FARRELL, 1993). Para o *Prochilodus scrofa* e *O. mykiss* exposto ao cobre por 96 e 24 horas respectivamente, foram encontrados efeitos semelhantes de elevação epitelial, aumento da espessura epitelial e da distância de

difusão sangue-água (CERQUEIRA E FERNANDES, 2002; DAGLISH E NOWAK, 2002; DANG ET AL., 2000a; DANG ET AL., 2000b; VAN HEERDEN ET AL., 2004).

## 2.7 EFEITOS DO COBRE A NÍVEL COMPORTAMENTAL

Parâmetros comportamentais em peixes podem ser utilizados como testes padronizados para o monitoramento dos efeitos da contaminação por metais nos ambientes aquáticos (ATCHINSON ET AL., 1987). Tais medidas são frequentemente alteradas em exposição a baixas concentrações de um poluente, desde que sejam conhecidos os comportamentos normais padrão (SHEEHAN, 1984). Devido à correlação com outros níveis de organização biológica, os parâmetros comportamentais são medidas ecologicamente relevantes para avaliação de efeitos toxicológicos, uma vez que expressam uma integração das respostas fisiológicas e subcelulares, e podem ser úteis na extrapolação para efeitos ao nível populacional (SCOTT E SLOMAN, 2004).

Estímulos externos são responsáveis por desencadear sequências bioquímicas e fisiológicas que ativam o sistema neural dos organismos, gerando deste modo uma resposta comportamental. Ocorrendo alguma mudança nesta sequência, teremos uma alteração no resultado da resposta comportamental, podendo gerar sérias implicações para a sobrevivência da espécie estudada (SCOTT E SLOMAN, 2004).

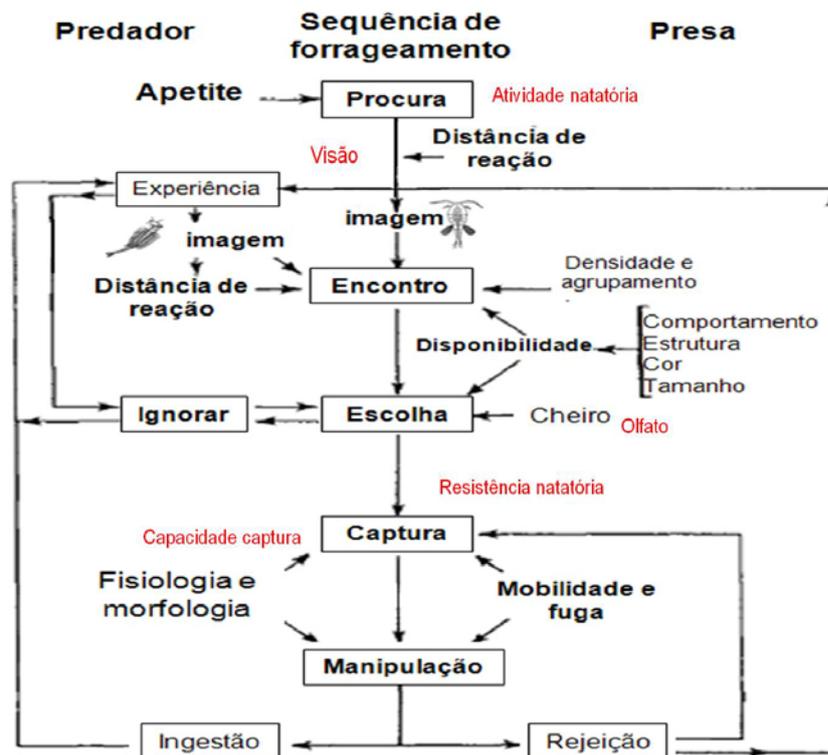
De acordo com Little e Brewer (2001), os efeitos de poluentes aquáticos no comportamento de peixes podem ser relacionados a sistemas sensoriais específicos como o olfato, a visão, a linha lateral, ou então a aspectos neuromotores como a habilidade natatória, ou ainda a aspectos que integram efeitos sensoriais e neuromotores. As consequências ecológicas de efeitos comportamentais decorrentes de danos sensoriais ou neuromotores se manifestam através de danos em comportamentos adaptativos como a migração, a habilidade para fuga de predadores ou para a captura de presas, que podem limitar a sobrevivência dos indivíduos ou a sua viabilidade em longo prazo, incluindo a geração de descendentes (LITTLE E BREWER, 2001).

As interações ecológicas dependem de comportamentos apropriados, sejam elas interespecíficas, por exemplo, a capacidade de capturar um alimento e fugir de um predador, ou intraespecíficas como identificar a substância de alarme do coespecífico que sofreu um ataque de predador e reconhecer parceiros reprodutivos. Alterações nos comportamentos sociais associadas à capacidade de fugir de um predador, capturar alimento e outros, quando considerados como impactos potenciais sobre populações de peixes, podem ser consideradas

de maior relevância ambiental que respostas comportamentais individuais (SCOTT E SLOMAN, 2004).

Na figura 3 está esquematizada uma seqüência de forrageamento de peixes proposto por Walker (2005) e adaptado por Melo (2011), onde neste esquema estão enfatizadas as etapas para o sucesso da captura, sendo adicionados alguns dos comportamentos possíveis de serem quantificados, e alterados por uma exposição química, mas que são necessários durante este processo. Durante a procura de uma presa, o peixe nada espontaneamente e utiliza de seu sistema sensorial para encontrar e escolher seu alimento, entre eles estão a visão e o olfato. Ao escolher a presa, é necessário ter uma resistência natatória para o ataque e capturar a mesma.

**Figura 3** – Representação esquemática dos componentes do comportamento de forrageamento. Fonte: (MELO, 2011).



### 2.7.1 Sistema sensorial olfatório

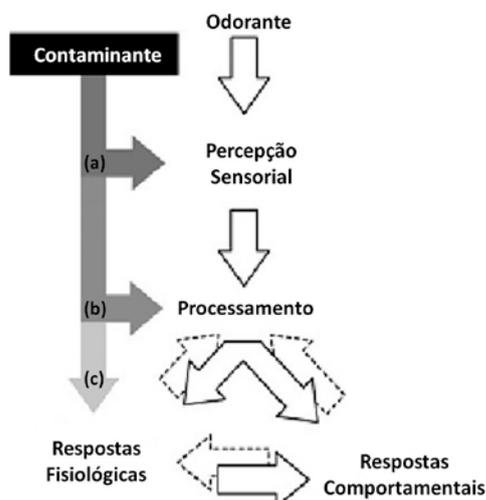
Os sistemas sensoriais olfatórios que evoluíram ao longo do tempo percebem informações ambientais bióticas e abióticas valiosas. O olfato auxilia em três processos fundamentais para sobrevivência da espécie: na alimentação, através da localização de presas; na evasão, de ambientes contaminados ou de predadores pela reação de alarme e migração; na

reprodução, pelo reconhecimento de parceiros viáveis para acasalamento, e na distinção de parentes (HAMDANI E DOVING, 2007; HUSSAIN, 2011; TIERNEY ET AL., 2010).

O processo olfatório consiste em três componentes, uma fonte, um sinal e um receptor (TIERNEY ET AL., 2010). Os peixes, cujo epitélio olfatório funciona como receptores destes sinais químicos dissolvidos no meio aquático recebem estes sinais que podem trazer informações classificáveis nos seguintes tipos: direcionais, condicionais, táticas ou genéticas (TIERNEY ET AL., 2010). As informações direcionais podem vir a ser de fontes estacionárias ou em movimento, e um bom exemplo são as características químicas da água do riacho de nascimento que levam os salmões a migrarem de volta para o lugar onde nasceram. Informações condicionais indicam o status de fontes bióticas deste odor, como por exemplo, um peixe que distingue machos de fêmeas por este odor. Informações táticas alertam a presença de presas ou predadores, que pode ocorrer tanto pela liberação de um ferormônio de alarme quanto pela detecção de odor de um predador. Informações genéticas permitem a identificação de indivíduos da mesma espécie. Contaminantes químicos podem afetar o sistema olfatório de peixes, e afetar a interpretação de todas estas fontes de informação (TIERNEY ET AL., 2010).

Os contaminantes podem afetar a função olfativa atuando como moléculas que simulam odores perceptíveis pelo epitélio olfatório. Por outro lado, contaminantes podem modificar a percepção de odores, ou ainda atuar no sistema nervoso a nível de processamento destas informações, ou em aspectos fisiológicos que levem a alteração de respostas comportamentais mediadas pelo olfato (Figura 4) (TIERNEY ET AL., 2010).

**Figura 4** – Contaminantes podem: (a) atuar como odorantes ou modificar a percepção de odores; (b) atuar sobre o sistema nervoso por outras vias; (c) alterar respostas fisiológicas que traduzem numa potencial alteração comportamental. Fonte: (TIERNEY ET AL., 2010).



As alterações na função olfativa apresentam três categorias: anosmia, que é uma incapacidade de sentir o odor; hiposmia, que é a redução da capacidade de sentir odor devido a danificações no nervo olfativo; e disosmia, onde a informação é processada de forma distorcida. A maioria dos poluentes químicos causa algum efeito de hiposmia e em maiores concentrações pode causar anosmia. A ocorrência de disosmia é incomum, mas águas altamente contaminadas com metais podem causar um efeito de atração nos peixes ao invés de evasão do local (TIERNEY ET AL., 2010).

#### 2.7.1.1 Efeitos olfatórios relacionados à reação de alarme

A detecção de substâncias químicas de alarme pelos indivíduos é um sistema que permite a percepção de predadores sem uma inspeção visual (NORDELL, 1998), podendo ocorrer em menos de 10 segundos de exposição a um extrato de pele (DUBOC, 2007). A reação de alarme é comumente encontrada em animais de hábito social como especialização adaptativa comportamental que pode ser exibida de diversas formas visando a proteção contra predadores (SMITH, 1992).

A substância de alarme é produzida por um conjunto de células epidérmicas que contém um princípio químico ativo semelhante a um feromônio (DUBOC, 2007). Estas células ao serem danificadas liberam a substância de alarme, que ao ser identificado pelas células do epitélio olfatório de indivíduos da mesma espécie, fazem com que de forma involuntária estes apresentem um comportamento de reação de alerta que se propaga visualmente (SMITH, 1992). Duboc (2007) afirma que mesmo que aconteça a transmissão visual, o indivíduo pode não ser capaz de gerar uma resposta de alarme, caso este não consiga perceber através de seu olfato a substância de alarme, ou a célula de produção da substância de alarme no coespecífico desapareça.

A reação de alarme tem sido avaliada qualitativamente e quantitativamente na literatura através de diferentes tipos de comportamento. A qualidade da reação tem sido mensurada de acordo com um índice de intensidade da reação de alarme. A busca por um abrigo, a paralisia natatória, o agrupamento de indivíduos, o estresse natatório, a redução do forrageamento, e o aumento da área de evasão, são comportamentos que podem ser avaliados quantitativamente (BROWN E GODIN, 1999; DUBOC, 2007; GIAQUINO E VOLPATO, 2001; LURLING E SCHEFFER, 2007; NORDELL, 1998).

Salmonídeos perderam a resposta de alarme após a exposição a  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  cobre, devido a danos demasiados no epitélio olfatório (SANDAHL ET AL., 2007). Beyers e Farmer (2001)

relatam que o peixe *Colorado pikeminnow* exposto ao cobre perdeu os cílios dos neurônios sensoriais olfatórios, e a resposta de alarme foi alterada, especialmente após 24 horas de exposição ao cobre.

Pode-se considerar a resposta de alarme como sendo importante para sobrevivência da espécie, uma vez que está diretamente relacionado à capacidade de identificação e localização de predação iminente ocorrendo no ambiente, de forma que os indivíduos possam evitar esta predação.

#### 2.7.1.2 Efeitos olfatórios relacionados à evasão a contaminantes

A detecção de diversos tipos de contaminantes na água e a evasão de peixes destes sistemas aquáticos tem sido apontada como uma resposta comportamental mais sensível do que os efeitos letais. Em alguns casos os organismos podem responder se evadindo até mesmo de ambientes com concentrações menores do que as permitidas na legislação (MOREIRA-SANTOS ET AL., 2008).

Em longo prazo, a evasão de organismos de ambientes aquáticos contaminados por compostos que disparam este tipo de reação de fuga pode ter consequências ecológicas importantes por alterar a estrutura das comunidades nestes sistemas através de efeitos diretos como a emigração, equivalente à morte da população, e também através de efeitos indiretos, quando, por exemplo, estes indivíduos têm que se evadir para ambientes em que a disponibilidade de alimentos não é adequada (ATCHINSON ET AL., 1987; WELLS ET AL., 2004). O metal cobre pode causar uma resposta de evasão de ambientes contaminados, como mostrado pelos *O. tshawytscha* e *O. mykiss* que se evadem intensamente desde a concentração de  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre (HANSEN ET AL., 1999A).

O cobre na concentração de  $1,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  associado ao cádmio, chumbo e zinco decorrentes de atividades mineradoras presentes nas águas do rio “Clark Fork” no estado de Montana nos EUA, é suficiente para gerar respostas de evasão dos *O. mykiss* e *S. trutta* neste rio, diminuindo significativamente a abundância populacional da espécie. Isto foi evidenciado por experimentos de laboratório avaliando a evasão destas espécies para misturas ambientalmente relevantes destes metais (HANSEN ET AL., 1999B; WOODWARD ET AL., 1995). Estes efeitos comportamentais são exemplos de evidência sobre os mecanismos ecológicos através dos quais efeitos deletérios de contaminantes em sistemas sensoriais e respostas comportamentais associadas se propagam de níveis inferiores de organização biológica até o nível populacional (SCOTT E SLOMAN, 2004).

Dessa forma pode-se considerar a evasão como um efeito subletal muito importante que pode ser usado em estudos que buscam avaliar os riscos ambientais causados por contaminantes vindos das mais diversas atividades. Além disso, as respostas de evasão são utilizadas como parâmetros comportamentais para evidenciar impactos ambientais na legislação americana relativa à qualidade de águas em geral (“Clean Water Act”) e em aspectos relativos à poluição por petróleo (“Oil Pollution Act”) (ROBINSON, 2009). Entretanto a resposta de evasão de um ambiente tem um caráter ecológico de grande relevância na estimativa dos efeitos da exposição a contaminantes, mas devido à falta de padronização destes testes, ainda não foram incluídos em avaliações de impacto ambiental em larga escala (MOREIRA-SANTOS ET AL., 2008).

### **2.7.2 Atividade e resistência natatória**

A habilidade natatória é um comportamento de grande relevância ecológica por estar associada aos processos vitais como reprodução, migração, formação de cardumes, habilidade de captura de alimento e capacidade de fuga de predadores (SAGLIO ET AL., 2003). A alteração deste comportamento pela exposição subletal a contaminantes causa prejuízos ecológicos (LITTLE E FINGER, 1990) que são potencialmente graves para o futuro da população (ALVAREZ E FUIMAN, 2006).

A atividade natatória pode ser medida através da frequência e duração de movimentos, da velocidade de natação, da distância percorrida, e da posição na coluna de água (LITTLE E FINGER, 1990). A quantificação destas variáveis tem se tornado cada vez mais sensível pela melhoria dos programas computacionais que utilizam vídeos e imagens digitais, gerando informações de forma eficiente sobre estas variáveis para os indivíduos sendo testados pela exposição a contaminantes (KANE ET AL., 2005).

A atividade natatória espontânea é possivelmente uma medida mais adequada do comportamento natatório para uso rotineiro em estudos de toxicidade devido a sua fácil avaliação, consistência, sensibilidade e utilidade. Medições do comportamento natatório são indicadores consistentes de toxicidade nas diferentes espécies de peixe e nas mais variadas condições ambientais, podendo ser utilizadas como biomarcadores de efeitos ecotoxicológicos a nível comportamental, e serem incorporadas em protocolos padronizados para testes de toxicidade (LITTLE E FINGER, 1990).

Diferentemente da atividade natatória espontânea, a resistência natatória reflete a habilidade de um peixe nadar contra uma determinada orientação de um fluxo de água,

podendo ser avaliada pela capacidade física do peixe de nadar de forma sustentada contra este fluxo de água, que pode ser constante, ou cuja velocidade é gradativamente aumentada (LITTLE E FINGER, 1990). A capacidade de natação está diretamente relacionada com a velocidade média que o peixe consegue alcançar, podendo ser classificada em três categorias: sustentada, prolongada e de explosão (BEAMISH, 1978).

A velocidade de natação sustentada é baixa e pode ser mantida pelo peixe por um período maior que 240 minutos (BEAMISH, 1966), estando relacionada com a obtenção de energia por via metabólica aeróbica e não resulta em fadiga muscular. Este tipo de natação é utilizado em atividades rotineiras como natação espontânea, forrageamento, exploração de território e ainda em processos migratórios (REIDY ET AL., 2000). A velocidade de natação prolongada é mantida pelo peixe por um período inferior a 240 minutos, obtendo energia por via metabólica aeróbica e resulta em uma exaustão dos peixes pela exposição a correntes de água nesta faixa de tempo (BEAMISH, 1966). A velocidade de natação de explosão é alta, e pode ser suportada pelo peixe por um período máximo de 60 segundos, estando relacionada com a obtenção de energia por via metabólica anaeróbica, e resultando em rápida fadiga muscular (BEAMISH, 1966). Este tipo de natação é frequentemente utilizado em respostas rápidas de ataque a presas ou na fuga de predadores (REIDY ET AL., 2000).

O primeiro a sugerir a resistência natatória como uma medida importante na determinação de efeitos tóxicos de concentrações subletais de contaminantes em peixes foi Cairns (1966). Desde então medidas de resistência natatória têm sido utilizadas para definir limites de tolerância a poluentes ambientais, por ser sensível a ações tóxicas para uma ampla variedade de espécies (LITTLE E FINGER, 1990).

Vieira et al. (2009) encontrou efeitos significativos e concentração-dependentes na resistência natatória do peixe estuarino *Pomatoschistus microps* exposto a  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre. Para o *C. carpio* e *Carassius auratus gibelio* a exposição a  $1\mu\text{M}$  de cobre causou um decréscimo na resistência natatória, de 31% e 13% após 12 horas de exposição, respectivamente (DE BOECK ET AL., 2006). Para *O. mykiss* uma redução na resistência natatória foi encontrada a partir de 24 horas de exposição ao cobre (DE BOECK ET AL., 2006), sendo que a exposição aguda em  $105 \mu\text{g.L}^{-1}$  diminuiu 86% de sua capacidade (WASER ET AL., 2009), e na exposição crônica em  $75 \mu\text{g.L}^{-1}$  a redução foi de 88% (MCGEER ET AL., 2000).

A capacidade natatória é um comportamento sensível que indica a toxicidade subletal para exposição a metais. A redução da resistência natatória e o aumento do consumo de oxigênio pode ser revelado por análises histológicas das brânquias que apresentam um efeito

de dano estrutural nestes indivíduos (BEAUMONT ET AL., 1995; DE BOECK ET AL., 2006; NIKL E FARRELL, 1993; VAN HEERDEN ET AL., 2004). Estas alterações interferem na respiração e ionorregulação diminuindo a área disponível para troca gasosa (DE BOECK ET AL., 2007; GROSELL E WOOD, 2002; HANDY, 2003; JEWELL ET AL., 2000; MCGEER ET AL., 2000; WOOD, 2001).

Beaumont et al. (2000) afirma que a exposição ao cobre causa acumulação do íon amônio no músculo dos peixes, interferindo no nervo central periférico pela substituição do íon potássio (WASER ET AL., 2009), que resulta na despolarização da membrana de células musculares. Isto causa alteração da transmissão de sinais de excitação/contração neuromuscular, ocasionando rapidamente a fadiga e redução da resistência natatória (SHINGLES ET AL., 2001).

Desta forma, biomarcadores comportamentais relacionados à resistência natatória podem ser avaliados em diferentes condições ambientais de exposição a poluentes. Trata-se de uma medida confiável e de grande relevância ecológica (PLAUT, 2001).

### **2.7.3 Captura de presas**

O biomarcador comportamental relacionado à captura de presas é ecologicamente relevante e foi proposto como parâmetro para avaliação de efeitos de contaminantes em peixes estuarinos (WEIS ET AL., 2001), pois alimentação e crescimento são fundamentais para o sucesso de qualquer espécie. O sucesso durante a caça por presas requer a utilização de diversos sistemas sensoriais para detecção e eventual captura, entre eles a visão (PESSOA ET AL., 2011) e o olfato (TIERNEY ET AL., 2010). A visão adequada é essencial para a detecção da presa e a precisão no ataque (EVANS E FERNALD, 1990), enquanto o olfato também é de extrema importância para distinguir presas e predadores (HONDA ET AL., 2008).

Além de percepções sensoriais, os indivíduos também se utilizam da habilidade natatória no processo de procura, encontro, escolha e reconhecimento da presa, perseguição, ataque, manipulação até a ingestão completa do alimento (WALKER ET AL., 2005). Estudos focados nos comportamentos desta sequência de eventos vêm conduzindo a uma melhor compreensão das estratégias de caça, gasto de energia durante o forrageio, a influência ambiental e o sucesso na captura, contribuindo para o entendimento da ecologia do forrageamento em peixes (FUIMAN ET AL., 2006).

Os contaminantes ambientais podem causar várias alterações nestes processos, desde aspectos relativos ao metabolismo dos peixes na disponibilização de energia até à eficiência no comportamento de forrageio (WEIS ET AL., 2003). Em laboratório as mudanças no comportamento alimentar são perceptíveis em resposta à exposição a concentrações subletais dos poluentes (LITTLE E FINGER, 1990), que em situações de campo podem comprometer o crescimento da população e causar seu declínio (WEIS ET AL., 2003).

Muitas espécies de peixes quando expostas a metais apresentam um efeito tóxico no comportamento alimentar causando a redução da ingestão de alimento (SANDHEINRICH E ATCHISON, 1990). A hipoatividade natatória nos peixes também leva a uma redução na taxa de alimentação, pela diminuição da taxa de encontro entre o predador e suas presas, e diminuição do crescimento dos mesmos (ZHOU E WEIS, 1998). Em peixes expostos ao cobre, uma variedade de alterações comportamentais e fisiológicas são observadas, como a diminuição de neurotransmissores envolvidos no comportamento alimentar de carpas, prejudicando a ingestão de alimentos (DE BOECK ET AL., 1995).

### 3 EFITOS DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DO COBRE NO COMPORTAMENTO DE JUVENIS DO PEIXE *POECILIA VIVIPARA*

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um elemento de significativa relevância ambiental, pois pode contaminar ambientes aquáticos devido a atividades como a mineração (BIDONE ET AL., 2001), ao seu uso na agricultura em fertilizantes, bactericidas, fungicidas e algicidas, e a geração de esgotos domésticos e industriais (MACHADO ET AL., 2002; WHO, 1998). Além destas fontes, a contaminação por cobre oriundo da pintura de embarcações tem aumentado significativamente com a crescente substituição de tintas com função anti-incrustante a base de organo-estânicos por tintas a base de cobre (PARKS ET AL., 2010; YTREBERG ET AL., 2010).

Nos ambientes aquáticos existem diferentes características físico-químicas que influenciam a disponibilidade e toxicidade deste metal. A forma mais tóxica presente nestes ambientes é o íon cúprico livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (DE SCHAMPHELAERE ET AL., 2002; HALL E ANDERSON, 1999; PAQUIN ET AL., 2002), que é absorvida pelos organismos aquáticos rapidamente e quando em excesso pode desempenhar toxicidade em um curto período de exposição (BLANCHARD E GROSELL, 2005).

A exposição de peixes a concentrações de Cu acima de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  pode causar efeitos letais para muitas espécies, sendo que a CL50 (96h) para peixes de água doce varia de  $2,58 \mu\text{g Cu/L}$  para larvas do *Thymallus arcticus* a  $7340 \mu\text{g Cu/L}$  para juvenis do *Lepomis macrochirus*. Para peixes marinhos, a CL50 (96h) varia de  $60 \mu\text{g Cu/L}$  para o *Oncorhynchus tshawytscha* a  $1690 \mu\text{g Cu/L}$  para o *Rivulus marmoratus* (WHO, 1998).

Um importante sítio de efeito tóxico são os sistemas sensoriais como o olfatório, que estão diretamente expostos a contaminantes dissolvidos biodisponíveis (GREEN ET AL., 2010). A forma solúvel catiônica do cobre pode causar efeitos subletais em peixes que incluem alterações na estrutura e funcionamento do sistema olfatório desde níveis moleculares até comportamentais (TIERNEY, 2011), incluindo a degeneração de células do epitélio olfatório (SAUCIER E ASTIC, 1995). Efeitos deletérios do cobre e de outros contaminantes no olfato de peixes podem ter consequências importantes para a localização de alimento, de parceiros reprodutivos e não reprodutivos, para a avaliação da qualidade de habitats, e para evitar predadores, além do reconhecimento de riachos para migração e desova em salmonídeos (MIRZA ET AL., 2009; PYLE E MIRZA, 2007; TIERNEY, 2011).

A reação de alarme é comumente encontrada em peixes com hábito social como especialização adaptativa comportamental que pode ser exibida de diversas formas, visando a proteção contra predadores (SMITH, 1992). A substância de alarme é produzida por um conjunto de células epidérmicas que liberam um feromônio (substância de alarme) ao serem danificadas durante a predação, que ao ser identificado pelos receptores do epitélio olfatório de indivíduos da mesma espécie, fazem com que de forma involuntária estes apresentem um comportamento de reação de alarme (SMITH, 1992). A resposta de alarme pode ser discriminada através de comportamentos antipredatórios como estresse natatório, diminuição da velocidade natatória ou paralisia seguida ou não da procura de um refúgio, ou agrupamento dos indivíduos. A exposição do *O. kisutch* a  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre diminuiu a resposta de reação de alarme expressa por uma significativa redução da velocidade de natação nos controles (SANDAHL ET AL., 2007).

O principal ligante biótico do cobre são as brânquias por estar em contato direto com a água, onde está associado a efeitos tóxicos como alterações osmorregulatórias que podem levar a letalidade (ALSOP E WOOD, 2011; DE BOECK ET AL., 2007; GROSELL E WOOD, 2002; LARSEN ET AL., 1997). O cobre dissolvido na água em concentrações relativamente pequenas, afeta a resistência natatória em peixes (BEAUMONT ET AL., 1995; WAIWOOD E BEAMISH, 1978), e há evidências de que esta diminuição seja devido a levantamento epitelial, inchamento celular e produção de muco a nível branquial, o que interfere com a respiração e ionorregulação pelo aumento da distância de difusão sangue-água (DE BOECK ET AL., 2006).

A capacidade de natação ou resistência natatória é considerada uma habilidade fundamental para a sobrevivência em muitas espécies de peixe, tanto como uma forma de evitar e sobreviver ao ataque de um predador, quanto para localizar e capturar presas, encontrar parceiros reprodutivos, se evadir de condições desfavoráveis ou vencer correntes de velocidade significativa durante o processo de migração (BAATRUP E BAYLEY, 1998; PLAUT, 2001).

A legislação brasileira estabelece que os valores máximos aceitáveis para a concentração de cobre dissolvido em águas salinas e doces varia de  $5 \mu\text{g/L}$  a  $13 \mu\text{g/L}$ , sendo que lançamentos de efluentes com até  $1 \text{ mg/L}$  deste metal são permitidos (CONAMA, 2005).

Este trabalho tem como objetivo avaliar potenciais efeitos da exposição ao cobre do peixe estuarino *Poecilia vivipara* em parâmetros comportamentais relacionados à resposta de alarme, à atividade natatória espontânea, à resistência natatória, e à habilidade de captura de presas.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Obtenção e manutenção dos *Poecilia vivipara*

Indivíduos de *Poecilia vivipara* foram coletados no canal de acesso à Lagoa do Araçá na cidade do Recife – PE, coordenadas 8°05'39,72" S de latitude e 34°54'59,08" O de longitude, e transportados ao Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFPE em baldes com 70 L de água do local de coleta. Os peixes foram mantidos em aquários de 40 L com aeração constante, troca de água a cada 48 horas, fotoperíodo de 12 horas, temperatura média de 26 °C, sendo alimentados com ração comercial (Alcon Artemia) e náuplios de Artêmia recém eclodidos.

Fêmeas grávidas foram separadas individualmente em aquários de 5 L, e a medida que os filhotes nasciam, eram separados da mãe, mantidos em aquários de 40 L e aclimatados a salinidade 25, sendo alimentados apenas com náuplios de Artêmia recém eclodidos. Foram necessárias aproximadamente sete semanas para se alcançar um tamanho de 20 a 25 mm de comprimento total, sendo que o tamanho médio dos juvenis utilizados nos experimentos foi de 21 mm.

### 3.2.2 Exposição ao cobre

O Cloreto de Cobre II ( $\text{CuCl}_2$ ) 97%, obtido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), foi pesado na balança analítica (marca Toledo modelo AR1530) com 0,02 g de precisão, sendo dissolvido 2,12 g do  $\text{CuCl}_2$  em 0,1 L de água destilada e formada a solução estoque de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de cobre na água.

Durante os experimentos onde os peixes foram distribuídos em aquários de exposição com 15 L na salinidade 25. As concentrações nominais de exposição ao cobre foram iguais a 5, 20, 40, 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , além da concentração controle ( $0 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre). Para obtenção destas concentrações foram pipetados nos aquários os volumes de 7,5, 30, 60, 75, 150, 300 e 600  $\mu\text{L}$  de cobre da solução estoque de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente.

Durante a exposição ao cobre realizou-se troca de 100% da água a cada 24 horas em sistema de fluxo semi-contínuo. Para as análises da qualidade da água utilizaram-se testes colorimétricos da marca LabconTest para amônia tóxica, nitrito, nitrato, dureza total e pH. Os resultados apresentaram-se constantes nos dias de exposição, onde a amônia tóxica ficou abaixo de 0,25 ppm, nitrito e nitrato mostraram-se ausentes na água, dureza de 1,47 KH e pH

igual a 8,2. A mortalidade foi contabilizada diariamente até 96 horas de exposição, sendo anotado e devidamente retirado os indivíduos mortos em cada tratamento.

### **3.2.3 Sistema de gravação de vídeo**

Os experimentos foram filmados com câmeras de vídeo tipo circuito fechado de televisão (CFTV) de marca MTC, modelo KBC602-LG com uma lente zoom 6-60 mm de distância focal. Estas se encontram instaladas sobre uma câmara clara com tampo de acrílico e com duas lâmpadas fluorescentes de luz branca com 58 W de potência, a fim de aumentar o contraste e qualidade das imagens dos vídeos, onde ficam posicionadas arenas experimentais (aquários) utilizados durante o teste. As câmeras são conectadas a um computador através de uma placa de captura de vídeo Geovision modelo GV800 capaz de gravar as imagens dos tratamentos simultaneamente em arquivos digitais no computador, para análise posterior.

### **3.2.4 Avaliação da resposta de alarme**

#### **3.2.4.1 Obtenção do extrato de pele**

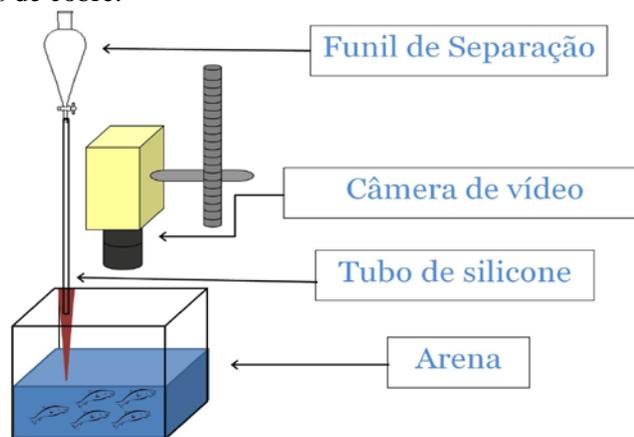
Para obtenção da pele que contém proteínas indutoras da resposta de alarme, foram utilizados exemplares de *P. vivipara* com comprimento total médio de 34 mm. Foram feitos cortes na seção medular ântero-dorsal, para desnervação e retirada da cabeça. Retirou-se ainda a nadadeira caudal e com um corte horizontal no ventre foram retiradas as vísceras, espinha dorsal e o excesso de músculo. O peso médio da pele foi de 0,12 g de pele por peixe, esta foi picotada com tesoura de ponta fina e colocada em um tubo de vidro com 0,01 L de água MiliQ. Após a maceração, realizada no interior do tubo de vidro com um pistilo com ponta de teflon no agitador mecânico modelo MA-099 (Marconi, Brasil), o concentrado foi filtrado com auxílio de papel filtro com poro máximo de 25 micra para retirada de escamas e do excesso de pele. Durante a filtração adicionou-se água MiliQ de modo que a solução estoque ficasse com concentração de extrato de 10 g de pele por L<sup>-1</sup>.

#### **3.2.4.2 Desenho experimental**

Durante o ensaio grupos de cinco indivíduos dos tratamentos expostos ao cobre por 96 horas mais o controle foram colocados em aquários com 20 cm de altura e base de 20 cm x 15 cm, em 2 L de água na salinidade 25, resultando em uma coluna de água de 6,5 cm de altura.

Acima de cada um dos aquários foi posicionado um funil de separação com torneira, onde foi inserido 0,01 L da solução de extrato de pele, que desce por um tubo de silicone até o aquário, obtendo-se a concentração de  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato no aquário após homogeneização (Figura 5). Foram gravados vídeos digitais durante 15 minutos durante período de aclimação aos aquários, seguindo da introdução do extrato de pele, e gravação de mais 5 minutos após a introdução do extrato, para posterior análise do comportamento dos peixes.

**Figura 5** – Desenho esquemático da metodologia utilizada para as gravações da resposta de alarme, exemplificando a disposição do aquário (arena), funil de separação e câmera, sistema utilizado em cada uma das concentrações de cobre.



#### 3.2.4.3 Quantificação da Resposta de Alarme

A análise dos vídeos foi feita avaliando-se o comportamento de cada indivíduo, de modo a calcular o número de indivíduos que responderam à presença do extrato de pele através de reações de estresse, paralisia e agrupamento. Estas respostas foram quantificadas a partir do momento em que a solução entrou no aquário de exposição, sendo avaliado do primeiro ao terceiro minuto de exposição ao extrato de pele.

A cada minuto foi quantificado o número de peixes do grupo de cinco indivíduos que apresentavam tais respostas de alarme, sendo um total de 13 grupos para o tratamento controle, 12, 13, 12 e 8 grupos para as concentrações de 5, 20, 40 e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre respectivamente.

A resposta de estresse foi classificada como uma natação diferenciada, na qual o peixe se contrai e se impulsiona para realizar grandes deslocamentos. Esta resposta é facilmente perceptível em contraste com a natação espontânea antes da adição do extrato de pele.

No comportamento de paralisia natatória o indivíduo reage ao extrato de pele reduzindo sua atividade natatória (hipoatividade), e a sua presença foi considerada positiva se algum peixe permanecia imóvel por no mínimo 10 segundos durante cada minuto avaliado.

No comportamento de reação de agrupamento, os peixes se concentram em um mesmo ponto por no mínimo 10 segundos. Nesta avaliação o índice mínimo de agrupamento dos peixes foi considerado igual a zero quando não havia nenhum indivíduo agrupado. Considerou-se um valor de índice igual a dois para uma dupla de indivíduos unidos, e o valor máximo de cinco, onde todos os peixes uniram-se em um mesmo local após a inserção do extrato de pele, numa estratégia adaptada de Nordell (1998).

### 3.2.5 Atividade natatória espontânea

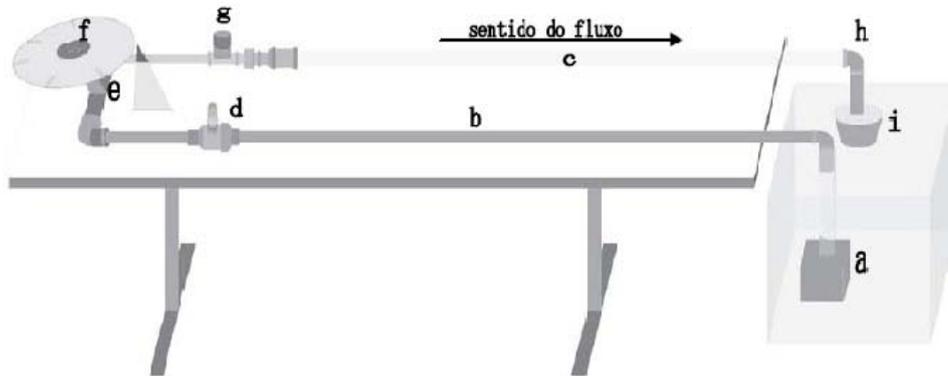
No monitoramento da atividade natatória espontânea, uma média de 14 indivíduos de cada um dos diferentes tratamentos, após 96 horas de exposição ao cobre, foram colocados individualmente em potes plásticos de 10 cm de diâmetro com 0,15 L de água na salinidade 25. Os peixes foram monitorados pelo sistema de vídeo durante 15 minutos, sendo 10 minutos para aclimação e os 5 minutos finais foram utilizados para análise da velocidade média de natação em  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Foi utilizado o software “Spyneurotraking” (BOSE, 2005) que identifica o animal e determina suas coordenadas “x” e “y” em cada quadro de uma sequência de imagens na arena experimental sendo monitorada. A partir destas coordenadas de posição e da dimensão da arena o *software* calcula a velocidade média da natação de cada indivíduo.

### 3.2.6 Avaliação da resistência natatória

Para avaliação deste parâmetro comportamental foi desenvolvido no Labecotox um equipamento (Figura 6) constituído por um sistema de tubos de PVC e acrílico, uma bomba submersa com vazão de  $1.200 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , e um aquário com volume de água de 35 L (MELO, 2011).

**Figura 6** - Representação esquemática do equipamento utilizado no teste de resistência natatória. A bomba (Figura 4a), que fica submersa no aquário, impulsiona água para o sistema de tubos de PVC (Figura 4b) e acrílico (Figura 4c) em formato de U. No tubo de PVC se encontra uma válvula (Figura 4d) que permite abrir ou fechar totalmente o fluxo de água no sistema. Um registro roscável de PVC (Figura 4e) regula a vazão de água durante o experimento e adaptou-se um disco de acrílico (Figura 4f) para marcação das vazões desejadas. Para introduzir o peixe no sistema foi instalada uma entrada com tampa rosqueável (Figura 4g). Após esta entrada do peixe é possível monitorar a natação contra

correntes padronizadas estabelecidas no sistema dentro do tubo de acrílico com 80 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro interno (Figura 4c). Depois do tubo de acrílico existe um ramo final de PVC que retorna para o aquário (Figura 4h) com uma cesta de captura (Figura 4i), para onde o peixe é arrastado quando se encontra em fadiga. Deste modo, é estabelecido um sistema fechado de circulação da água entre o aquário reservatório com a bomba submersa e o equipamento teste, onde o peixe é forçado a nadar contra a corrente gerada. No disco de acrílico (Figura 4f) adaptado ao registro roscável de PVC (Figura 4e) foi marcado o ponto de fechamento total da vazão, e a partir deste foram marcados pontos sucessivos a cada meia-volta do disco, devidamente numerados, permitindo o estabelecimento de vazões crescentes através do sistema. Fonte: (MELO, 2011)



Para cada ponto marcado no disco foi calibrada a vazão, mensurando o tempo em segundos necessário para encher uma proveta de vidro de 0,5 L, calculando assim a vazão de cada ponto do disco de acrílico. A vazão mínima utilizada no período de aclimação e como primeira vazão para o teste foi de  $1,6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , e a última vazão, sendo esta a vazão máxima, foi de  $9,9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A avaliação da resistência natatória foi feita em dois experimentos de exposição diferentes, sendo que o primeiro foi realizado com peixes expostos ao cobre nas concentrações de 5, 20 e  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 120 horas de exposição. No segundo experimento os peixes foram expostos ao cobre nas concentrações 5, 20, 40 e  $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 144 horas de exposição.

O teste se inicia com a introdução aleatória do peixe das concentrações testadas no sistema através da entrada com tampa rosqueável, ligando-se a bomba e gerando um fluxo de água no sentido indicado na Figura. Os juvenis permanecem no tubo de acrílico onde é possível monitorar se permanecem durante 1 minuto na vazão mínima de  $1,6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , considerando este período como aclimação no equipamento. Após a fase de aclimação o tempo passou a ser cronometrado e a vazão foi aumentada progressivamente em média em  $1,9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  a intervalos regulares de 1 minuto.

O teste foi encerrado quando o peixe suportou nadar por 1 minuto na vazão máxima de  $9,9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  aplicada no teste, ou não suportou mais nadar contra o fluxo de água ao qual

estava sendo submetido na última vazão testada, sendo arrastado até a cesta de captura (Figura 4i). Foi registrado o tempo total transcorrido desde o início do teste, incluindo o número de segundos que o peixe se manteve nadando na última vazão suportada, antes do peixe cair na cesta.

Foi aplicado o Índice de Resistência Natatória (IRN) com base nos dados quantificados em cada indivíduo testado. O cálculo utiliza um somatório das vazões em que o peixe conseguiu suportar (vazão acumulada), mais a fração do tempo de permanência em que o juvenil manteve-se resistindo na última vazão ao qual estava submetido, multiplicado por esta última vazão máxima para o peixe por não conseguir mais vencer o fluxo de água. Deste modo a fórmula utilizada é:

$$\text{IRN} = \text{Vazão Acumulada} + \frac{\text{Fração de tempo}}{60} \times \text{Última Vazão}$$

### 3.2.7 Captura de presas

O cálculo do número de presas capturadas foi feito para uma média de 20 peixes dos diferentes tratamentos após 120 horas de exposição ao cobre, tendo sido cada peixe colocado individualmente em potes plásticos de 10 cm de diâmetro com 0,15 L de água limpa na salinidade 25. Náuplios de *Artemia sp.* foram utilizados neste teste como presas padronizadas, sendo separados 100 náuplios no estágio de 48 horas pós-eclosão em potes plásticos com 0,15 L de água limpa na salinidade 25, e oferecidos a cada peixe.

Foi adicionado o volume de náuplios de *Artemia sp.* (0,15 L) em cada arena onde se encontravam os peixes, permitindo uma interação predador-presa em um volume total de 0,3 L por até 5 minutos. Após este período foram separados os peixes predadores dos náuplios que sobraram, sendo retidos os náuplios em malha de 64 micrometros, corados com rosa de bengala e fixados em formol 4% para serem contados em estereomicroscópio. Para o cálculo do número de náuplios capturados subtraiu-se o número inicial de 100 náuplios pelo número final de sobra.

### 3.2.8 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software SigmaPlot para Windows versão 11.0, a um alfa de 5% para todas as análises. Os parâmetros foram analisados quanto à

normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov e quanto à homogeneidade de variâncias ou heterodasticidade pelo teste de medianas Levene. A ANOVA I foi utilizada para os dados que apresentaram uma distribuição normal ou homogeneidade de variância. Para os dados que não apresentaram uma distribuição normal ou heterodasticidade utilizamos a análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis. Havendo diferença significativa entre os tratamentos a um nível de significância de 5%, foram aplicados testes de comparação múltipla de Dunnett, no caso da análise de variância paramétrica de uma via, e de Dunn no caso da análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis. Para o cálculo da concentração letal de 50% de cobre para os juvenis de *P. vivipara* expostos ao cobre por 96 horas utilizou-se o método estatístico “Trimed Spearman-Kärber”.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 CL50-96h para juvenis de *Poecilia vivipara*

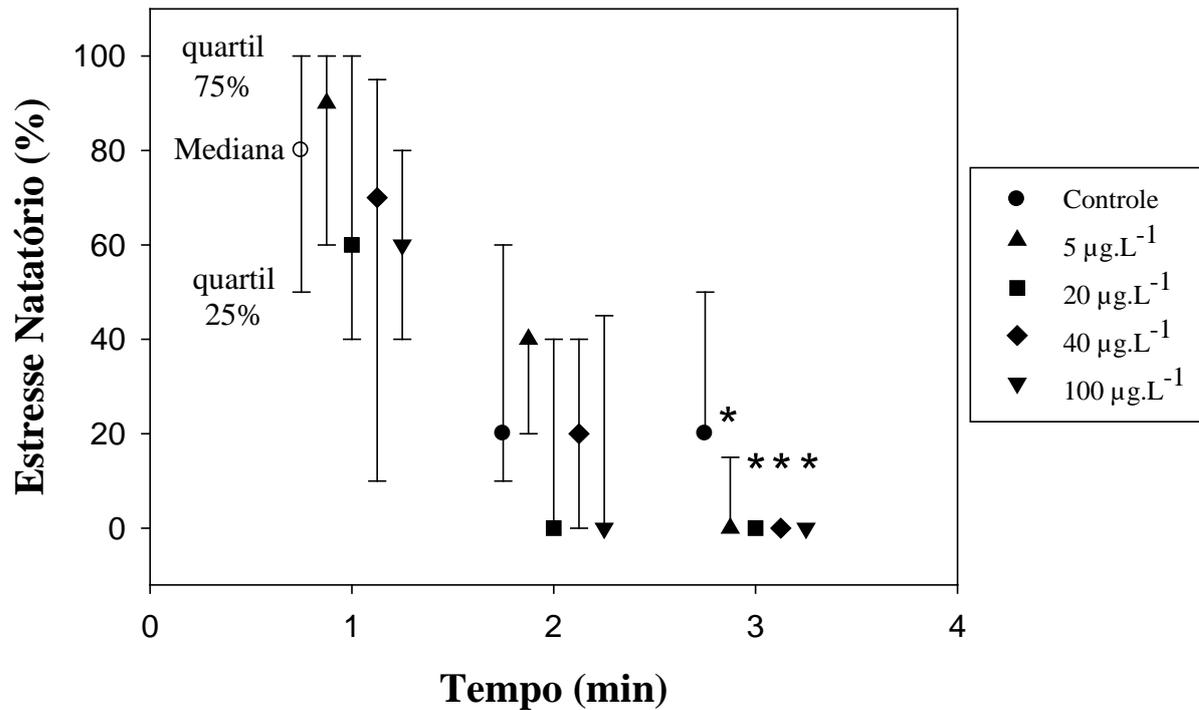
Encontrou-se para a concentração letal de 50% de cobre para os juvenis de *Poecilia vivipara* expostos ao cobre por 96 horas o valor de 327,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre em água com limites de confiança de 95% inferior igual a 270,9 e superior igual a 395,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre em água na salinidade 25 e pH 8,2.

#### 3.3.2 Reação de Alarme

##### 3.3.2.1 Frequência de Estresse Natatório

A frequência de ocorrência de estresse natatório nos indivíduos de *P. vivipara* diminuiu com o aumento do tempo transcorrido desde a introdução da substância de alarme em todos os tratamentos (Figura 7). Os juvenis expostos ao cobre exibiram uma tendência de perda da resposta de estresse natatório comparados com o controle, baseada na análise do primeiro ( $H_{(4)} = 3,4$ ;  $p = 0,5$ ) e do segundo minuto ( $H_{(4)} = 5,3$ ;  $p = 0,3$ ) após a introdução do extrato de pele. No terceiro minuto a mediana do percentual de peixes exibindo a resposta em cada grupo de cinco peixes foi igual a 20% no controle, caindo para 0%, 0%, 0% e 0% nas respectivas concentrações de cobre de 5, 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , valores diferentes estatisticamente do controle. A concentração de efeito observado (CEO) para frequência de estresse natatório foi igual a 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre.

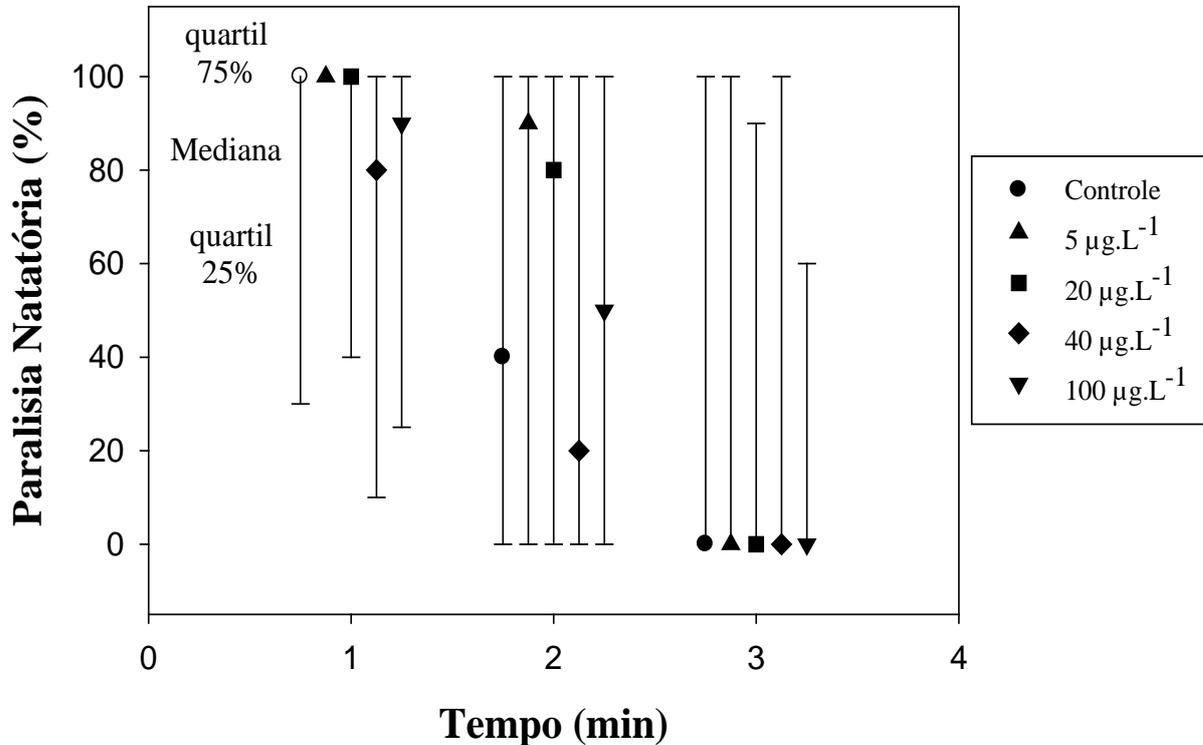
**Figura 7** – Frequência de estresse natatório em *Poecilia vivipara* expostos por 96 horas ao cobre, em função do tempo transcorrido desde a introdução da substância de alarme. O asterisco (\*) indica a concentração de cobre cuja frequência de estresse difere do controle (Kruskal-Wallis;  $H(4) = 20,5$ ;  $p < 0,001$ ; Dunn,  $p < 0,05$ ). Controle  $n = 13$  grupos de cinco indivíduos (65 indivíduos); Concentrações de cobre 5, 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$   $n = 12, 13, 12$  e 8 grupos de cinco indivíduos (60, 65, 60 e 40 indivíduos), respectivamente.



### 3.3.2.2 Paralisia Natatória

A frequência de ocorrência de paralisia natatória nos indivíduos de *P. vivipara* não apresentou uma diminuição nas concentrações de cobre quando comparados com o controle (Figura 8).

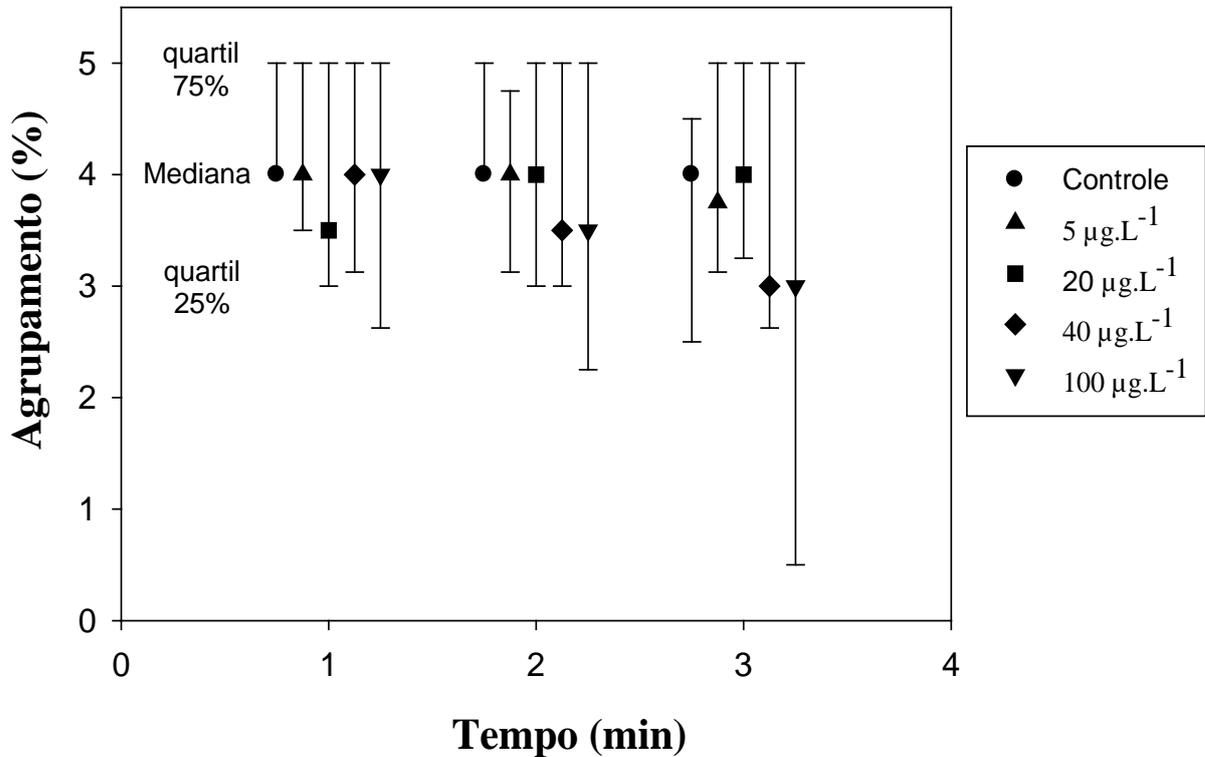
**Figura 8** – Frequência de paralisia natatória em *P. vivipara* expostos por 96 horas ao cobre, em função do tempo transcorrido desde a introdução da substância de alarme. Controle n = 13 grupos de cinco indivíduos (65 indivíduos); Concentrações de cobre 5, 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  n = 12, 13, 12 e 8 grupos de cinco indivíduos (60, 65, 60 e 40 indivíduos), respectivamente.



### 3.3.2.3 Agrupamento

O índice de ocorrência do agrupamento nos indivíduos de *P. vivipara* reduziu com o aumento do tempo de exposição ao extrato de pele em todas as concentrações de cobre desde a sua entrada no aquário teste com os cinco peixes (Figura 9). Os juvenis expostos ao cobre exibiram uma diminuição da resposta de agrupamento comparados com o controle. Após a introdução da substância de alarme no primeiro ( $H_{(4)} = 1,3$ ;  $p = 0,9$ ) e segundo minuto ( $H_{(4)} = 1,9$ ;  $p = 0,8$ ) o controle apresentou uma mediana com 80% dos indivíduos agrupados. Para os juvenis expostos ao cobre nas concentrações de 5, 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a mediana do índice de agrupamento para o segundo minuto foi de 80%, 80%, 70%, e 70%, respectivamente. Para o terceiro minuto ( $H_{(4)} = 4,4$ ;  $p = 0,4$ ) o controle continuou apresentando uma mediana de 80% de agrupamento dos indivíduos, e o índice de agrupamento caiu para 60% nas concentrações de 40  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre.

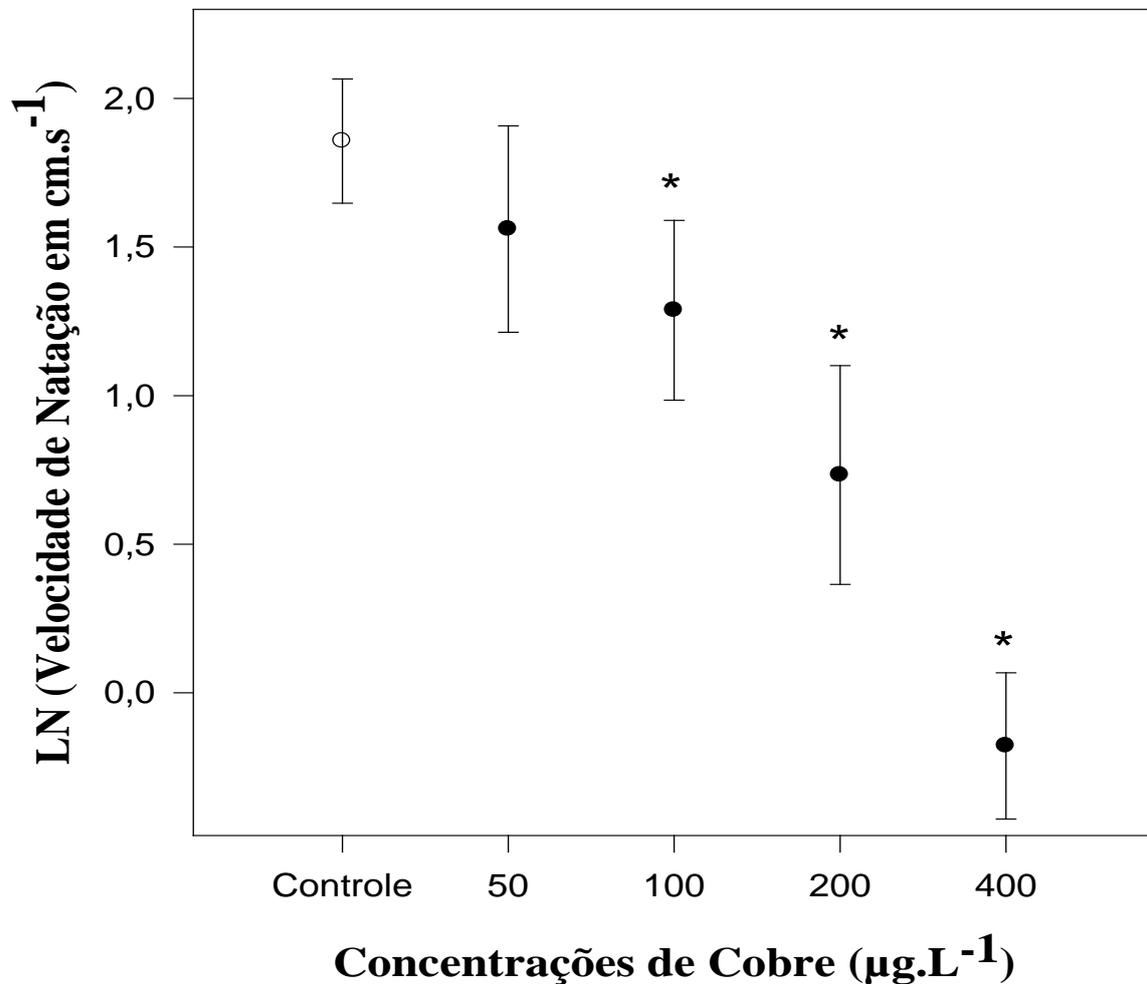
**Figura 9** – Índice de agrupamento em *P. vivipara* expostos por 96 horas ao cobre, em função do tempo transcorrido desde a introdução da substância de alarme. Controle n = 13 grupos de cinco indivíduos (65 indivíduos); Concentrações de cobre 5, 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  n = 12, 13, 12 e 8 grupos de cinco indivíduos (60, 65, 60 e 40 indivíduos), respectivamente.



### 3.3.3 Atividade natatória espontânea

A atividade natatória espontânea dos peixes expostos ao cobre diminuiu (Figura 10). Estando os dados normalizados por Log Natural (LN), os indivíduos do grupo controle apresentaram para uma média de 1,9 para velocidade média de natação de  $6,8 \text{ cm.s}^{-1}$  e observou-se um decréscimo significativo de 1,3 para  $4,0 \text{ cm.s}^{-1}$  em  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ , de 0,7 para  $2,4 \text{ cm.s}^{-1}$  em  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  e de -0,2 para  $0,8 \text{ cm.s}^{-1}$  em  $400 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre (Anova I,  $p < 0,001$ ,  $F_{4,67} = 32,6$ ; Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ). A concentração de efeito observado (CEO) para velocidade de natação espontânea foi igual a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre.

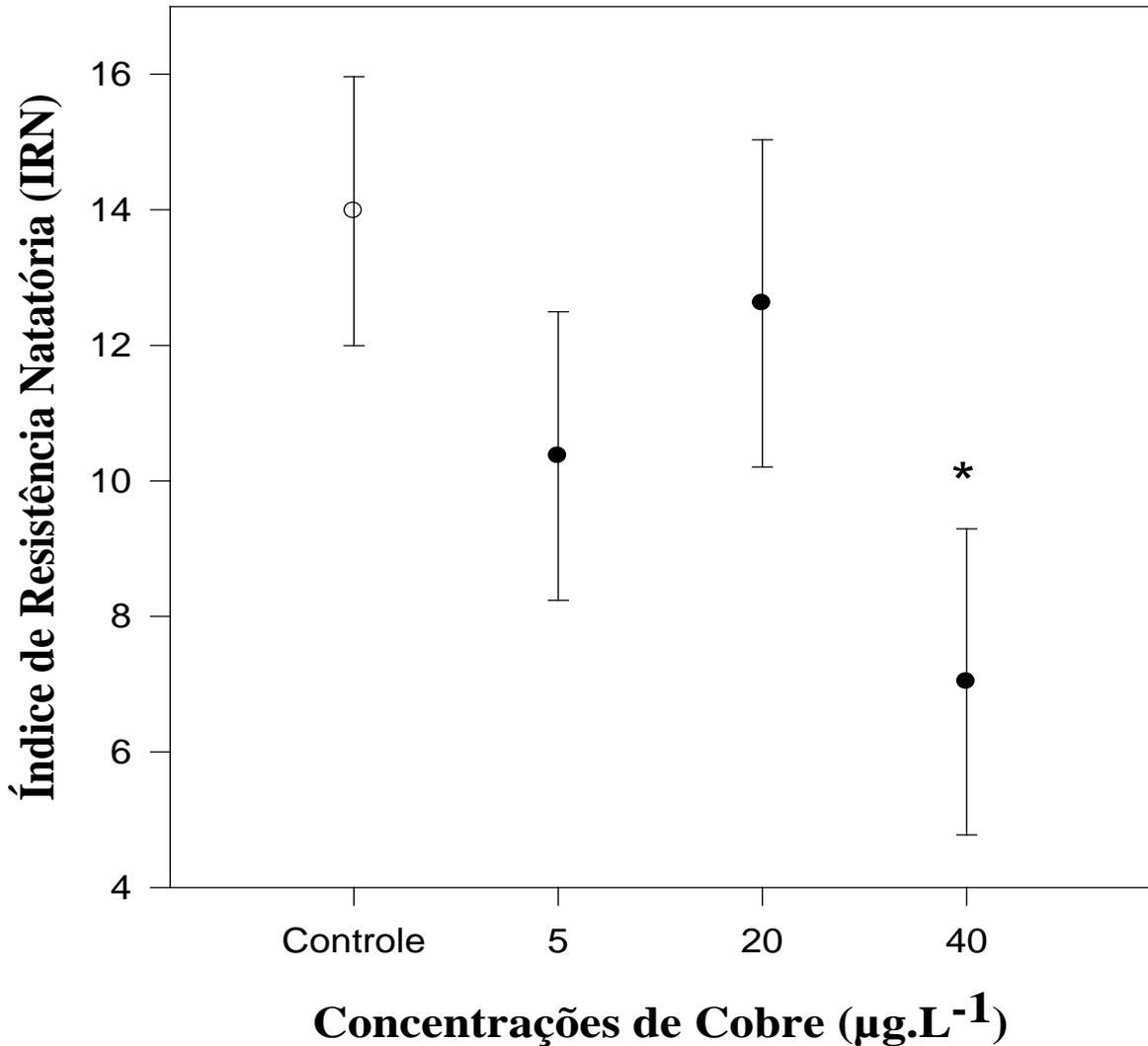
**Figura 10** – Log Natural da Velocidade de Natação (média  $\pm$  95% de confiança) dos juvenis de *P. vivipara* após 96 horas de exposição ao cobre. O asterisco (\*) indica a concentração de cobre que diferiu estatisticamente do controle (Anova I,  $p < 0,001$ ,  $F_{4,67} = 32,6$ ; Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ); Controle  $n = 16$ ; Concentrações de cobre 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$   $n = 14, 12, 14$  e  $12$ , respectivamente.



### 3.3.4 Resistência natatória

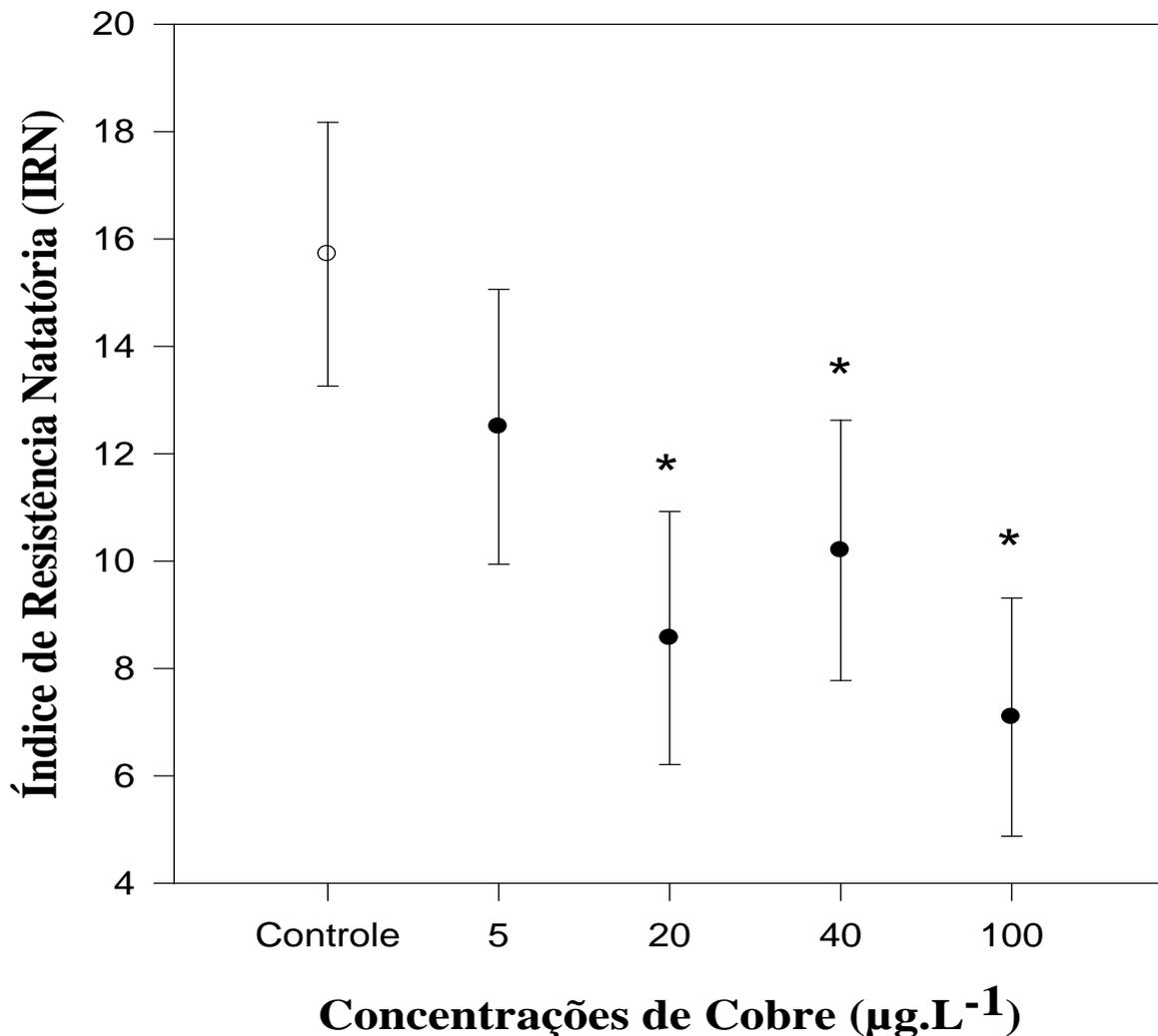
O Índice de Resistência Natatória (IRN) que revela a capacidade dos indivíduos nadarem contra uma corrente diminuiu nos peixes expostos ao cobre em dois experimentos realizados. No primeiro experimento os peixes foram expostos ao cobre por 120 horas, e o controle apresentou um IRN de 14, diminuindo para 10,4, 12,6 e 7,0 nos peixes expostos às concentrações de 5, 20 e 40  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre, respectivamente (Figura 11). Encontrou-se uma diferença estatística significativa na resistência natatória para a concentração de cobre de 40  $\mu\text{g.L}^{-1}$  quando comparado com o controle (Anova I,  $p < 0,001$ ,  $F_{3,158} = 7,8$ , Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

**Figura 11** – Índice de Resistência Natatória (média  $\pm$  95% de confiança) para os juvenis de *P. vivipara* após 120 horas de exposição ao cobre (Anova I,  $p < 0,001$ ,  $F_{3-158} = 7,8$ ). O asterisco (\*) indica a concentração de cobre que diferiu estatisticamente do controle (Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ); Controle  $n = 40$ ; Concentrações de cobre 5, 20 e 40  $\mu\text{g.L}^{-1}$   $n = 39, 40$  e 40, respectivamente.



No segundo experimento (Figura 12), em que os peixes foram expostos ao cobre por 144 horas, o IRN para os peixes controle foi de 15,7, diminuindo para 12,5, 8,5, 10,2, 7,1 nos peixes expostos as concentrações de 5, 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre, respectivamente. O IRN para as concentrações de 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  foram estatisticamente diferentes do controle. (Anova I,  $p < 0,001$ ,  $F_{4-193} = 8,2$ , Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ). A concentração de efeito observado (CEO) para o índice de resistência natatória foi igual a 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre.

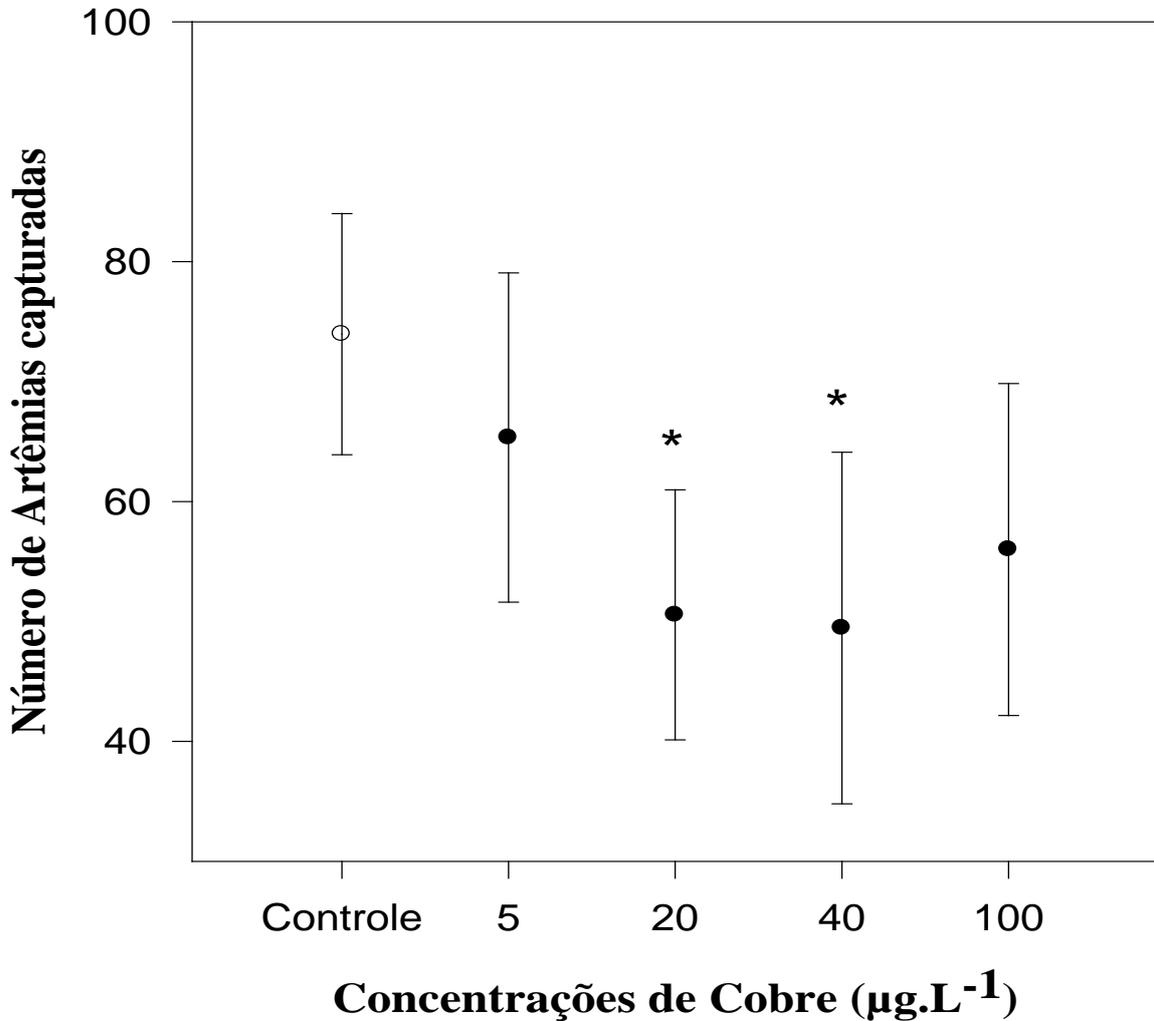
**Figura 12** – Índice de Resistência Natatória (média  $\pm$  95% de confiança) para os juvenis de *P. vivipara* após 144 horas de exposição ao cobre (Anova I,  $p < 0,001$ ,  $F_{4,193} = 8,2$ ). O asterisco (\*) indica a concentração de cobre que diferiu estatisticamente do controle (Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ); Controle  $n = 40$ ; Concentrações de cobre 5, 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$   $n = 36, 40, 40$  e 38, respectivamente.



### 3.3.5 Captura de presas

Os indivíduos de *P. vivipara* expostos a concentrações crescentes de cobre apresentaram um decréscimo no número de náuplios de artêmia capturados. Enquanto os peixes do tratamento controle ingeriram uma média de 74 artêmias, os expostos às concentrações de 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre ingeriram uma média de 50, 49 e 56 artêmias respectivamente (Figura 13). As médias para os tratamentos de 20 e 40  $\mu\text{g.L}^{-1}$  apresentaram uma diferença estatística significativa com relação ao controle, e a CEO foi igual a 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre (Anova I,  $p = 0,022$ ,  $F_{4,97} = 3,0$ , Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

**Figura 13** – Número de náuplios de artêmia com 48 horas pós-eclosão capturadas (média  $\pm$  95% de confiança) pelos juvenis de *P. vivipara* após 120 horas de exposição ao cobre (Anova I,  $p = 0,022$ ,  $F_{4,97} = 3,0$ ). O asterisco (\*) indica a concentração de cobre que diferiu estatisticamente do controle (Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ); Controle  $n = 20$ ; Concentrações de cobre 5, 20, 40 e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$   $n = 18, 20, 20$  e 20, respectivamente.



### 3.4 DISCUSSÃO

#### 3.4.1 CL50-96h do cobre

O cobre é um elemento que se liga facilmente aos organismos e bioacumula em órgãos como as brânquias, trato intestinal e sistemas sensoriais (SORENSEN, 1991), podendo causar toxicidade aguda e letalidade em peixes. A concentração de cobre que causa letalidade em 50% dos juvenis de *P. vivipara* em 96 horas foi igual a  $327,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ , ligeiramente abaixo do valor médio para outras espécies de peixes marinhos, que varia de  $60 \mu\text{g Cu/L}$  para o *Onchorhynchus tshawytscha* a  $1690 \mu\text{g Cu/L}$  para o *Rivulus marmoratus*, com uma média  $\pm$

desvio padrão de  $588,1 \pm 548 \mu\text{g.L}^{-1}$  (WHO, 1998). Para a espécie *Pomatoschistus microps*, não incluída na revisão acima, a CL50 (96h) é de  $568,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (VIEIRA ET AL., 2009).

A CL50 (96h) para peixes de água doce varia de  $2,58 \mu\text{g Cu/L}$  para larvas do *Thymallus arcticus* a  $7340 \mu\text{g Cu/L}$  para juvenis do *Lepomis macrochirus*, com uma média  $\pm$  desvio padrão de  $2108,9 \pm 3164,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ . A espécie mais sensível ao cobre dissolvido é de água doce, conforme esperado pelo poder protetor dos cloretos na água do mar, mas a média da CL50 (96h) para peixes de água doce é significativamente superior que a média para peixes marinhos acima, e verifica-se, portanto que há uma grande variação de sensibilidade ao cobre dentro dos peixes de água doce.

### 3.4.2 Reação de Alarme

Para a espécie *P. vivipara* após a exposição ao metal cobre nas concentrações de 5, 20, 40 e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  durante 96 h, foi reduzida sua resposta de alarme em relação ao extrato de pele após 3 minutos deste ser adicionado na água, quando a reação de alarme é avaliada com base na frequência de estresse natatório. Enquanto que, para a espécie *O. kisutch* após a exposição ao cobre nas concentrações de 2, 5, 10 e  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  durante 3 h, quando a reação de alarme foi avaliada com base na paralisia natatória pela diminuição da velocidade de natação, esta mostrou uma redução da resposta ao extrato de pele (SANDAHL ET AL., 2007).

O olfato de peixes é bastante sensível para detecção de substâncias químicas na água, permitindo fazer a distinção entre indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes (IDE ET AL., 2003; LURLING E SCHEFFER, 2007; VOLPATO ET AL., 2006). Deste modo os peixes conseguem distinguir o que pode vir a ser seu alimento e caçá-lo, ou o que pode ser um predador e se evadir dele (HONDA ET AL., 2008).

Metais pesados, em especial o cobre, causam necrose nas células do epitélio olfatório e indução de apoptose celular em várias espécies de peixes (BETTINI ET AL., 2006; CARRANZA-ROSALES ET AL., 2005; DE OLIVEIRA RIBEIRO ET AL., 2002; JULLIARD ET AL., 1996; SCOTT ET AL., 2003). Análises histológicas realizada por Bettini e colaboradores (2006) no peixe *Tilapia mariae* expostos a concentração de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre revelaram um dano extensivo no epitélio olfatório, e processos degenerativos em todos os tipos celulares.

Respostas neurofisiológicas de neurônios receptores olfativos são prejudicadas em apenas 10 minutos de exposição ao cobre (BALDWIN ET AL., 2003). A exposição à

concentração subletal de cobre de  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  por 96 horas apresenta sinais de degeneração de neurônios receptores olfativos (BETTINI ET AL., 2006), tornando o tecido incapaz de manter a função olfatória (SAUCIER AND ASTIC, 1995).

### 3.4.3 Atividade natatória espontânea

Neste trabalho os juvenis de *P. vivipara* exibiram uma evidente hipoatividade nos indivíduos expostos ao cobre, semelhante a Vieira et al. (2009) para o peixe *Pomatoschistus microps* que mostrou um comportamento natatório letárgico quando exposto a  $400 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre em 96 horas.

A avaliação do comportamento natatório, incluindo a atividade natatória espontânea e a resistência natatória, é uma das repostas comportamentais que mais têm sido utilizadas nos estudos de investigações toxicológicas em peixes buscando observar os efeitos causados por concentrações subletais de contaminantes, inclusive metais (LITTLE E FINGER, 1990; TRIEBSKORN ET AL., 1994; ZHOU E WEIS, 1998).

A atividade natatória pode ser medida através da frequência e duração de movimentos, da velocidade de natação, da distância percorrida e da posição na coluna de água. Devido a sua fácil avaliação se tornou um consistente indicador de toxicidade nas diferentes espécies de peixe nas mais variadas condições ambientais (LITTLE E FINGER, 1990). A consequência ecológica da mudança no comportamento natatório pela exposição subletal a contaminantes é o prejuízo na migração, na habilidade do peixe em se alimentar, fugir de predadores e reproduzir (LITTLE E FINGER, 1990), sendo potencialmente grave para a sobrevivência dos indivíduos, e para o futuro das populações (ALVAREZ E FUIMAN, 2006).

O fator preponderante que causa a hipoatividade em peixes expostos ao cobre ainda é questionado. Beaumont et al. (1995) sugerem que o cobre ao entrar em contato com o tecido branquial em concentrações tóxicas causa um espessamento lamelar e aumento da distância de difusão branquial, o que dificultaria trocas gasosas pelos distúrbios osmorregulatórios associados à inibição de alguns mecanismos de transporte iônico de membrana. Outra hipótese é que o cobre causa um acúmulo de amônia no organismo causando uma hiperamonemia que pode reduzir a habilidade natatória devido ao prejuízo na coordenação eletrofisiológica da função muscular (BEAUMONT ET AL., 2000). Outra hipótese é que o cobre aumenta a viscosidade do sangue interferindo na habilidade dos peixes extraírem

oxigênio do ambiente e transportar no sistema circulatório, sendo o fornecimento de oxigênio para os tecidos um fator limitante de peixes expostos ao metal (BEAUMONT ET AL., 2000).

#### 3.4.4 Resistência natatória

O *P. vivipara* exibiu uma redução na resistência natatória quando os indivíduos foram expostos a concentração de 20, 40 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre, mostrando-se mais sensível que outros peixes. Resposta semelhante foi observada por Viera et al., (2009) para a espécie de peixe estuarino *P. microps* expostos ao cobre nas concentrações de 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  onde houve um decréscimo significativo na resistência natatória.

Para o *C. carpio* e *Carassius auratus gibelio* a exposição a 1 $\mu\text{M}$  de cobre causou um decréscimo na resistência natatória, de 31% e 13% após 12 horas de exposição, respectivamente (DE BOECK ET AL., 2006). Para *O. mykiss* uma redução na resistência natatória foi encontrada a partir de 24 horas de exposição ao cobre (DE BOECK ET AL., 2006), sendo que a exposição aguda em 105  $\mu\text{g.L}^{-1}$  diminuiu 86% de sua capacidade (WASER ET AL., 2009), e na exposição crônica em 75  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a redução foi de 88% (MCGEER ET AL., 2000).

A resistência natatória reflete a habilidade do peixe nadar sustentado contra um fluxo de água em velocidades crescentes (LITTLE E FINGER, 1990). A adequada habilidade natatória é um comportamento fundamental para a sobrevivência das espécies de peixes, por estar relacionada à capacidade alimentar, fuga de predadores, à reprodução e migração (NIKL E FARRELL, 1993; VIEIRA ET AL., 2009; ZHOU E WEIS, 1998). A habilidade natatória é um sensível indicador de toxicidade subletal para ampla variedade de espécies expostas a diferentes contaminantes químicos sob condições diversas (LITTLE AND FINGER, 1990).

As hipóteses relatadas anteriormente para a redução da atividade natatória espontânea também são sugeridas para o decréscimo da resistência natatória. Na hipótese em que o cobre causa dano branquial observa-se que trabalhos prévios correlacionam o efeito do comportamento natatório com as alterações na brânquia (BEAUMONT ET AL., 1995; DE BOECK ET AL., 2006; NIKL E FARRELL, 1993; VAN HEERDEN ET AL., 2004).

As brânquias para os animais aquáticos exercem função respiratória, excretória e de regulação iônica. São as principais vias de entrada dos contaminantes e se classificam como um ligante biótico na acumulação de metais (MARTINS, 2008; ROMÉO ET AL., 1994).

Tipicamente encontra-se uma relação dose-resposta em que quanto maior a exposição ao contaminante, maior é o efeito no epitélio branquial (NIKL E FARRELL, 1993).

Metais pesados causam consideráveis mudanças na estrutura das brânquias. Como alterações pode-se listar a diminuição da distância interlamelar, fusão lamelar, aumento da distância de difusão sangue-água, espessamento da camada de muco, necrose celular e ruptura de células na lamela (BEAUMONT ET AL., 1995; MALLATT, 1985; NIKL E FARRELL, 1993; SKIDMORE E TOVELL, 1972; WILSON E TAYLOR, 1993; WOOD, 2001). Estes processos interferem na respiração e ionorregulação diminuindo a área disponível para trocas gasosas (DE BOECK ET AL., 2007; GROSELL E WOOD, 2002; HANDY, 2003; JEWELL ET AL., 2000; MCGEER ET AL., 2000; WOOD, 2001), e conseqüentemente reduzindo a resistência natatória e aumentando o consumo de oxigênio (BEAUMONT ET AL., 1995; DE BOECK ET AL., 2006; NIKL E FARRELL, 1993; VAN HEERDEN ET AL., 2004).

As distâncias interlamelar e a distância de difusão sangue-água são efeitos branquiais frequentemente mensurados para avaliar efeitos de contaminantes. Para juvenis de salmonídeos expostos a 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole a distância entre as lamelas foram reduzidas a 74%, e a distância de difusão sangue-água nas brânquias foram aumentadas para 276% com relação aos peixes controle (NIKL E FARRELL, 1993). Para o *Prochilodus scrofa* e *Oreochromis mykiss* exposto ao cobre por 96 e 24 horas respectivamente, foram encontrados efeitos semelhantes de elevação epitelial, aumento da espessura epitelial da distância de difusão sangue-água (CERQUEIRA E FERNANDES, 2002; DAGLISH E NOWAK, 2002; DANG ET AL., 2000A; DANG ET AL., 2000B; VAN HEERDEN ET AL., 2004).

Uma associação parece existir entre as perturbações observadas na estrutura branquial e reduções na resistência natatória, representando uma limitação na capacidade de transferência de oxigênio (DANG ET AL., 2000a; MALLATT, 1985; NIKL E FARRELL, 1993; SEMENZA, 2001; VAN HEERDEN ET AL., 2004). Entretanto, Waser e colaboradores (2009) não encontraram um aumento da distância de difusão sangue-água como causa da diminuição da resistência natatória pela exposição do *O. mykiss* ao cobre e sugerem que a diminuição da habilidade natatória seja causada pelo aumento da produção de amônia pela exposição ao cobre.

Na hipótese sugerida por Beaumont et al. (2000), a acumulação do íon amônio no músculo como resultado da exposição ao cobre, causa interferência no nervo central periférico

pela substituição do íon potássio pelo íon amônio (WASER ET AL., 2009), que resulta na despolarização da membrana de células musculares, com a alteração da transmissão de sinais de excitação/contração neuromuscular que ocasiona rapidamente a fadiga (SHINGLES ET AL., 2001).

Beaumont et al. (2000) revela uma ausência no efeito na capacidade de transferência de oxigênio, já que a truta em altas velocidades de natação utiliza-se do metabolismo anaeróbico para gerar energia (BURGETZ ET AL., 1998), não se limitando a absorção de distribuição do meio aquático para as brânquias. Portanto, a diminuição da resistência natatória que é causada pela exposição ao cobre pode ser causada por outros efeitos do cobre que afetam o epitélio branquial.

### **3.4.5 Captura de presas**

Uma diminuição da atividade natatória espontânea foi verificada nos peixes expostos ao cobre, o que pode ter levado à uma diminuição da taxa de encontro entre os predadores expostos (juvenis de *P. vivipara*) e os náuplios de *Artemia sp.* oferecidos, gerando uma menor ingestão dos indivíduos expostos ao cobre.

Para que ocorra um sucesso na captura de presas, o indivíduo necessita do bom funcionamento de diversos sistemas, entre eles o olfato e a natação descrita neste trabalho. Através do olfato o peixe distingue condições ambientais que permite identificar uma possível presa, enquanto a boa habilidade natatória permite que durante a caça o indivíduo alcance de modo eficiente seu alimento.

A exposição a metais em muitas espécies de peixes apresenta um efeito tóxico no comportamento alimentar causando a redução do consumo do alimento (SANDHEINRICH E ATCHISON, 1990). Em peixes expostos ao cobre, uma variedade de alterações comportamentais e fisiológicas são observadas como a perda de apetite e redução do crescimento (DE BOECK ET AL., 1995; MCGEER ET AL., 2000). A hipoatividade nos peixes pode reduzir a taxa de alimentação pela diminuição da taxa de encontro, alterando a alimentação e o crescimento dos mesmos (ZHOU E WEIS, 1998).

### 3.5 CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos no presente estudo conclui-se que a exposição a concentrações subletais de cobre na faixa de 5 a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  causa alterações no comportamento dos juvenis de *P. vivipara* relativos ao sistema sensorial olfatório, habilidades natatórias e de captura de presas. As alterações na reação de alarme, que simulam defesa a um ataque de predador, foram afetadas com maior intensidade com base na frequência de estresse natatório em todas as concentrações de cobre, sendo o parâmetro mais sensível, com uma concentração de efeito observado (CEO) de 5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . As CEO para velocidade de natação, resistência natatória e habilidade para captura de presas foram iguais a 100, 20 e 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente. Esta espécie tem se mostrado sensível a alterações comportamentais após a exposição ao cobre. Estes efeitos sugerem que possa ter havido modificações nos epitélios olfatórios e branquial ocasionado pelo cobre, o que merece ser investigado.

## REFERÊNCIAS

- Adam, M.L., Torres, R.A., Sponchiado, G., Motta, T.S., Oliveira, C.M.R., Carvalho-Filho, M.A., Correia, M.T.S., 2010. Environmental Degradation at a Public Park in Southern Brazil as Revealed Through a Genotoxicity Test (MN) on Peripheral Blood Cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). *Water Air Soil Pollut* 211, 61-68.
- Alsop, D., Wood, C.M., 2011. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across multiple metals. *Aquatic Toxicology* 105, 385-393.
- Alvarez, M.D.C., Fuiman, L.A., 2006. Ecological performance of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of the insecticide malathion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1426-1432.
- Amaral, M.C., Bonecker, A.C.T., Ortiz, C.H.D., 2001. Activity Determination of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase and Mg<sup>++</sup> - ATPase Enzymes in the Gill of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes) in Different Salinities. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44, 1-6.
- Araújo, E.J.A., Morais, J.O.R., Souza, P.R., Sabóia-Morais, S.M.T., 2001. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Acta Scientiarum* 23, 391-399.
- Atchinson, G.J., Henry, M.G., Sandheinrich, M.B., 1987. Effects of metals on fish behavior: a review. *Environmental Biology of Fishes* 18, 11-25.
- Baatrup, E., Bayley, M., 1998. Animal locomotor behaviour as a health biomarker of chemical stress. *Archives of Toxicology - Supplement* 20, 163-178.
- Baldwin, D.H., Sandhal, J.F., Labenia, J.S., Scholz, N.L., 2003. Sublethal effect of copper on coho salmon: impacts on nonoverlapping receptor pathways in the peripheral olfactory nervous system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2266-2274.
- Barak, N.A.E., Manson, C.F., 1990. Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from Eastern England. *The Science of the Total Environment* 92, 257-263.
- Barbieri, E., 2004. Emprego de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) e *Artemia salina* (Crustacea) para determinar a toxicidade aguda da água de produção de petróleo em Sergipe, Brasil. *Biologia Geral e Experimental* 5, 26-29.
- Beamish, F.W.H., 1966. Swimming endurance of some northwest Atlantic fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 23, 341-347.
- Beamish, F.W.H., 1978. Swimming capacity, in: Hoar, W.S., Randall, J.D. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, pp. 101-187.
- Beaumont, M.W., Butler, P.J., Taylor, E.W., 1995. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to sub-lethal copper concentrations in soft acidic water and its effect upon sustained swimming performance. *Aquatic Toxicology* 33, 45-63.

- Beaumont, M.W., Butler, P.J., Taylor, E.W., 2000. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. *Aquatic Toxicology* 51, 259-272.
- Bettini, S., Ciani, F., Franceschini, V., 2006. Recovery of the olfactory receptor neurons in the African *Tilapia mariae* following exposure to low copper level. *Aquatic Toxicology* 76, 321–328.
- Beyers, D.W., Farmer, M.S., 2001. Effects of copper on olfaction of *Colorado pikeminnow*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 907-912.
- Bianchini, A., Martins, S.E.G., Basso-Jorge, M., 2009. O modelo do Ligante Biótico e suas aplicações em ecotoxicologia.
- Bidone, E.D., Laybauer, L., Castilhos, Z.C., Maddock, J.L., 2001. Environmental risk increase due to heavy metal contamination caused by a copper mining activity in Southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 73, 277-286.
- Bila, D.M., Montalvão, A.F., Silva, A.C., Dezotti, M., 2005. Ozonation of a landfill leachate: evaluation of toxicity removal and biodegradability improvement. *Journal of Hazardous Materials B117*, 235-242.
- Blanchard, J., Grosell, M., 2005. Effects of salinity on copper accumulation in the Common Killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1403-1413.
- Boock, M.V., Machado-Neto, J.G., 2000. Estudos toxicológicos do oxiclreto de cobre para tilápia vermelha (*Oreochromis sp.*). *Arquivos do Instituto de Biologia de São Paulo* 67, 215-221.
- Bose, R., 2005. A System for Tracking and Movement Analysis of Laboratory Animals Based on Image Processing. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* 21, 61-72.
- Brown, G.E., Godin, J.J., 1999. Chemical alarm signals in wild Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Zoology* 77, 562-570.
- Burgetz, I.J., Rojas-Vargas, A., Hinch, S.G., Randall, D.J., 1998. Initial recruitment of anaerobic metabolism during sub-maximal swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 201, 2711–2721.
- Cairns, J., 1966. Don't be half safe - the current revolution in bioassay techniques, *Proceedings of the 21st Industrial Waste Conference*. Engineering Bulletin Purdue University, pp. 559-567.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology* 5, 327-336.
- Carranza-Rosales, P., Said-Fernandez, S., Sepulveda-Saavedra, J., Cruz-Vega, D.E., Gandolfi, A.J., 2005. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology* 210, 111-121.

Carvalho, C.S., Selistre-de-Araujo, H.S., Fernandes, M.N., 2004. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 137, 225-234.

Cavas, T., Garanko, N.N., Arkhipchuk, V.V., 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology* 43, 569-574.

Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, 83-91.

Clark, J., Dickson, K., Giesy, J., Lackey, R., Mihaich, E., Stahl, R., Zeeman, M., 1999. Using reproductive and developmental effects data in ecological risk assessments for oviparous vertebrates exposed to contaminants, in: Di Giulio, R.T., Tillitt, D.E. (Eds.), *Reproductive and developmental effects of contaminants in oviparous vertebrates*. SETAC, Pensacola, Florida, U.S.A., pp. 366-401.

CONAMA, 1986. Resolução nº 20, de 30 de julho. Diário Oficial da União.

CONAMA, 2005. Resolução nº 357, de 17 de março. Diário Oficial da União.

Connon, R.E., Beggel, S., D'Abronzio, L., Geist, J.P., Pfeiff, J., Loguinov, A.V., Vulpe, C.D., Werner, I., 2011. Linking molecular biomarkers with higher level condition indicators to identify effects of copper exposure on the endangered Delta smelt (*Hypomesus transpacificus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 290-300.

Cross, S.A., Sunda, W.G., 1982. The relationship between chemical speciation and bioavailability of trace metals to marine organisms: a review, in: FURG (Ed.), *Proceedings of International Symposium on Utilization of Coastal Ecosystems: Planning, Pollution and Productivity*. FURG, Rio Grande, pp. 169-182.

Daglish, R.W., Nowak, B.F., 2002. Rainbow trout gills are a sensitive biomarker of short-term exposure to waterborne copper. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 98-102.

Dang, Z., Balm, P.H.M., Flik, G., Wendelaar-Bonga, S.E., Lock, R.A., 2000a. Cortisol increases Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater Tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Biology* 203, 2349-2355.

Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., Wendelaar-Bonga, S.E., 2000b. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *Journal of Experimental Biology* 203, 379-387.

De Boeck, G., Hattink, J., Franklin, N.M., Bucking, C.P., Wood, S., Walsh, P.J., Wood, C.M., 2007. Copper toxicity in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*): Urea loss contributes to the osmoregulatory disturbance. *Aquatic Toxicology* 84, 133-141.

- De Boeck, G., Ngo, T.T.H., Van Campenhout, K., Blust, R., 2003. Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. *Aquatic Toxicology* 65, 413-424.
- De Boeck, G., Nilsson, G.E., Elofsson, U., Vlaeminck, A., Blust, R., 1995. Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. *Aquatic Toxicology* 33, 265-277.
- De Boeck, G., van der Ven, K., Hattink, J., Blust, R., 2006. Swimming performance and energy metabolism of rainbow trout, common carp and gibel carp respond differently to sublethal copper exposure. *Aquatic Toxicology* 80, 92-100.
- De Oliveira Ribeiro, C.A., Belger, L., Pelletier, E., Rouleau, C., 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research* 90, 217-225.
- De Schampelaere, K.A.C., Heijerick, D.G., Janssen, C.R., 2002. Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting copper toxicity to *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology e Pharmacology* 133, 243-258.
- Depledge, M.H., Aagaard, A., Gyorkos, R., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31, 19-27.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergmann, H.L., Meyer, J.S., Santore, R.C., Paquin, P., 2000. The Biotic Ligand Model: A computational approach for assessing the ecological effects of copper and other metals in aquatic systems. International Copper Association, New York.
- Drever, J.I., 1988. The geochemistry of natural waters, 2 ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Duboc, L.F., 2007. Análise comparativa e aspectos ecológicos da reação de alarme em duas espécies de *Mimagoniates* (Ostariophysi, Characidae, Glandulocaudinae). *Revista Brasileira de Zoologia* 24, 1163-1185.
- Erickson, R.J., Nichols, J.W., Cook, P.M., Ankley, G.T., 2008. Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems, in: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 9-54.
- Evans, B.I., Fernald, R.D., 1990. Metamorphosis and fish vision. *Journal of Neurobiology* 21, 1037-1052.
- Falcão, E.C.S., 2007. Estrutura da comunidade de formas iniciais de peixes em uma gamboa do estuário do rio Catuama, Pernambuco - Brasil, *Oceanografia*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 78.
- Fischer, L.G., Pereira, L.E.D., Vieira, J.P., 2004. Peixes estuarinos e costeiros. Editora Ecoscientia, Rio Grande.

- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., Garric, J., 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 145-153.
- Fuiman, L.A., Rose, K.A., Cowan-Jr, J.H., Smith, E.P., 2006. Survival skills required for predator evasion by fish larvae and their relation to laboratory measures of performance. *Animal Behaviour* 71, 1389-1399.
- Giaquino, P.C., Volpato, G.L., 2001. Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to conspecific skin extract pintado catfish. *Behaviour* 138, 1205-1214.
- González, M.E., Blánquez, M.J., Rojo, C., 1996. Early gill development in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Morphology* 229, 201–217.
- Green, W.W., Mirza, R.S., Wood, C.M., Pyle, G.G., 2010. Copper Binding Dynamics and Olfactory Impairment in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology* 44, 1431-1437.
- Grosell, M., Wood, C.M., 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *Journal of Experimental Biology* 205, 1179-1188.
- Hall, L.W., Anderson, R.D., 1999. A Deterministic Ecological Risk Assessment for Copper in European Saltwater Environments. *Marine Pollution Bulletin* 38, 207-218.
- Hamdani, E.H., Doving, K.B., 2007. The functional organization of the fish olfactory system. *Progress in Neurobiology* 82, 80-86.
- Hamdani, E.H., Kasumyan, A., Doving, K.B., 2001. Is feeding behaviour in crucian carp mediated by the lateral olfactory tract? . *Chemical Senses* 26, 1133–1138.
- Hamdani, E.H., Stabell, O.B., Alexander, G., Doving, K.B., 2000. Alarm reaction in the crucian carp is mediated by the medial bundle of the medial olfactory tract. *Chemical Senses* 25, 103–109.
- Handy, R.D., 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 135, 25-38.
- Hansen, J.A., Marr, J.C.A., Lipton, J., Cacula, D., Bergman, H.L., 1999a. Differences in neurobehavioral responses of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper and cobalt: Behavioral avoidance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1972-1978.
- Hansen, J.A., Woodward, D.F., Little, E.E., Delonay, A.J., Bergman, H.L., 1999b. Behavioral avoidance: Possible mechanism for explaining abundance and distribution of trout species in a metal-impacted river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 313-317.

- Honda, R.T., Fernandes-de-Castilho, M., Val, A.L., 2008. Cadmium-induced disruption of environmental exploration and chemical communication in matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Aquatic Toxicology* 89, 204-206.
- Hussain, 2011. The olfactory nervous system of terrestrial and aquatic vertebrates, *Nature Precedings*. <http://hdl.handle.net/10101/npre.2011.6642.1>.
- Ide, L.M., Urbinati, E.C., Hoffmann, A., 2003. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. *Journal of Fish Biology* 63, 332-343.
- Ihering, R.V., 1938. Cyprinodontiformes brasileiros, sistemática e morfologia biológica. *Archives Institute of Biology São Paulo* 4, 243-270.
- Jeffery, W.G., 2001. *A World of Metals: Finding, Making, and Using Metals*, 2 ed. International Council on Metals in the Environment, Ottawa.
- Jesus, H.C., Costa, E.A., Mendonça, A.S.F., Zandonade, E., 2004. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória - ES. *Química Nova* 27, 378-386.
- Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, M., Bauer, C., Wenger, R.H., Gassmann, M., 2000. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB Journal* 15, 1312-1314.
- Jones, S.B., King, L.B., Sappington, L.C., Dwyer, F.J., Ellersieck, M., Buckler, D.R., 1998. Effects of carbaryl, permethrin, 4-nonylphenol, and copper on muscarinic cholinergic receptors in brain of surrogate and listed fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 120, 405-414.
- Julliard, A.K., Saucier, D., Astic, L., 1996. Time-course of apoptosis in the olfactory epithelium of rainbow trout exposed to a low copper level. *Tissue Cell* 28, 367-377.
- Kane, A., Salierno, J.D., Brewer, S.K., 2005. Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives, in: Ostrander, G. (Ed.), *Methods in Aquatic Toxicology*. Lewis, Boca Raton, Florida, U.S.A., pp. 559-590.
- Karan, V., Vitorovic, S., Tutundzic, V., Poleksic, V., 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40, 49-55.
- Kariuki, S., Morra, M.J., Umiker, K.J., Cheng, I.F., 2001. Determination of total ionic polysulfides by differential pulse polarography. *Analytica Chimica Acta* 442, 277-285.
- Larsen, B.K., Portner, H.O., Jensen, F.B., 1997. Extra- and intra-cellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. *Marine Biology* 128, 337-346.
- Libes, S.M., 1992. *An introduction to Marine Biogeochemistry*. John Wiley and Sons, New York.

- Little, E., Brewer, S.K., 2001. Neurobehavioral toxicity in fish, in: Schlenck, D., Benson, W.H. (Eds.), Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. Taylor e Francis, London, pp. 141-176.
- Little, E., Finger, S., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 13-19.
- Lurling, M., Scheffer, M., 2007. Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 374–379.
- Machado, W., Moscatelli, M., Rezende, L.G., Lacerda, L.D., 2002. Mercury, zinc, and copper accumulation in mangrove sediments surrounding a large landfill in southeast Brazil. *Environmental Pollution* 120, 455–461.
- Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42, 630-648.
- Mansour, S.A., Sidky, M.M., 2002. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. *Food Chemistry* 78, 15-22.
- Martins, S.E.G., 2008. Acumulação e toxicidade do cobre em animais de praias arenosas do extremo sul do Brasil, *Oceanografia*. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, p. 148.
- Matsuo, A.Y.O., Wood, C.M., Val, A.L., 2005. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology* 74, 351-364.
- Mattos, J.J., Siebert, M.N., Luchmann, K.H., Granucci, N., Dorrington, T., Stoco, P.H., Grisard, E.C., Bainy, A.C.D., 2010. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. *Marine Environmental Research* 69, 31-33.
- Mazet, A., Keck, G., Berny, P., 2005. Concentrations of PCBs, organochlorine pesticides and heavy metals (lead, cadmium, and copper) in fish from the Drôme river: Potential effects on otters (*Lutra lutra*). *Chemosphere* 61, 810-816.
- McGeer, J.C., Szebedinsky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Ionoregulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology* 50, 231-243.
- Meffe, G.K., Snelson Jr, F.F., 1989. An ecological overview of poeciliid fishes, in: Snelson Jr., F.F., Meffe, G.K. (Eds.), *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*. Prentice Hall, New Jersey, pp. 13-32.
- Melo, F.R.M., 2011. Avaliação dos efeitos do hidrocarboneto aromático fenantreno e do metal cobre em juvenis do peixe *Poecilia vivipara*, *Zoologia*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 49.

- Mendonça, J.P., Andreatta, J.V., 2001. Aspectos reprodutivos de *Poecilia vivipara* (Bloch & Schneider) (Poeciliidae) da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 18, 1041-1047.
- Mirza, R.S., Green, W.W., Connor, S., Weeks, A.C.W., Wood, C.M., Pyle, G.G., 2009. Do you smell what I smell? Olfactory impairment in wild yellow perch from metal-contaminated waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 677-683.
- Moreira-Santos, M., Donato, C., Lopes, I., Ribeiro, R., 2008. Avoidance tests with small fish: Determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1576-1582.
- Nascimento, R.S.S., Gurgel, H.C.B., 2000. Estrutura populacional de *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801 (Atheriniformes, Poeciliidae) do rio Ceará-Mirim - Rio Grande do Norte. *Acta Scientiarum* 22, 415-422.
- Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*, 4 ed. Wiley, London.
- Nikl, D.L., Farrell, A.P., 1993. Reduced swimming performance and gill structural changes in juvenile salmonids exposed to 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole. *Aquatic Toxicology* 27, 245-264.
- Nordell, S.E., 1998. The response of female guppies, *Poecilia reticulata*, to chemical stimuli from injured conspecifics. *Environmental Biology of Fishes* 51, 331-338.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: Role of complexation, pH, and water hardness. *Environmental Science & Technology* 17, 342-347.
- Pais, I., Jones Jr., J.B., 1997. *The Handbook of trace elements*. St. Lucie Press, Florida.
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hogstrand, C., Janssen, C.R., McGeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., Wu, K.B., 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 133, 3-35.
- Parks, R., Donnier-Marechal, M., Frickers, P.E., Turner, A., Readman, J.W., 2010. Antifouling biocides in discarded marine paint particles. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1226-1230.
- Paulo, D.V., Fontes, F.M., Flores-Lopes, F., 2012. Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. *Brazilian Journal of Biology* 72, 131-140.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Collier, T.K., 2003. *Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish*, in: Douben, P.E.T. (Ed.), *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*. Wiley, Bedford, pp. 191-224.

- Pedrozo, M.F.M., Lima, I.V., 2001. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos, in: Pedrozo, M.F.M., Lima, I.V. (Eds.), *Cadernos de Referência Ambiental*. Centro de Recursos Ambientais, Salvador, Brasil.
- Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Bainy, A.C.D., Carvalho, P.S.M., 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquatic Toxicology* 105, 312– 320.
- Phillips, D.J.H., 1980. *Quantitative Aquatic Biological Indicators*. London Applied Science Publishers, London.
- Plaut, I., 2001. Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 131, 41-50.
- Pyle, G.G., Mirza, R.S., 2007. Copper-Impaired Chemosensory Function and Behavior in Aquatic Animals. *Human and Ecological Risk Assessment* 13, 492-505.
- Rand, G.M., 2008. Fish Toxicity Studies, in: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., pp. 659-681.
- Reidy, S.P., Kerr, S.R., Nelson, J.A., 2000. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod. *Journal of Experimental Biology* 203, 347-357.
- Ribeiro, A.J.S., 2001. Balanço mineral brasileiro: Cobre, in: Mineral, D.N.d.P. (Ed.). MME, Brasil, Brasília.
- Robinson, P.D., 2009. Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, 1179-1188.
- Rodrigues, L.H.R., Arenzon, A., Raya-Rodriguez, M.T., Fountoura, N.F., 2003. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de ensaios de toxicidade crônica. *Biociências* 11, 137-144.
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48, 185-194.
- Roméo, M., Mathieu, A., Gnassia-Barelli, M., Romana, A., Lafaurie, M., 1994. Heavy metal content and biotransformation enzymes in two fish species from the NW Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* 107, 15-22.
- Sabóia-Morais, S.M.T., Saldiva, P.H.N., Silva, J.R.M.C., Yamada, A.T., Aloia, T.P.A., Hernandez-Blazquez, F.J., 2011. Adaptation of the gill epithelium of an euryhaline fish, the guppy (*Poecilia vivipara*), to freshwater. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 48, 5-13.
- Saglio, P., Bretaud, S., Rivot, E., Olsen, K.H., 2003. Chemobehavioral changes induced by short-term exposures to prochloraz, nicosulfuron, and carbofuran in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 515-524.

- Sandahl, J.F., Baldwin, D.H., Jenkins, J.J., Scholz, N.L., 2007. A sensory system at the interface between urban stormwater runoff and salmon survival. *Environmental Science & Technology* 41, 2998–3004.
- Sandheinrich, M.B., Atchison, G.J., 1990. Sublethal toxicant effects on fish foraging behavior: empirical vs. mechanistic. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 107–119.
- Saucier, D., Astic, L., 1995. Morpho-functional alterations in the olfactory system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and possible acclimation in response to long-lasting exposure to low copper levels. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 112, 273-284.
- Scheffer, E.W.O., 2006. Dinâmica e comportamento do cobre em ambientes aquáticos urbanos: Influência de fatores geoquímicos e de sulfetos solúveis, Química. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 95.
- Schlenk, D., Benson, W.H., 2001. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts, London.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., Rouleau, C., Wood, C.M., 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 206, 1779–1790.
- Semenza, G.L., 2001. HIF-1, O<sub>2</sub>, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107, 1–3.
- Sheehan, P.J., 1984. Effects on Individuals and Populations, in: Sheehan, P.J., Miller, D.R., Butler, G.C., Bourdeau, P. (Eds.), *Effects of Pollutants at the Ecosystem Level*. John Wiley and Sons, New York, pp. 23-50.
- Shingles, A., McKenzie, D.J., Taylor, E.W., Moretti, A., Butler, P.J., Ceradini, S., 2001. Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 204, 2691–2698.
- Skidmore, J.F., Tovell, P.W.A., 1972. Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. *Water Research* 6, 217-230.
- Smith, R.J.F., 1992. Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2, 33–63.
- Sorensen, E.M.B., 1991. *Metal Poisoning in Fish*. CRC, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- Tierney, K.B., 2011. TOXICOLOGY | The Effects of Toxicants on Olfaction in Fishes, in: Anthony, P.F. (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology*. Academic Press, San Diego, pp. 2078-2083.

- Tierney, K.B., Baldwin, D.H., Harac, T.J., Ross, P.S., Scholz, N.L., Kennedy, C.J., 2010. Olfactory toxicity in fishes. *Aquatic Toxicology* 96, 2-26.
- Triebkorn, R., Kohler, H.-R., Kortje, K.-H., Negele, R.-D., Rahmann, H., Braunbeck, T., 1994. Evaluation of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II. Ultrastructural diagnosis and tin localization by energy filtering transmission electron microscopy (EFTEM). *Aquatic Toxicology* 30, 199-213.
- Van Gestel, C.A.M., Brumelen, V., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.
- van Heerden, D., Vosloo, A., Nikinmaa, M., 2004. Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1- $\alpha$ ) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 69, 271-280.
- Vazzoler, A.E.A., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76, 1416-1427.
- Volpato, G.L., Castro, A., Freitas, E.G., Giaquinto, P.C., Castilho, M.F., Da Silva, E.M.P., Jordão, L.C., 2006. *Comunicação química em peixes*. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal.
- von Sperling, M., 1998. Análise dos padrões brasileiros de qualidade de corpos d'água e de lançamento de efluentes líquidos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos* 3, 111-132.
- Waiwood, K.G., Beamish, F.W.H., 1978. Effects of copper, pH and hardness on the critical swimming performance of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Water Research* 12, 611-619.
- Walker, G.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2005. *Principles of Ecotoxicology*, 3 ed. Taylor and Francis, London.
- Waser, W., Bausheva, O., Nikinmaa, M., 2009. The copper-induced reduction of critical swimming speed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is not caused by changes in gill structure. *Aquatic Toxicology* 94, 77-79.
- Weis, J.S., Samson, J., Zhou, T., Skurnick, J., Weis, P., 2001. Prey capture ability of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a behavioral biomarker for contaminants in estuarine systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 1442-1452.
- Weis, J.S., Samson, J., Zhou, T., Skurnick, J., Weis, P., 2003. Evaluating prey capture by larval mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a potential biomarker for contaminants. *Marine Environmental Research* 55, 27-38.
- Weis, J.S., Weis, P., 1989. Tolerance and stress in a polluted environment: the case of the mummichog. *BioScience* 39, 89-95.

- Wells, J.B., Little, E.E., Calfee, R.D., 2004. Behavioral response of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to forest fire-retardant chemicals in the laboratory. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 621-625.
- Weltzien, F., Hoglund, E., Hamdani, E.H., Doving, K.B., 2003. Does the lateral bundle of the medial olfactory tract mediate reproductive behavior in male crucian carp? *Chemical Senses* 28, 293-300.
- WHO, 1998. *Environmental Health Criteria 200: Copper*. World Health Organization, Geneva.
- Wilson, R.W., Taylor, E.W., 1993. Differential responses to copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to seawater and brackish water. *Journal of Comparative Physiology B - Biochemical, systemic and environmental physiology* 163, 239-246.
- Wood, C.M., 2001. Toxic responses of the Gill, in: Schlenck, D., Benson, W.H. (Eds.), *Target organs toxicity in marine and freshwater teleosts*. Taylor & Francis, London, pp. 1-89.
- Wood, C.M., 2012. An Introduction to Metals in Fish Physiology and Toxicology: Basic Principles, in: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Academic Press, London, pp. 1-51.
- Woodward, D., Hansen, J., Bergman, E., Little, E., Delonay, A., 1995. Brown trout avoidance of metals in water characteristic of the Clark Fork River, Montana. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 2031-2037.
- Yonkos, L.T., Fisher, D.J., Reimschuessel, R., Kane, A.S., 2000. Atlas of fathead minnow normal histology, in: <http://aquaticpath.umd.edu/fhm> (Ed.). University of Maryland Aquatic Pathobiology Center.
- Ytreberg, E., Karlsson, J., Eklund, B., 2010. Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti-fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater. *Science of The Total Environment* 408, 2459-2466.
- Zagatto, P.A., 2006. *Ecotoxicologia*. RIMA, São Carlos.
- Zhou, T., Weis, J.S., 1998. Swimming behavior and predator avoidance in three populations of *Fundulus heteroclitus* larvae after embryonic and/or larval exposure to methylmercury. *Aquatic Toxicology* 43, 131-148.