

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

Flávio Roberto Mendonça de Melo

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO HIDROCARBONETO AROMÁTICO
FENANTRENO E DO METAL COBRE EM JUVENIS DO PEIXE *POECILIA*
VIVIPARA

RECIFE
2011

FLÁVIO ROBERTO MENDONÇA DE MELO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO HIDROCARBONETO
AROMÁTICO FENANTRENO E DO METAL COBRE EM JUVENIS
DO PEIXE *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. Carvalho

RECIFE
2011

Melo, Flávio Roberto Mendonça de

Avaliação dos efeitos do hidrocarboneto aromático fenantreno e do metal cobre em juvenis do peixe *Poecilia vivipara* Flávio Roberto Mendonça de Melo. – Recife: O Autor, 2011.

49 folhas: il., fig.

Orientador: Paulo S. M. Carvalho

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia Animal, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Peixe-efeito da poluição da água 2. Fenantreno 3. Cobre I. Título.

597 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-156

FLÁVIO ROBERTO MENDONÇA DE MELO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO HIDROCARBONETO
AROMÁTICO FENANTRENO E DO METAL COBRE EM JUVENIS
DO PEIXE *POECILIA VIVIPARA*.

Defendida em: 28/02/2011

BANCA EXAMINADORA:

[Redacted]

Dr. Antonio Souto
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Zoologia

[Redacted]

Dra. Lilia Pereira de Souza Santos
Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Oceanografia.

[Redacted]

Dra. Eliete Zanardi Lamardo
Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Oceanografia.

Dr. Rodrigo Augusto Torres (Suplente interno)
Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Zoologia.

Dra. Mônica Lúcia Adam (Suplente externo)
Universidade Federal de Pernambuco,
Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão.

O temor do Senhor é o princípio
da sabedoria, e o conhecimento
do Santo a prudência.Pv. 9:11

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a grande oportunidade de obter mais uma conquista.

Ao meu orientador, Professor Paulo Carvalho, por partilhar seus importantes conhecimentos, seus momentos de criação, me conduzir no mundo científico e ajudar na execução deste trabalho

Aos parceiros do laboratório de ecotoxicologia aquática (LABECOTOX), Brito, Gaby, Priscila, Flor, Ju, Kika e Mari vocês foram e são muito importantes para mim, sem vocês seria bem mais difícil.

A minha esposa, obrigado por sua cumplicidade e compreensão nos dias difíceis, mas são esses dias que nos dão experiência para estarmos cada vez mais unidos.

Aos meus pais, pela confiança e apoio contínuo, com vocês sei que posso ir mais longe.

A minha irmã, por sua grande amizade e por criar a figura do teste de resistência contra-corrente, você é uma designer nata.

Aos familiares, amigos, e a todos aqueles que tive que ficar longe durante este período, obrigado pelo incentivo.

A FACEPE, pelo incentivo à pesquisa científica.

Aos professores e pesquisadores da UFPE, por me darem a oportunidade de me tornar um profissional melhor.

RESUMO

Juvenis do peixe estuarino *Poecilia vivipara* foram expostos em experimentos semi-estáticos ao hidrocarboneto policíclico aromático fenantreno, e ao metal pesado cobre. Após 96 h de exposição dos peixes às concentrações de 2,5, 10, 50, 100, e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno e 5, 20, 40, 100, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre foram avaliados os efeitos subletais sobre biomarcadores comportamentais quantificados individualmente nos peixes. Os peixes foram monitorados com um sistema de vídeo digital em arenas experimentais, e foi quantificada a velocidade de natação em cm s^{-1} durante atividade natatória espontânea e durante atividade natatória sob estímulo de náuplios de *Artemia* oferecidos como presas. Neste mesmo experimento com presas disponíveis foi quantificado o número de náuplios capturados. Além disso, foi avaliada a resistência natatória contra-corrente dos peixes expostos através de um sistema experimental desenvolvido durante este trabalho. Para os peixes expostos ao fenantreno também foi quantificada a acuidade visual baseada nas respostas optocinéticas. A atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis diminuiu com a exposição dos peixes ao fenantreno, apresentando diferença estatística entre as velocidades médias ($p < 0,001$). Foi detectado um déficit na acuidade visual, e na quantidade de presas capturadas pelos peixes expostos ao fenantreno, existindo diferença estatística para ambos parâmetros entre o controle e a concentração de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes resultados demonstram que a exposição de *P.vivipara* às concentrações subletais de fenantreno alteraram sua habilidade visual e capacidade de capturar presas, apesar de não ter-se percebido modificação da resistência natatória. Por outro lado, nos peixes expostos ao cobre não foram detectadas diferenças significativas na natação espontânea, natação durante a alimentação com *Artemia* e na captura de náuplios. Entretanto, houve diminuição da resistência natatória entre os peixes expostos ao cobre a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle, o que pode influenciar na habilidade destes indivíduos em estabelecer posição adequada em habitats em situações de corrente adversas durante o fluxo das marés em estuários onde esta espécie habita.

Palavras-chave: *Poecilia vivipara*. Fenantreno. Cobre. Comportamento.

ABSTRACT

Juveniles of the estuarine fish *Poecilia vivipara* were exposed in semi-static experiments to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene, and to the metal copper. After a 96 h exposure of the fish to the concentrations of 2.5, 10, 50, 100, and 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ phenanthrene, and 5, 20, 40, 100, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ copper, sublethal effects were evaluated based on behavioral biomarkers individually quantified in the exposed fish. Fish were monitored with a digital video system in experimental arenas, and swimming speed in s^{-1} was measured during spontaneous swimming activity, and during swimming activity under the stimulus of *Artemia* nauplii offered as prey. During this experiment with *Artemia* the actual number of captured nauplii was quantified. Additionally, the counter-current swimming resistance of the exposed fish was quantified with an experimental system developed during this study. For fish exposed to phenanthrene, visual acuity based on optokinetic responses was also quantified. Swimming speed under the stimulus of available prey diminished after fish were exposed to phenanthrene, and statistical differences were detected between average speeds ($p < 0.001$). A deficit in visual acuity and in the amount of captured prey was detected in fish exposed to phenanthrene, with statistical differences for both parameters between control and 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ exposed fish. These results show that sublethal exposure of *P. vivipara* to phenanthrene can alter its visual ability and capacity to capture prey, although no effect was detected on swimming resistance. On the other hand, no effects were detected on spontaneous swimming, swimming during *Artemia* feeding or on *Artemia* capture rates for fish exposed to copper. However, a decrease in swimming resistance was detected on fish exposed to copper at 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ and the controls, what can influence the ability of these individuals in establishing adequate position in habitats under the influence of strong currents, as during tide flows in estuaries where this species is found.

Keywords: *Poecilia vivipara*. Phenanthrene. Copper. Behavior.

SUMÁRIO

1. Introdução e Fundamentação Teórica.....	9
1.1 Fontes de Contaminação Aquática e características gerais do fenantreno e cobre.....	9
1.2 A Ecotoxicologia e as diferentes medidas de efeito biológico dos contaminantes	11
1.3 Biomarcadores comportamentais e sua aplicação com peixes na Ecotoxicologia	13
1.3.1 Visão	15
1.3.2 Natação	15
1.3.3 Resistência natatória	16
1.3.4 Captura de presas	18
2. Objetivos.....	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos.....	20
3. Material e Métodos	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Qualidade da água.....	21
3.3 Preparação das soluções e sistema de exposição ao fenantreno e ao cobre	21
3.4 Exposição dos juvenis de <i>Poecilia vivipara</i> ao fenantreno e cobre.....	22
3.5 Avaliação das taxas de mortalidade.....	22
3.7 Atividade natatória espontânea.....	23
3.8 Atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis	23
3.9 Detecção e Captura de presas	24
3.10 Resistência natatória	24
3.11 Acuidade visual	26
3.12 Análises estatísticas	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Fenantreno	28
4.1.1 Atividade natatória espontânea.....	28
4.1.2 Atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis	29
4.1.3 Resistência natatória	30
4.1.4 Acuidade Visual.....	31
4.1.5 Detecção e Captura de presas	32
4.2.1 Atividade natatória espontânea.....	33
4.2.2 Atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis	34
4.2.3 Resistência natatória	35
4.2.4 Detecção e Captura de presas	36

5. DISCUSSÃO	37
5.1 Fenantreno	37
5.2 Cobre.....	40
6. Conclusões.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. Introdução e Fundamentação Teórica

1.1 Fontes de Contaminação Aquática e características gerais do fenantreno e cobre

Diversas atividades humanas são fonte potencial de contaminantes para os ecossistemas aquáticos. O lançamento de esgotos domésticos urbanos nos cursos de água é uma das mais conhecidas fontes de contaminação e que causam sérios problemas para a qualidade da água de mananciais em muitas cidades do mundo. Esta situação se agrava ainda mais quando esses efluentes são misturados com os de origem industrial, podendo apresentar riscos ainda mais sérios e de difícil controle e manejo, por causa da presença de compostos perigosos.

O petróleo é uma mistura complexa que contém muitas substâncias tóxicas como benzeno, tolueno, xileno, ácidos, fenóis, compostos com enxofre (sulfetos, tiois e tiofenóis) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (McLusky, 1995). A introdução destes compostos no ambiente marinho pode ocorrer tanto de forma espontânea, como durante a lavagem de tanques de navios, como de forma acidental, em derrames e petróleo. Parte destes compostos de volatilidade e hidrossolubilidade variável pode se dissolver na água do mar constituindo a Fração Solúvel do petróleo em Água (FSA) (Anderson et al., 1974). Os hidrocarbonetos são os mais importantes e quantitativamente os principais constituintes do petróleo, e são aqueles que acarretam os maiores efeitos negativos ao ambiente (McLusky, 1995). Podem ser divididos em alifáticos, alicíclicos e aromáticos. Dentre os compostos encontrados na FSA, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são os que possuem o maior poder danoso (McLusky, 1995). O fenantreno é um dos aromáticos tipicamente detectados em maiores concentrações na água de ambientes influenciados por atividades relacionadas à indústria petrolífera (Carls et al., 2002), sendo um poluente de significativa persistência ambiental.

Estudos revelam que os efeitos tóxicos atribuídos aos HPAs são os mais diversos, como alterações na morfologia de órgãos internos (Incardona et al., 2004) mudanças no metabolismo (Vieira et al., 2008) e comportamento (Gregg et al., 1997).

Devido a sua persistência ambiental e toxicidade, o fenantreno está entre o grupo de HPAs que causam maiores danos aos seres aquáticos. Dentre os modelos de toxicidade para estágios iniciais de desenvolvimento de peixes expostos a misturas

complexas de petróleo, a exposição ao fenantreno previa consistentemente a toxicidade para estágios jovens de salmão do pacífico e do arenque (Barron et al., 2004). De modo semelhante, foi detectada toxicidade em concentrações ambientalmente relevantes do fenantreno para estágios iniciais de desenvolvimento do dourado *Salminus brasiliensis*, quando a eficiência na captura de presas pelas larvas expostas foi reduzida (Carvalho et al., 2008). Cabe salientar que acidentes ambientais envolvendo a indústria do petróleo também podem ocorrer em águas interiores, como foi o caso dos Rios Barigui e Iguaçu, no Paraná, quando diversas espécies de peixes foram afetadas por um vazamento, e o fenantreno foi detectado em concentrações significativas na região de influência (Meniconi e Gabardo, 2002).

O cobre (Cu) é um elemento de significativa relevância social devido às suas características que permitem uma ampla aplicação do mesmo. O cobre é comercializado nas indústrias eletrolíticas, metalúrgicas, química, bélica, alimentícia, farmacêutica, na construção civil e na indústria dos transportes automobilístico, naval, aeronáutico e ferroviário, sendo também utilizado na agricultura como fungicida, inseticida e algicida.

O metal cobre, pode contaminar ambientes aquáticos na forma solúvel catiônica Cu^{+2} , pelo escoamento e/ou lixiviação a partir dos produtos em que entra na constituição, tanto na indústria como nos processos de mineração (Bidone, 2001).

Em consequência das restrições ao uso dos organoestânicos (Ytreberg et al., 2010) o cobre é atualmente um dos principais elementos constituintes das tintas anti-incrustantes utilizadas em embarcações, o que torna as áreas portuárias regiões de potencial contaminação aquática.

Estudos ecotoxicológicos demonstram que os efeitos do cobre em peixes não se limitam apenas à letalidade, podendo também interferir na fisiologia, metabolismo, e comportamento. Em experimentos recentes com exposição de peixes à concentrações subletais de cobre foi verificado que podem causar diminuição da resistência natatória de *Pomatoschistus microps* (Vieira et al., 2009), comprometimento da acuidade olfativa em *Pimephales promelas* (Green et al, 2010), morte de células da linha lateral de *Danio rerio* (Linbo et al., 2006) e alteração do desenvolvimento embriológico de *Danio rerio* (Johnson et al., 2007).

Por serem consideradas substâncias de persistência ambiental, estudos relacionados com seus efeitos letais e subletais geram informações de suma importância para órgãos de monitoramento e ramos da sociedade envolvidos com a proteção ambiental. Os resultados destes estudos permitem avaliar os riscos que estes químicos

podem causar ao ambiente, fatores preponderantes inclusive para tomada de ações políticas com objetivo de regular atividades antrópicas que utilizam estas substâncias. Estas ações integradas com as informações científicas podem fazer com que estes compostos químicos não causem alterações no equilíbrio dos ecossistemas, ou em alguns casos, diminuam sua interferência neste equilíbrio.

1.2 A Ecotoxicologia e as diferentes medidas de efeito biológico dos contaminantes

A Ecotoxicologia é uma ciência que integra os conceitos da Ecologia, disciplina que se ocupa das relações entre os seres vivos e o ambiente, também conceituada como o estudo do aproveitamento e da distribuição da energia no sistema, e da Toxicologia, que estuda os efeitos adversos de determinada substância num dado organismo e procura clarear o mecanismo de ação tóxica no mesmo.

Embora a Toxicologia e a Ecologia sejam duas ciências com estruturas e direcionamentos distintos, na Ecotoxicologia interagem-se com o objetivo de solucionar problemas de poluição ambiental (Zagatto e Bertoletti, 2006).

A Ecotoxicologia possui como principal paradigma a relação existente entre a dose que um ser vivo é exposto a um poluente e a resposta que este pode causar (paradigma dose-resposta). Segundo este pensamento todos os efeitos decorrentes da exposição a contaminantes ambientais se iniciam com uma interação deste contaminante com o denominado sítio de ação ou receptor, que pode ser tanto um conjunto de células como o tecido branquial em contato direto com a água ou uma molécula representada por uma enzima ou gene presente nas células de determinado tecido ou órgão.

Os efeitos de compostos químicos ambientais podem se propagar ao longo dos ecossistemas, desde níveis suborganísmicos, passando por respostas dos indivíduos como membros de populações, até respostas que caracterizam processos ecológicos que ocorrem ao nível de populações e comunidades dos diferentes ecossistemas (Souza e Carvalho, 2010). Biomarcadores são medidas destes efeitos dos contaminantes restritas ao nível do indivíduo, idéia que é melhor representada graficamente na Figura 1.

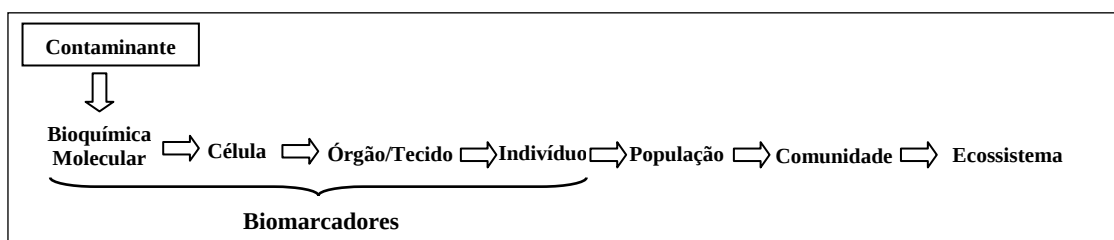


Figura 1- Níveis de organização biológica através dos quais os efeitos de um contaminante ambiental pode ser propagar, e sua relação com o conceito de biomarcadores. Fonte:(Souza e Carvalho, 2010).

Partindo deste princípio, ações com o objetivo de proteger as populações devem ser iniciadas buscando-se identificar os problemas causados pelos poluentes focando-se nos efeitos encontrados nos indivíduos, através dos biomarcadores.

O termo biomarcador tem origem na toxicologia humana e farmacologia, tendo sido incorporado à ecotoxicologia, onde se tornou palavra chave. A definição de biomarcadores tem passado por uma evolução desde o início de sua aplicação na ecotoxicologia, e a definição proposta por Walker no seu livro *Princípios de Ecotoxicologia* (Walker et al., 2005), e anteriormente proposta por Depledge et al. (1993) tem sido utilizada por muitos pesquisadores.

Segundo Walker (2005) biomarcadores são definidos como efeitos de compostos químicos variando de níveis subcelulares de organização biológica até o nível de indivíduos. Abrangem efeitos bioquímicos, fisiológicos, histológicos, morfológicos e comportamentais que caracterizem uma alteração com relação a uma situação em que a exposição química está ausente, e as respostas se encontram dentro da faixa homeostática normal dos organismos. Como exemplos de biomarcadores, podemos considerar desde efeitos bioquímicos como a indução de enzimas de biotransformação, mutações genéticas, alterações fisiológicas relacionadas a alterações metabólicas e ionorregulatórias, alterações histológicas na estrutura celular de tecidos específicos, deformidades morfológicas macroscópicas externas, até alterações comportamentais dos indivíduos afetados (Souza e Carvalho, 2010).

1.3 Biomarcadores comportamentais e sua aplicação com peixes na Ecotoxicologia

Os ambientes costeiros são um alvo fácil para contaminação com poluentes advindos das atividades humanas. Dentre muitos, o fenantreno e cobre merecem grande atenção tanto por suas propriedades tóxicas como pela facilidade de serem encontrados nos corpos d'água, seja por introdução por processos industriais como por acidentes ambientais com petróleo (Carls et al., 1999).

Os peixes representam um grupo de organismos aquáticos de significativa relevância para a sociedade, tanto por causa de aspectos econômicos, caso de pescarias comerciais, quanto ecológicos, por representarem o mais diverso grupo de vertebrados (Nelson, 2006), e exercerem as mais variadas funções dentro dos ecossistemas aquáticos (Gerking, 1994).

Algumas espécies de peixe, por serem importantes indicadores ambientais, são utilizados em estudos ecotoxicológicos, que buscam descobrir efeitos que os contaminantes podem causar nestes animais (Weis e Weis, 1989). As concentrações utilizadas nestes testes nem sempre chegam a causar letalidade, porém, efeitos subletais, tão importantes quanto os letais, são encontrados nos mais variados níveis de organização biológica. Os efeitos não letais são detectados desde níveis suborganísmicos, como a alteração a nível celular da estrutura de órgãos sensoriais, até o nível individual, onde são quantificados os efeitos comportamentais.

Os estágios da vida dos peixes em que se verifica maior sensibilidade ao estresse causado pela contaminação química são os períodos iniciais de desenvolvimento. Os efeitos neste momento do ciclo de vida influenciam o desenvolvimento, o crescimento, a forma e função dos indivíduos, possivelmente afetando o recrutamento da população, e conferindo aos estudos deste tipo significativa relevância ecológica (Weis e Weis, 1989; Fairbrother et al., 1999).

Na Figura 2 está esquematizado um modelo de recrutamento para peixes proposto por Lecher e al.,(1996), e neste esquema estão enfatizados os parâmetros comportamentais do efeito de contaminantes químicos possíveis de serem quantificados relacionados às habilidades sensoriais como a visão e habilidades motoras, por exemplo a capacidade de natação, ou combinações destas habilidades em processos mais complexos, como a captura de alimento e consequente crescimento.

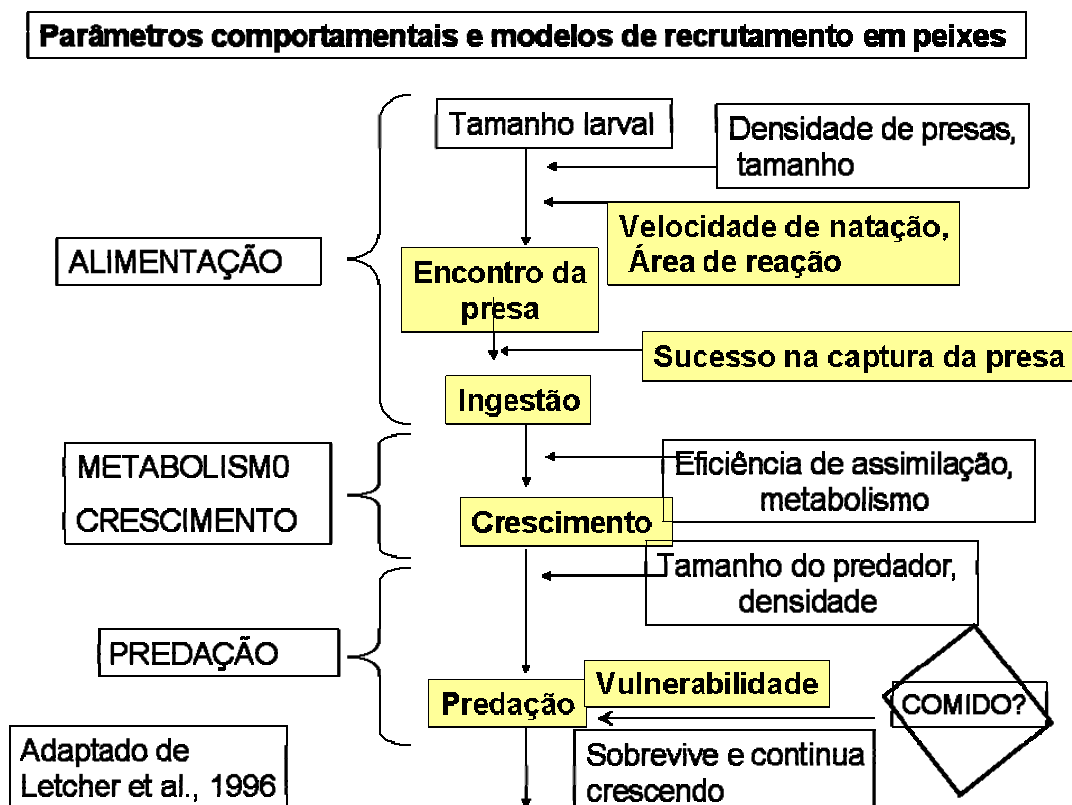


Figura 2 - Parâmetros comportamentais que podem ser quantificados para análise do risco da contaminação química afetar o recrutamento de recursos pesqueiros

Avanços recentes na tecnologia de automação de obtenção de imagens de vídeo e análise destas imagens tornaram possível um progresso significativo na facilidade, utilidade e custo de se obter, interpretar e aplicar parâmetros comportamentais em problemas ambientais específicos (Kane et al., 2004).

O comportamento associa a fisiologia e a ecologia de um organismo no seu ambiente, podendo ser representado por ações quantificáveis que operam através do sistema nervoso central e periférico (Little e Brewer, 2001), e estes parâmetros comportamentais quantificados a nível dos indivíduos são fundamentais, pois proporcionam ligações entre função fisiológica e processos ecológicos essenciais para a manutenção dos estoques pesqueiros e/ou da biodiversidade e (Scott e Sloman, 2004).

Biomarcadores comportamentais são a expressão de respostas integradas de vários níveis de organização biológica, sendo resultado de aspectos moleculares, fisiológicos e ecológicos da toxicologia. Um melhor entendimento dos efeitos toxicológicos nos sistemas naturais pode ser alcançado pela integração de parâmetros comportamentais de toxicidade com indicadores de outros níveis de organização (Scott e Sloman, 2004).

Além de possuírem grande nível de detalhamento os biomarcadores comportamentais conseguem identificar modificação no comportamento de um animal, desde uma simples alteração, restrita ao indivíduo, ou até mesmo causar modificação em suas interações sociais ou com o ambiente, como comportamento reprodutivo, territorialidade. Essas modificações podem ainda causar a exclusão da função ecológica destes animais, que apesar de estarem vivos, passam a não contribuir mais com o ambiente em que vivem ou mesmo com a manutenção da própria população (Scott e Sloman, 2004).

Estudos revelam que os biomarcadores comportamentais podem revelar os efeitos dos mais variados compostos químicos. Um exemplo recente envolveu o uso de parâmetros subletais de efeito do metilmercúrio em larvas da corvina atlântica *Micropogonias undulatus*, incluindo respostas natatórias de larvas a predadores artificiais, e cujos dados foram inseridos num modelo de coortes para larvas de peixes. Os resultados da simulação indicaram que o metilmercúrio poderia ter um efeito significativo na dinâmica de coortes da população, e que as características da relação predador-presa teriam papel significativo na causa dos efeitos previstos (Murphy et al., 2008; Alvarez et al., 2006).

Com relação a espécies brasileiras, a exposição de larvas de dourado *Salminus brasiliensis* ao fenantreno causou déficits na acuidade visual e na eficiência de captura de presas (Carvalho et al., 2008).

1.3.1 Visão

A visão, além de outros sistemas sensoriais, é importante tanto para a detecção e eventual captura e ingestão de presas no ambiente natural, como para a identificação de predadores. Em ambos os casos a visão pode influenciar na sobrevivência dos peixes, especialmente em estágios iniciais de desenvolvimento (Gerking, 1994).

A eficiência na procura e detecção, bem como a precisão no ataque e consequente captura de presas está diretamente relacionada com o refinamento da visão (Evans e Fernald, 1990).

1.3.2 Natação

A habilidade de mover-se é uma propriedade fundamental para muitos animais. É um dos comportamentos mais relevantes, e é um dos fatores principais em

importantes processos da vida como migração, territorialidade, reprodução, forrageamento, predação e respostas de fuga. Por essa razão, o comportamento locomotor contém uma riqueza de informações sobre o estado ecológico, fisiológico e toxicológico de um animal (Erik e Hayley, 1998), podendo ser de grande utilidade para a avaliação de efeitos tóxicos ecologicamente relevantes de contaminantes ambientais.

A atividade natatória individual, medida sem a influência da presença de outros indivíduos da mesma espécie ou de outras espécies tem sido utilizada em vários estudos como medida importante de monitoramento comportamental por ser influenciada por diversos tipos de compostos (Little et al., 1990). É um parâmetro comportamental altamente robusto que pode ser utilizado em diversas espécies expostas aos mais variados compostos químicos em diferentes condições experimentais (Saglio et al., 2003). A atividade natatória inclui muitas variáveis, como frequência e duração dos movimentos, velocidade e distância percorrida durante o movimento, a frequência e o ângulo das curvas, a posição na coluna d'água e a forma e padrão de nado. Modificações tóxicas relacionadas ao comportamento de natação geralmente ocorrem mais cedo e à concentrações menores do que as que levam a mortalidade, independentemente do tipo de comportamento avaliado (Little, 1990). Como as variáveis envolvidas com a natação estão inter-relacionadas, vários aspectos comportamentais de natação podem ser simultaneamente afetados por uma substância tóxica. Em estudos com truta arco-íris expostos à dioxina houve redução da frequência de atividade dos peixes, assim como alteração da postura de natação e do posicionamento na coluna de água (Mehrle et al., 1988). Por ser um indicador consistente de toxicidade subletal para uma grande variedade de espécies expostas a substâncias químicas diferentes, e sob várias condições (Little, 1990), a atividade natatória pode ser utilizada com segurança como biomarcador de efeitos ecotoxicológicos a nível comportamental em estudos que buscam elucidar os efeitos tóxicos dos poluentes.

1.3.3 Resistência natatória

A capacidade de natação ou resistência natatória é considerada um dos fatores principais na determinação da sobrevivência de muitas espécies de peixes e outros animais aquáticos. A maior parte dos peixes, na falta de outras armas contra predadores, utiliza a natação como sua principal forma de evitar e sobreviver ao ataque.

Além disso, supõe-se que o desempenho máximo de nado pode influenciar fortemente a capacidade de um peixe para obter comida, encontrar um parceiro reprodutivo, evitar condições desfavoráveis, e também vencer correntes de velocidade significativa durante o processo de migração (Erik Baatrup e Hayley, 1998).

A capacidade de natação de um peixe está diretamente relacionada com sua velocidade de natação. Utilizando esta relação a capacidade de natação é classificada em três categorias segundo as velocidades de natação: sustentada, prolongada e de explosão (Beamish, 1978).

A velocidade de natação sustentada é definida por velocidade baixa que pode ser mantida por um peixe durante longo período de tempo sendo este maior que 240 minutos (Beamish, 1966). A natação sustentada está relacionada com a via metabólica aeróbica. Esta velocidade de natação reduzida é mantida sem resultar em fadiga muscular, sendo utilizada para processos de migração, e pode ser acelerada para realização de atividades de rotina, como natação espontânea, forrageamento e exploração de território (Reidy et al., 2000).

A velocidade de natação prolongada, também está relacionada com a via metabólica aeróbica, mas é de menor duração do que a sustentada, menor que 240 minutos, sendo determinada ao ocorrer a exaustão dos peixes nesta faixa de tempo, quando expostos a correntes de água com velocidade quantificada (Beamish, 1966).

A velocidade de natação de explosão é a mais alta velocidade que os peixes são capazes de suportar, e só pode ser mantida por períodos curtos menores de até 60 segundos, estando relacionada com a via metabólica anaeróbica (Beamish, 1966).

A velocidade de explosão costuma ser utilizada pelos peixes em tentativas de captura de presas ou para fuga de um predador, e em qualquer situação de perturbação súbita (Reidy et al., 2000).

No habitat natural as velocidades de natação sustentada e prolongada são difíceis de serem separadas, pois raramente pode ser observada a fadiga em campo. Por outro lado, em um túnel de natação no laboratório, as velocidades de natação prolongada, sustentadas ou de explosão podem ser medidas com mais precisão, porque a velocidade que leva à exaustão pode ser mais facilmente determinada em função do tempo (Beamish, 1978). No entanto, alguns estudos concluíram que o cansaço é também é um comportamento do animal, e não só um fenômeno fisiológico, visto que a economia de energia pelo animal é uma fator de grande importância metabólica (Nelson, 1990).

Estudos revelaram que a exposição do peixe estuarino *Pomatoschistus microps* a contaminantes tóxicos como o cobre e o mercúrio levaram a uma mudança tanto no desempenho de natação sustentada como nos biomarcadores bioquímicos quantificados. A desregulação de função colinérgica e da capacidade de detoxificação, bem como as demandas energéticas adicionais decorrentes do estresse químico sugeridas pelos biomarcadores bioquímicos alterados parecem ter contribuído para o decréscimo da natação prolongada ou da resistência natatória demonstrando que existe uma estreita relação entre estes parâmetros (Vieira et al., 2009).

A capacidade de natação é um parâmetro comportamental importante que pode avaliar em diferentes condições ambientais os efeitos da exposição de peixes a poluentes na sua adaptabilidade aos habitats e na sua sobrevivência em um sistema ecológico. Desta forma, este de biomarcador comportamental é medida confiável e ecologicamente relevante (Plaut, 2001).

1.3.4 Captura de presas

O ato de capturar presas faz parte do comportamento de forrageamento de um animal, ação que está ligada ao uso de diversos fatores inclusive de órgãos sensoriais (Thetmeyer e Kils, 1995). Walker (2005), em seu livro, demonstra que durante o forrageamento, o animal além das percepções sensoriais, também se utiliza de ações determinantes, como encontrar, escolher, capturar, manipular e ingerir ou rejeitar a presa. Se essa sequência for seguida sem interferências ou alterações pode levar a captura de uma presa em tempo e forma corretas. No entanto, poluentes podem causar alterações nesse processo, levando a várias consequências como redução do forrageamento e a diminuição da aquisição de recursos. A Figura (4) detalha melhor como todo este processo pode ocorrer. Todos os componentes do forrageamento descritos na figura, como a eficiência da busca, a escolha da presa, o tempo desde a captura até a ingestão, podem ser afetados pelos poluentes.

Figura 4- Representação esquemática dos componentes do comportamento de forrageamento. Fonte: (Walker, 2005).

Uma grande variedade de contaminantes podem modificar o comportamento alimentar de peixes. Estudos realizados com mercúrio, zinco, cádmio e bifenilas policloradas (PCBs) (Smith e Weis, 1997; Weis et al., 2003), revelaram que estes compostos interferiram nas suas habilidades de capturar as presas, na motivação para se alimentar ou no tempo de manipulação da presa, o que pode contribuir para reduzir as taxas de alimentação (Weis et al., 2003).

Portanto, o sucesso na captura de presas como um biomarcador comportamental é ecologicamente relevante, e pode ser utilizado com segurança para a elucidação de possíveis efeitos de poluentes no comportamento alimentar de peixes (Weis et al., 2001).

Assim, podemos considerar que os biomarcadores comportamentais relacionados com a visão, captura de presas, natação e resistência natatória são

ferramentas da ecotoxicologia com relevante importância ambiental, e que podem ser utilizados para a identificação de possíveis efeitos subletais de poluentes em peixes.

Para os estuários de Pernambuco foram listadas 200 espécies de peixes válidas, e *Poecilia vivipara* foi classificada como muito freqüente (Paiva, 2009), tendo sido também abundante no estuário do Rio Catuama, Pernambuco (Falcão, 2007). Os poecilídeos apresentam uma notável variedade de adaptações reprodutivas, e a quase totalidade das 150 espécies conhecidas é vivípara tendo desenvolvido a capacidade de fertilização interna, com várias modificações no sistema reprodutivo. Essa espécie é abundante não apenas em Pernambuco, mas em estuários até o sudeste e sul do Brasil (Fisher et al., 2004), vivendo em águas com salinidade que variam de 0 a 28, chegando a 30 em laboratório (Amaral et al., 2001).

O fenantreno e o cobre estão entre os compostos escolhidos como modelos químicos dentro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Toxicologia Aquática do CNPq, com o objetivo de que sejam geradas informações a nível molecular, bioquímico, genético, morfológico e comportamental em uma espécie de peixe que possa ser obtida ao longo da costa sul, sudeste e nordeste do Brasil. Este trabalho está inserido neste contexto, proporcionando informações sobre aspectos ecologicamente relevantes a nível comportamental decorrentes da exposição da espécie de peixe modelo a ser testada, no caso a espécie *Poecilia vivipara*, ao fenantreno e ao cobre.

2. Objetivos

2.1 Geral

Avaliar os efeitos causados pelo hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) fenantreno e pelo metal cobre em parâmetros de efeito ao nível comportamental em juvenis do peixe estuarino *Poecilia vivipara*, cujo nome popular é barrigudinho.

2.2 Específicos

Determinar os efeitos tóxicos comportamentais dose-dependentes de concentrações crescentes do HPA-fenantreno e do metal pesado cobre em juvenis da espécie quantificados com base nos seguintes parâmetros: 1) Acuidade visual; 2) Deslocamento e velocidade de natação espontânea; 3) Deslocamento e velocidade de

natação durante a atividade de captura de presas ; 4) Capacidade de captura de presas; 5) Resistência natatória sustentada num sistema contra-corrente.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Os juvenis de *Poecilia vivípara* foram coletados na Lagoa do Araçá localizada no bairro da Imbiribeira, Recife-PE, e mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFPE. Os peixes foram aclimatados da salinidade de coleta 10-15 ppm para 25 ppm, na qual foram realizados os experimentos. O período de aclimação teve a duração de 7 dias, e durante esta etapa os peixes foram alimentados com ração comercial para peixes (Alcon Artemia) e náuplios de Artemia recém-eclodidos. Até o início dos experimentos os peixes foram mantidos em sistema de tanques com volume total de 300 litros integrado a um filtro biológico. Houve troca diária de 1/4 do volume total, a temperatura variou entre 26 e 27°C e os níveis de compostos nitrogenados amônia e nitrito foram monitorados diariamente para que estivessem dentro dos padrões aceitáveis.

Para os experimentos realizados com o fenantreno foram selecionados peixes com comprimento total de 1,5 cm. Para os testes com cobre o comprimento total dos indivíduos variou entre 1,5 e 2,0 cm.

3.2 Qualidade da água

A qualidade da água utilizada nos experimentos foi avaliada durante os experimentos, e as análises realizadas com testes colorimétricos da marca LabconTest indicaram ausência de amônia total, nitrato e nitrito, ferro = 0,5 mg L⁻¹, dureza total entre 50 a 150 mg L⁻¹, oxigênio dissolvido > 6 ppm, pH = 8,05. A temperatura durante o período de exposição e experimentos comportamentais variou entre 25 e 26°C.

3.3 Preparação das soluções e sistema de exposição ao fenantreno e ao cobre

Para preparação da solução estoque de fenatreno utilizou-se o composto em forma sólida com 98% de pureza (Sigma Aldrich, St Louis, USA). Foi dissolvido 1g de fenatreno em 50 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se a solução estoque 1 (20 g L⁻¹). Uma solução estoque 2 (4 g L⁻¹) foi preparada da diluição de 10 mL da solução estoque 1 em 40 mL de DMSO. Foram pipetados volumes de 12,5 e 50,0 µL da solução estoque 2, e 50, 100 e 150 µL da solução estoque 1 em 20L dos aquários de exposição

para se obter as concentrações planejadas de 2,5, 10, 50, 100, e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno, respectivamente.

Para preparação da solução de Cobre foi dissolvido 2,12 g de composto na forma sólida cloreto de cobre 98% (CuCl_2) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) em 100 ml de água destilada e preparada a solução estoque 1 de 10 g L^{-1} . Foram pipetados volumes de 10, 40, 80, 200 e 400 μL da solução estoque 1 em 20L dos aquários de exposição para se obter as concentrações planejadas de 5, 20, 40, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cobre.

3.4 Exposição dos juvenis de *Poecilia vivipara* ao fenantreno e cobre

Para a exposição dos peixes ao fenantreno e ao cobre os volumes pré-calculados das soluções estoque mencionados acima foram misturados com a água presente em aquários reservatórios de 20L para atingir as concentrações planejadas para o fenantreno de 2,5, 10, 50, 100, e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, e para o cobre de 5, 40, 100, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em cada experimento que envolveu a exposição ao fenantreno isoladamente, e ao cobre isoladamente, a água nas concentrações citadas acima presentes nos aquários de 20L foi transferida por gravidade para aquários de 15L onde estavam presentes os peixes que foram expostos a estas concentrações ou à água limpa nos aquários do controle. A água foi renovada em 130% diariamente em todos os tratamentos. Em cada aquário de exposição foram colocados 15 animais e durante o período de exposição os animais não foram alimentados.

3.5 Avaliação das taxas de mortalidade

Para avaliação das taxas de mortalidade do fenantreno e do cobre foi realizada uma contagem diária em todos os aquários para se registrar o número de peixes mortos retirando-os de cada um dos aquários. Os dados de mortalidade foram totalizados para um período de exposição de 96 horas.

3.6 Sistema de gravação de vídeos para os testes comportamentais

Para os testes comportamentais foram realizadas filmagens através de um sistema de câmeras de vídeo tipo circuito fechado de televisão (CFTV) marca MTC modelo KBC602-LG, sendo cada câmera dotada de uma lente zoom 6-60 mm de distância focal, proporcionando uma visão superior com enquadramento total da arena na imagem. Cada câmera transmite as imagens dos aquários (arenas experimentais) posicionados abaixo dessas câmeras a uma placa de captura de vídeo (Geovision modelo GV-800) num computador capaz de processar e gravar as imagens de todos os tratamentos

simultaneamente, além de possibilitar a visão em tempo real de todas as câmeras no monitor do computador. Para maximizar o contraste entre os peixes e o fundo, as arenas experimentais foram posicionadas sobre um tampo de acrílico branco translúcido sob o qual foram instaladas 4 lâmpadas fluorescentes de luz branca com 58W de potência.

Todos os testes comportamentais foram realizados após a exposição dos indivíduos testados durante 96h às concentrações de fenantreno e cobre planejadas.

3.7 Atividade natatória espontânea

Antes de se iniciar a gravação para as análises de atividade natatória, peixes representantes de cada tratamento planejado para o fenantreno ou cobre, dependendo do experimento em execução, foram colocados individualmente em aquários de 8 cm (comprimento) x 6 cm (largura) x 8,5 cm (altura) preenchidos com 100 mL de água. Posteriormente iniciou-se a gravação dos vídeos de atividade natatória espontânea. Cada monitoramento teve uma duração de 10 minutos, e deste intervalo de tempo os 5 minutos iniciais foram considerados como período de aclimação do peixe ao sistema, e para análise das imagens utilizou-se apenas os 5 minutos finais. Após as gravações, todos os vídeos foram processados pelo software *Spyneurotracking* (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 das dimensões da arena o *software* calcula o deslocamento linear e velocidade média do animal.

3.8 Atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis

Imediatamente após terem sido finalizadas as gravações da atividade natatória espontânea foram introduzidos náuplios de *Artemia* nos mesmos aquários com os mesmos peixes do teste anterior, e iniciou-se assim a gravação de vídeos de atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis. As presas disponíveis, náuplios de *Artemia* 24h após a eclosão, foram oferecidas simultaneamente a todos os peixes em um número total padronizado e pré-quantificado. O tempo total de cada monitoramento foi de 10 minutos, porém apenas os 5 minutos iniciais foram utilizados para a análise das imagens por ser o período de maior atividade dos peixes em busca das presas por estarem estas em maior número que nos 5 minutos finais. Os vídeos foram processados pelo software *Spyneurotracking*, e a velocidade média do animal foi calculada.

3.9 Detecção e Captura de presas

O teste de captura de presas foi baseado na quantidade de presas que cada peixe capturou durante um intervalo de tempo de 10 minutos. Este teste foi feito simultaneamente com a avaliação da atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis, e a quantidade de náuplios que era introduzida nos aquários para simular uma situação de busca e captura de alimento foi calculada previamente. Em geral foram disponibilizados entre 93 e 450 náuplios de *Artemia* durante os experimentos de exposição ao fenantreno e ao cobre, sendo que sempre o mesmo número de náuplios foi oferecido a todos os tratamentos. Ao final do período de 10 min das gravações, os peixes sendo testados eram retirados e retornados aos aquários de exposição respectivos, e os náuplios que sobravam em cada aquário foram preservados em formol a 4% e corados com Rosa de Bengala para contagem posterior. O parâmetro quantidade de náuplios consumidos para cada indivíduo testado em cada tratamento por cada peixe foi calculada com base na diferença entre o número total oferecido ao início menos o número restante ao final do experimento.

3.10 Resistência natatória

O equipamento utilizado para a realização dos testes foi construído no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABECOTOX) tendo como referência sistemas semelhantes relacionados com a quantificação da capacidade de natação de peixes, em especial o sistema usado por Vieira et al.,(2009), que foi adaptado e modificado. Para execução dos estudos com *P.vivipara* foram elaborados 4 sistemas idênticos. O sistema é composto por uma bomba submersa (Figura 5a) com vazão de 1.200 L min^{-1} que fica submersa em um aquário com um volume de água de 45 litros (Figura 5).

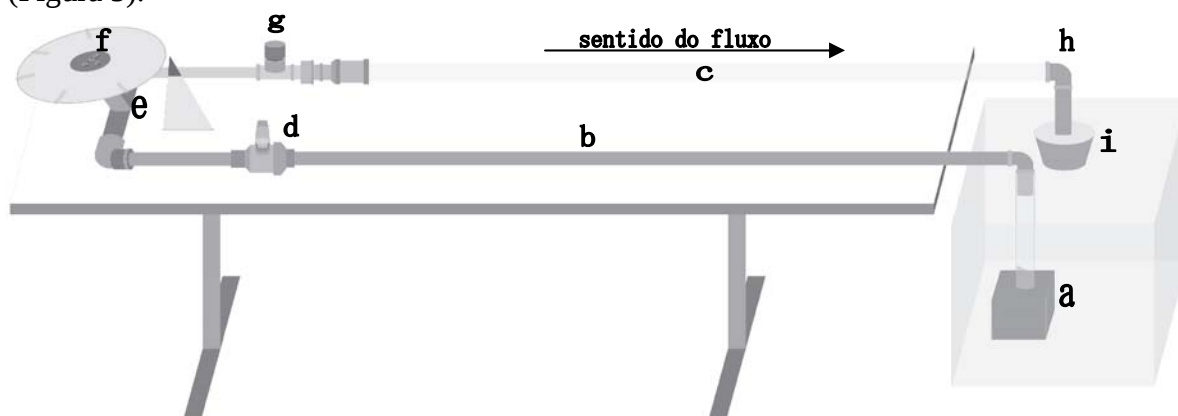


Figura 5 - Representação esquemática do equipamento utilizado nos testes de Resistência natatória.

Esta bomba submersa impulsiona água por um sistema de tubos de PCV (Figura 5b) e acrílico (Figura 5c) em formato de U. No tubo de PVC foi instalada uma válvula esférica de PVC que permite abrir ou fechar totalmente o fluxo de água (Figura 5d). Em seguida a esta válvula no sistema de PVC, foi instalado um registro de PVC que regula a vazão de água através do sistema durante o experimento (Figura 5e). Foi construído em acrílico e adaptado a este registro um disco que foi dividido em setores de 1/16 da circunferência total, de modo a permitir que se pudesse calibrar estas marcas com precisão de 1/6 de volta para estabelecimento das vazões desejadas durante os experimentos (Figura 5f). Na sequência do sistema foi instalada uma entrada com tampa rosqueável posteriormente ao registro de regulação de vazões que é utilizada para introduzir o peixe no sistema (Figura 5g). Após esta entrada com tampa foi conectado um tubo de acrílico com 80 cm de comprimento e 3cm de diâmetro interno (Figura 5c), onde o peixe é monitorado durante suas atividades natatórias contra as correntes padronizadas estabelecidas no sistema. Após o tubo de acrílico há um ramo final de PVC que retorna para o aquário onde está a bomba submersa (Figura 5h), terminando com uma cesta para capturar o peixe quando este é arrastado do tubo de acrílico por não conseguir vencer o fluxo de água ao final do teste (Figura 5i). Desta forma, durante o experimento estabelece-se um sistema fechado de circulação de água entre o aquário reservatório com a bomba submersa e o sistema de teste.

O procedimento de teste iniciou com a introdução do peixe no tubo de acrílico através da entrada com tampa (Figura 5g). Para que a visualização do peixe durante o teste fosse possível foi utilizado tubo de material transparente acrílico por sua maior segurança durante a manipulação do equipamento. Assim que o animal foi introduzido no sistema a bomba foi ligada gerando um fluxo de água que corre no sentido indicado na figura 5. Inicialmente os peixes ficaram durante 1 minuto na vazão de $1,5 \text{ L min}^{-1}$, o que foi considerado período de aclimação. Após a fase de aclimação o tempo passou a ser contado e a vazão era aumentada progressivamente em $0,5 \text{ L min}^{-1}$ a intervalos regulares de 30s para os experimentos com fenantreno, e em $1,0 \text{ L min}^{-1}$ a intervalos regulares de 1 min para os experimentos com cobre. A vazão final de $7,5 \text{ L min}^{-1}$ no máximo, isso quando os peixes suportavam chegar à esta última vazão, relativa a uma velocidade de corrente aproximada de 23 cm/s. O teste foi encerrado quando o peixe não suportou mais nadar contra o fluxo de água e foi arrastado para fora do sistema pela corrente estabelecida (Figura 5i), caindo dentro da cesta no aquário. O parâmetro

quantificado para cada indivíduo testado foi a vazão máxima antes da vazão em que o peixe foi arrastado para fora do sistema. Também foi registrado o tempo total que durou o teste e o tempo que o peixe se manteve resistindo à vazão que o arrastou para fora do sistema (última vazão aplicada).

3.11 Acuidade visual

Os testes de acuidade visual foram efetuados utilizando-se um sistema de avaliação da função visual adaptado de Carvalho *et al.*, (2002). Durante este teste o peixe foi mantido em um tubo de vidro com um diâmetro ligeiramente maior do que o seu comprimento total. Ao redor da câmara teste, no campo visual do peixe, foram posicionados cilindros com padrões de listras verticais pretas e brancas de diferentes larguras que giravam ao redor do tubo de vidro com auxílio de um motor.

Durante o teste, os peixes foram expostos a larguras decrescentes destas faixas verticais pretas e brancas. Cada cilindro de PVC apresenta diferentes larguras de faixas pretas e brancas (L), e são numerados de 1 a 25 de acordo com essas larguras. Na parte superior da câmara de vidro onde fica o peixe fica disposta uma câmera de vídeo P/B (Panasonic, Secaucus, New Jersey, U.S.A., model WV-BP330), ligada a um monitor P/B. A câmera é equipada com uma lente telemacro que possibilita observar o movimento do globo ocular ou optocinético dos peixes. O sistema acima e o compartimento onde é inserido o peixe para a avaliação da visão ficam dispostos dentro de um compartimento totalmente opaco que possui em sua parte superior uma lâmpada fluorescente de luz branca com potência de 100 W. Esta lâmpada proporciona uma iluminação calibrada em aproximadamente 100 lux com o auxílio de um fotômetro-radiômetro modelo IL1700 com um sensor de alta resolução SHD033 (International Light, Newburyport, Massachusetts, U.S.A.).

Para se realizar o teste, o cilindro de PVC contendo as faixas, gira no sentido horário ou anti-horário ao redor do tubo onde está o peixe com o auxílio de pequenos motores elétricos com velocidade controlada de aproximadamente 4 a 6 rotações por minuto. Através do monitor de TV observa-se o movimento do globo ocular do peixe acompanhando ou não o movimento das faixas, sendo considerado positivo aquelas que apresentarem pelo menos 4 movimentos em 10 segundos em ambos os sentidos horário e anti-horário (Carvalho *et al.*, 2002). Quando considerado positivo, é trocado o cilindro de PVC por um com faixas mais estreitas, e assim sucessivamente, até o momento em que a visão for considerada negativa. A distância entre a superfície externa do tubo de

vidro onde se encontra o peixe e a superfície interna do cilindro de PVC é denominada distância de reação (DR).

A acuidade é medida por um ângulo (alfa) que é determinado através de uma relação entre a distância de reação (DR) e a largura (L) das faixas do último cilindro com resposta positiva (menor L detectável), e pode ser calculada através da relação trigonométrica apresentada na Figura 6.

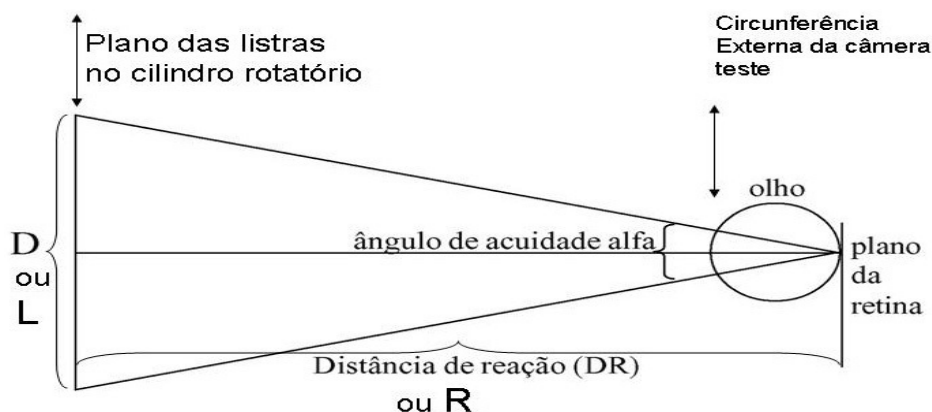


Figura 6- Relação trigonométrica expressa pela equação $\alpha = 2 \arctan [(L/2)/DR] \cdot 180 / \pi$ entre o ângulo de acuidade alfa (em graus), D: dimensão do menor estímulo detectável sendo projetado na retina (largura da listra (L) ou comprimento da presa ou predador) e distância de reação (DR) ou R (distância entre a circunferência externa da câmera teste e o plano das listras no cilindro giratório).

Seis juvenis de *P.vivipara* provenientes de cada um dos tratamentos foram testados para avaliação da acuidade após 96 h de exposição ao fenantreno.

3.12 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software Sigmastat, 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.

4. RESULTADOS

Os resultados que serão descritos adiante tanto em relação ao experimento de exposição ao fenantreno como ao cobre, referem-se todos à concentrações subletais, pois, não houveram diferenças entre a taxas de mortalidade para os peixes expostos aos diferentes tratamentos com fenantreno e controle, e aos diferentes tratamentos do cobre e controle. Para os peixes expostos aos diferentes tratamentos de fenantreno as taxas de mortalidade do controle, controle do solvente, 2,5, 10, 50, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, foram respectivamente de 0,37, 0,40, 0,38, 0,34, 0,27, 0,29, e 0,38 (Kruskal-Wallis I, $H_6 = 11,4$; $p = 0,07$). E para os peixes expostos aos diferentes tratamentos de cobre as taxas de mortalidade do controle, 5, 20, 40, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram de 0,10, 0,03, 0,10, 0,13 e 0,00 e 0,10 (Anova I, $F_{5,17} = 0,97$; $p = 0,47$).

4.1 Fenantreno

4.1.1 Atividade natatória espontânea

Os juvenis de *P.vivipara* expostos a concentrações crescentes de fenantreno não apresentaram diferença significativa em suas velocidades de natação Espontânea (Anova I, $F_{6,102} = 0,568$; $p = 0,755$). Os peixes do grupo controle e controle do solvente apresentaram respectivamente velocidades médias de 1,25 cm s^{-1} e 1,21 cm s^{-1} , e indivíduos das concentrações de 2,5, 10, 50, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno apresentaram velocidades médias iguais 0,98 cm s^{-1} , 1,17 cm s^{-1} , 1,27 cm s^{-1} , 1,18 cm s^{-1} e 0,87 cm s^{-1} (Figura 7).

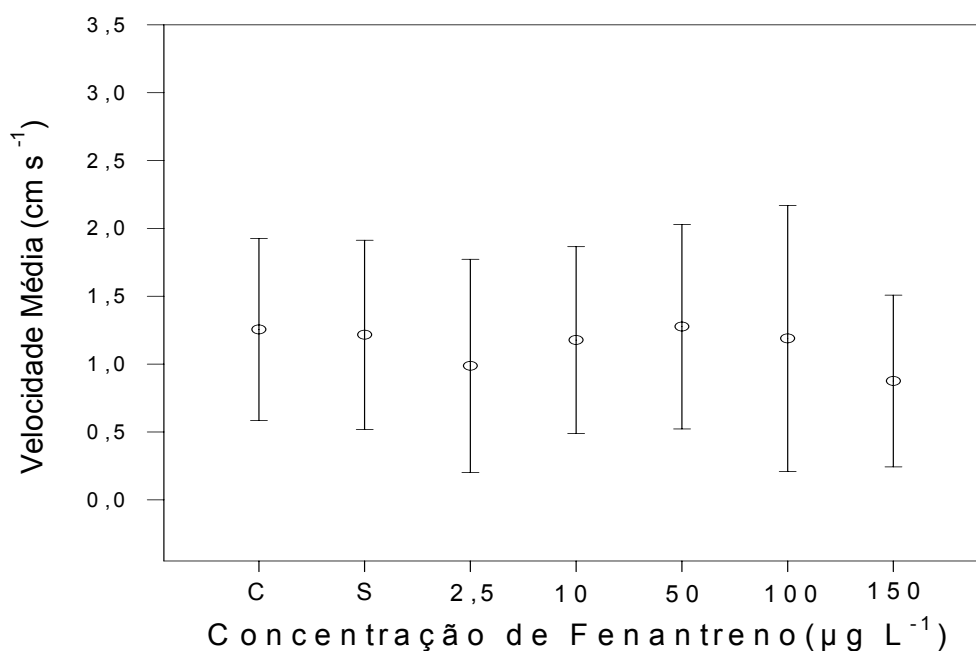


Figura 7- Velocidade de natação (média $\pm$ desvio padrão) dos juvenis de *P.vivipara* após 96 h de exposição ao fenantreno (Anova I, $F_{6,102} = 0,568$; $p = 0,755$). (C) Controle, (S) Controle do solvente; $n=15$.

4.1.2 Atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis

Os juvenis de *P.vivipara* expostos a concentrações crescentes de fenantreno apresentaram uma diminuição dose-dependente das velocidades médias de natação durante a alimentação com náuplios de *Artemia* (ANOVA I $F_{6,97} = 6,183$, $p = <0,001$). Os peixes do grupo controle e controle do solvente apresentaram respectivamente velocidades médias de $1,32 \text{ cm s}^{-1}$ e $1,17 \text{ cm s}^{-1}$, já as concentrações de 2,5, 10, 50, 100 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno tiveram velocidades médias iguais $0,80 \text{ cm s}^{-1}$, $1,05 \text{ cm s}^{-1}$, $1,09 \text{ cm s}^{-1}$, $0,81 \text{ cm s}^{-1}$ e $0,44 \text{ cm s}^{-1}$ (Figura 8).

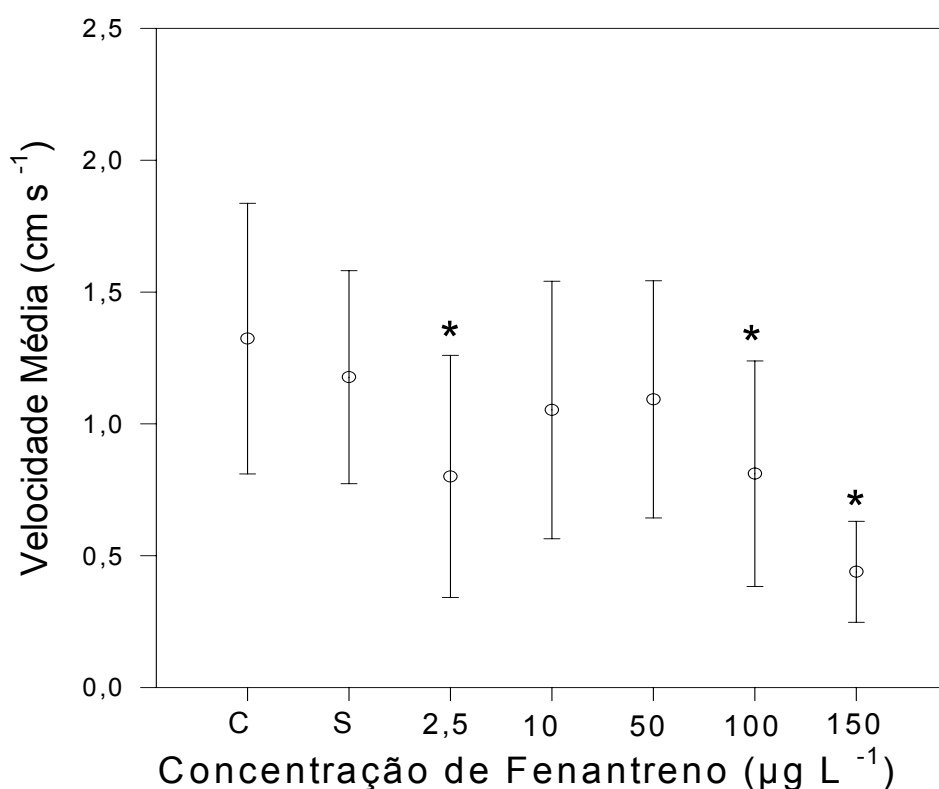


Figura 8 – Velocidade de natação (média $\pm$ desvio padrão) dos juvenis de *P.vivipara* durante alimentação com *Artemia* após 96 h de exposição ao fenantreno (ANOVA I $F_{6, 97} = 6,183$, $p = <0,001$). (C) Controle, (S) Controle do solvente. Os asteriscos (*) indicam as concentrações que diferem significativamente do controle; $n=15$.

Esta diferença estatística entre os tratamentos foi confirmada através de teste de comparação múltipla de Dunnett, e ocorreram entre o controle e as concentrações $5 \mu\text{g L}^{-1}$, $200 \mu\text{g L}^{-1}$, $300 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo detectada uma tendência geral de uma relação dose-resposta.

4.1.3 Resistência natatória

Os juvenis de *P.vivipara* expostos a concentrações crescentes de fenantreno não apresentaram diferença significativa no teste de resistência natatória contra-corrente (Kruskal-Wallis I, $H_6 = 5,38$, $p = 0,495$). Os peixes do grupo controle e controle do solvente suportaram vazões contra-corrente médias respectivamente de $3,3 \text{ L min}^{-1}$ e $3,8 \text{ L min}^{-1}$, já as concentrações de 2,5, 10, 50, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno suportaram vazão contra-corrente média de $3,6 \text{ L min}^{-1}$, $3,3 \text{ L min}^{-1}$, $3,9 \text{ L min}^{-1}$, $3,5 \text{ L min}^{-1}$ e $3,8 \text{ L min}^{-1}$ (Figura 9).

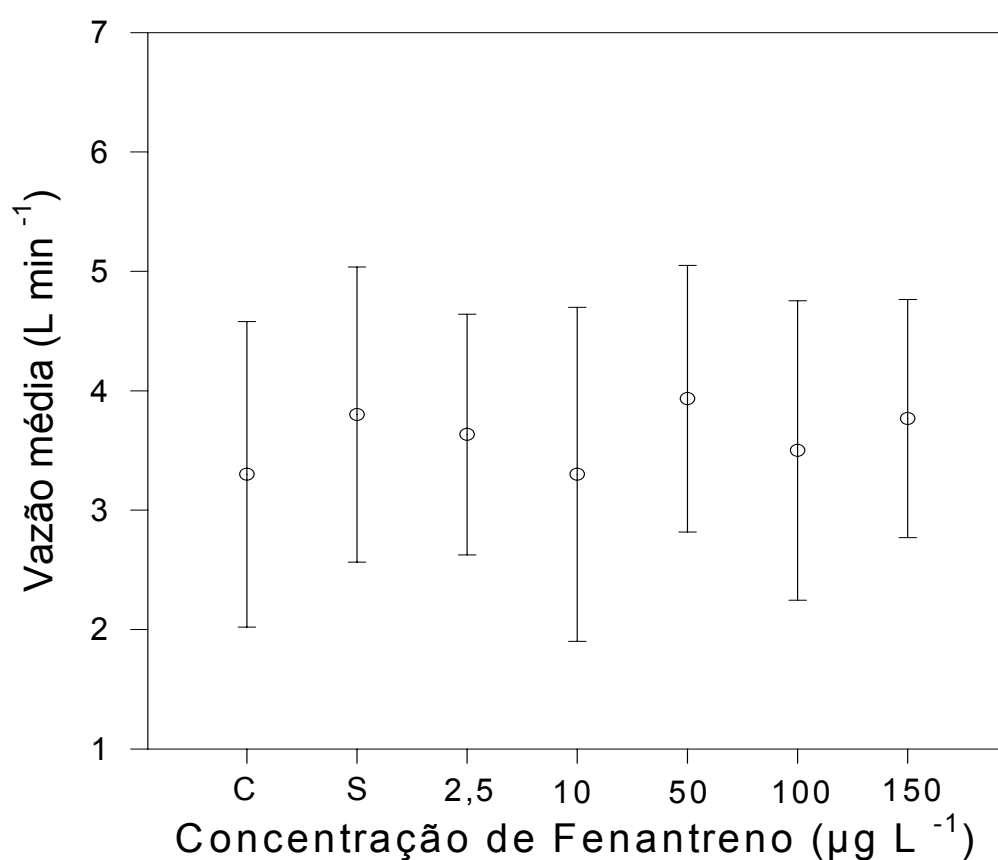


Figura 9- Vazão máxima (**média** $\pm$ desvio padrão) suportada pelos juvenis de *P.vivipara* após 96 h de exposição ao fenantreno (Kruskal-Wallis I, $H_6 = 5,39$, $p = 0,495$). (C) Controle, (S) Controle do solvente; $n=15$.

4.1.4 Acuidade Visual

Indivíduos de *P.vivipara* expostos a concentrações crescentes de fenantreno apresentaram diferença estatística na acuidade visual entre os tratamentos (ANOVA I, $F_{5,22}= 3,38$; $p= 0,027$) (Figura 10). A média da acuidade visual foi igual a 3,4 graus no controle. Nas concentrações 5, 100, 200, 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ os valores médios de acuidade visual foram iguais a 3,3; 3,4; 5,0; 5,9 e 8,5 graus (Figura 10). Foi detectada diferença estatística entre indivíduos do controle e do tratamento com 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ (teste de Dunnett, $p<0,05$) sendo evidenciada uma tendência de relação dose-resposta, com piora da acuidade visual a partir de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

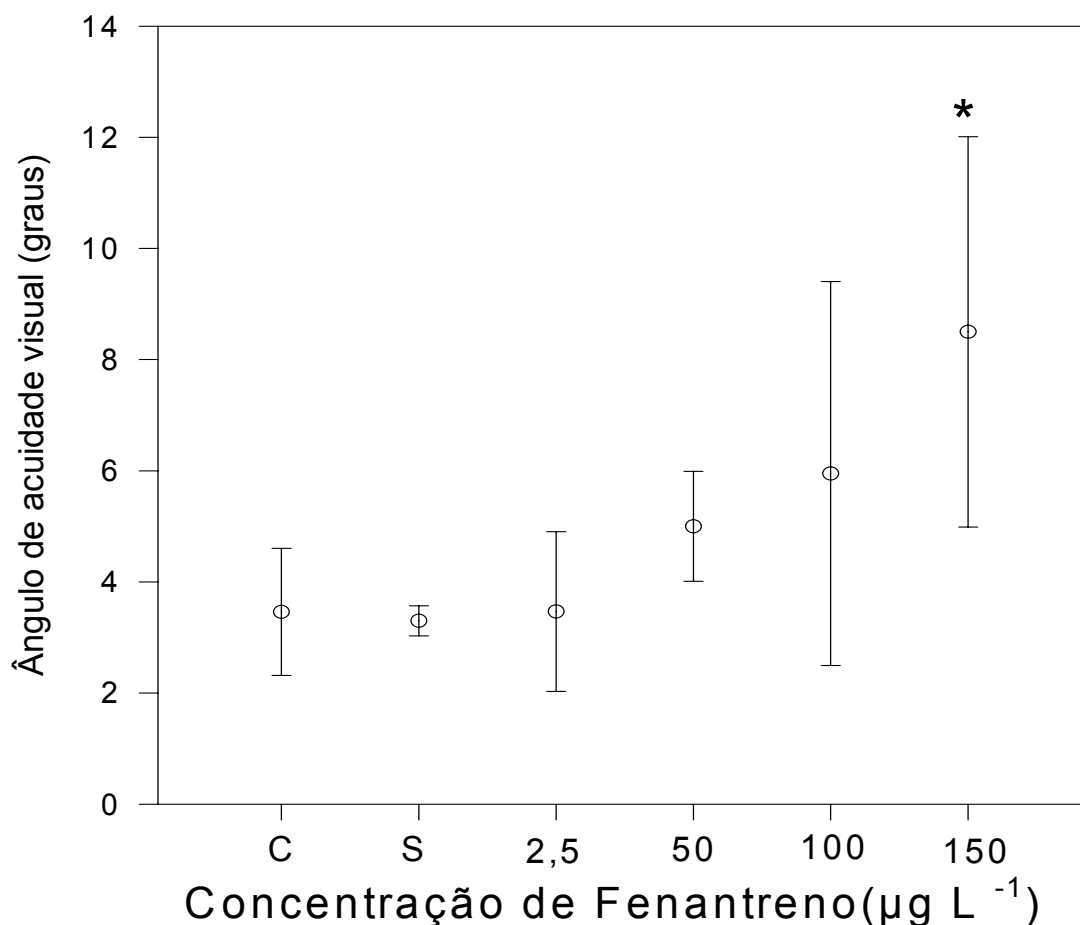


Figura 10- Graus de acuidade visual (média $\pm$ desvio padrão) apresentados por juvenis de *P.vivipara* expostos por 96 h ao fenantreno ($F_{5,22}= 3,38$; $p= 0,027$). O asterisco (*) indica a concentração que difere significativamente do controle. (C) Controle, (S) Controle do solvente; $n=6$.

4.1.5 Detecção e Captura de presas

Os juvenis de *P.vivipara* expostos a concentrações crescentes de fenantreno apresentaram uma relação dose-resposta tendência de diminuição do número de náuplios capturados com o aumento das concentrações de exposição (Kruskal-Wallis I, $H_6 = 35,5$; $p < 0,001$). A media de náuplios de *Artemia* capturados pelos peixes do controle e do controle do solvente foi igual a 93 para ambos. A mediana do número de náuplios capturados nas concentrações de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $10 \mu\text{g L}^{-1}$, $50 \mu\text{g L}^{-1}$, $100 \mu\text{g L}^{-1}$, e $150 \mu\text{g L}^{-1}$ foi igual a 91, 92, 93, 91 e 70, respectivamente. Foi detectada uma diferença entre o número de náuplios capturados pelo controle quando comparado com o número de náuplios capturados pelos indivíduos expostos a $150 \mu\text{g L}^{-1}$ (Dunn, $p < 0,05$) (Figura 11).

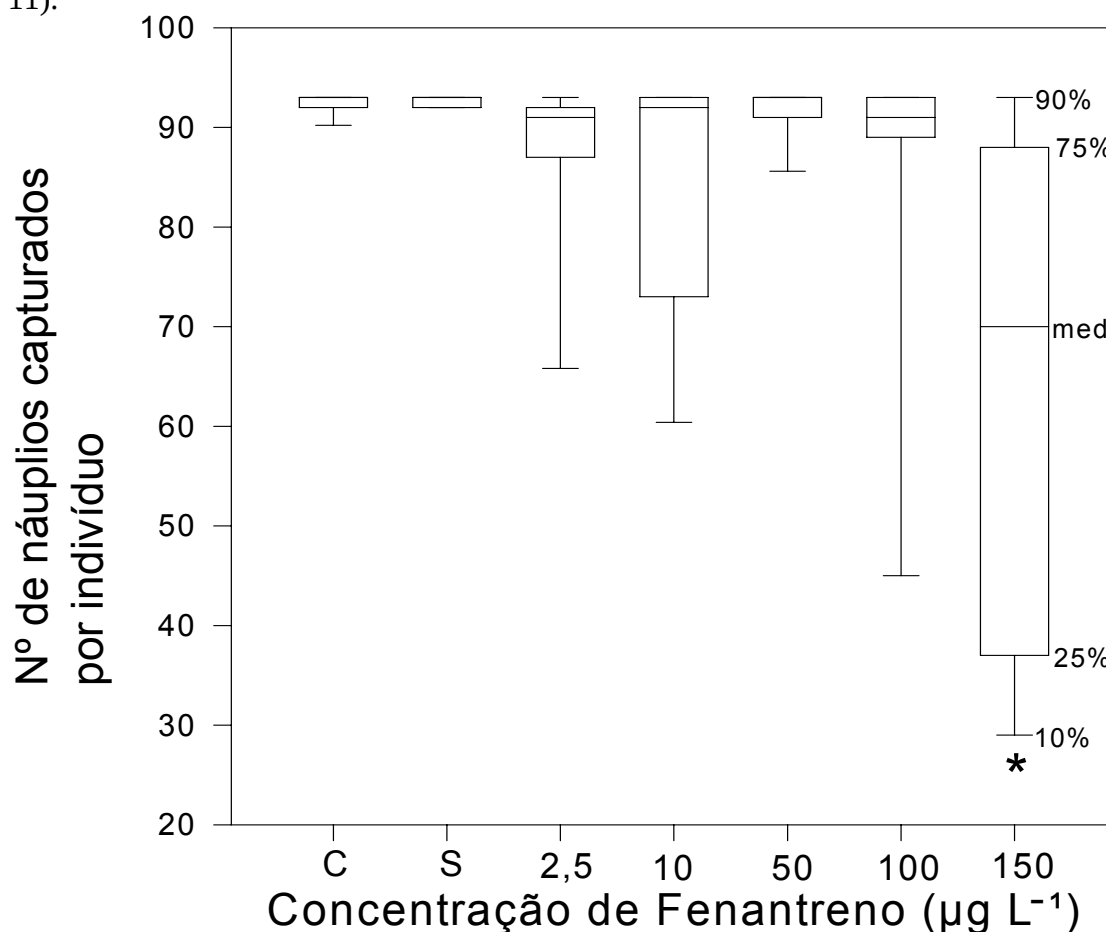


Figura 11- Número de náuplios de *Artemia* (mediana (med) e percentis 10%, 25%, 75% e 90%) capturados por juvenis de *P.vivipara* após 96h de exposição ao fenantreno (Kruskal-Wallis I, $H_6 = 35,5$; $p < 0,001$). O asterisco (*) indica a concentração que difere significativamente do controle. (C) Controle, (S) Controle do solvente; $n=15$.

4.2 Cobre

4.2.1 Atividade natatória espontânea

Os juvenis de *P.vivipara* expostos a concentrações crescentes de cobre não apresentaram diferença significativa em suas velocidades de natação espontânea (Anova I, $F_{5,87} = 1,335$; $p = 0,26$). Os peixes do grupo controle apresentaram velocidade média de $2,36 \text{ cm s}^{-1}$, e as concentrações de 5, 20, 40, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre apresentaram velocidades médias iguais $2,76 \text{ cm s}^{-1}$, $2,41 \text{ cm s}^{-1}$, $2,43 \text{ cm s}^{-1}$, $2,73 \text{ cm s}^{-1}$ e $1,86 \text{ cm s}^{-1}$ (Figura 12).

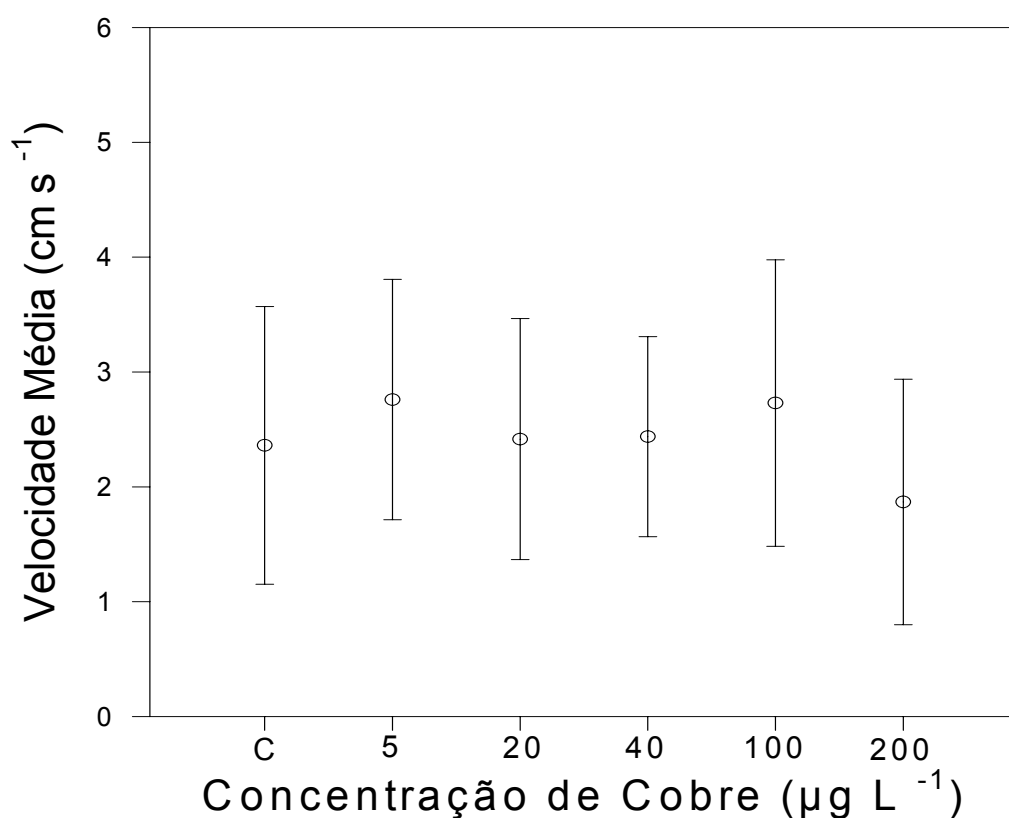


Figura 12- Velocidade de natação (média $\pm$ desvio padrão) dos juvenis de *P.vivipara* após 96 h de exposição ao cobre (Anova I, $F_{5,87} = 1,335$; $p = 0,26$). (C) Controle; $n=15$.

4.2.2 Atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis

Os juvenis de *P.vivipara* expostos a concentrações crescentes de cobre não apresentaram diferença significativa em suas velocidades de natação durante o estímulo de presas disponíveis durante a alimentação (ANOVA I $F_{5,86} = 1,67$, $p = 0,15$). Os peixes do grupo controle apresentaram velocidade média de $1,69 \text{ cm s}^{-1}$, e os peixes expostos às concentrações de 5, 20, 40, 100 e $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre as velocidades médias foram iguais a $1,92 \text{ cm s}^{-1}$, $1,77 \text{ cm s}^{-1}$, $1,77 \text{ cm s}^{-1}$, $2,03 \text{ cm s}^{-1}$ e $1,43 \text{ cm s}^{-1}$ (Figura 13).

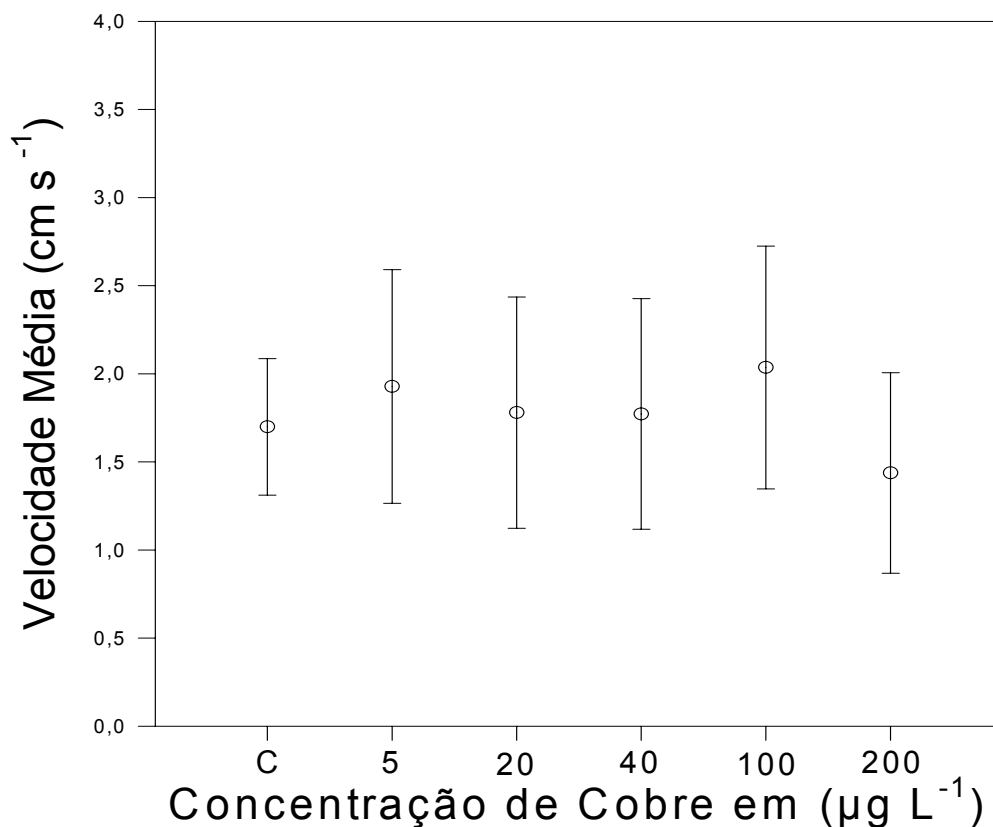


Figura 13- Velocidade de natação (média $\pm$ desvio padrão) dos juvenis de *P.vivipara* durante alimentação com *Artemia* após 96 h de exposição ao cobre (Anova I, $F_{5,86} = 1,67$; $p = 0,152$). (C) Controle; $n=15$.

4.2.3 Resistência natatória

Os juvenis de *P.vivipara* expostos a concentrações crescentes de cobre apresentaram diferença significativa quanto ao teste de resistência contra-corrente (ANOVA I, $F_{5,117} = 3,190$; $p = 0,010$, Dunnett, $p < 0,050$). Os peixes do grupo controle suportaram vazão contra-corrente média de $4,7 \text{ L min}^{-1}$, e as concentrações de 5, 20, 40, 100 e $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cobre suportaram vazões contra-corrente médias de $4,7 \text{ L min}^{-1}$, $4,7 \text{ L min}^{-1}$, $3,3 \text{ L min}^{-1}$, $4,0 \text{ L min}^{-1}$ e $3,2 \text{ L min}^{-1}$. Houve uma tendência de diminuição da resistência na natação contra-corrente a partir da concentração de $40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, sendo que a vazão máxima suportada pelos peixes expostos a $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre foi estatisticamente diferente do controle (Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 14).

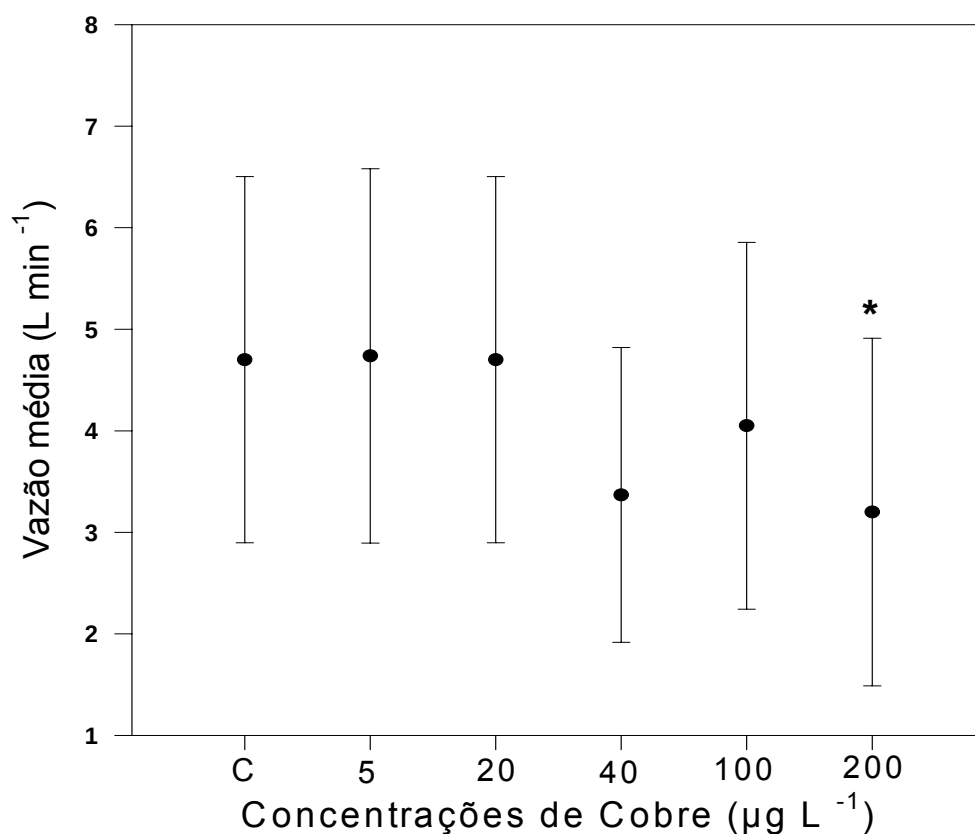


Figura 14- Vazão máximas (média $\pm$ desvio padrão) suportadas por juvenis de *P.vivipara* após 96h de exposição ao cobre (ANOVA I, $F_{5,117} = 3,190$; $p = 0,010$, Dunnett, $p < 0,050$). (C) controle; n=15.

4.2.4 Detecção e Captura de presas

Os juvenis de *P.vivipara* expostos a concentrações crescentes de cobre não apresentaram diferença significativa no número de presas capturadas. A média de presas capturadas pelo grupo controle foi de 386 presas, já os peixes expostos às concentrações de 5, 20, 40, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre apresentaram respectivamente média de presas capturadas iguais a 388, 289, 351 e 358 (Kruskal-Wallis, $H_5 = 8,3$; $p = 0,14$) (Figura 15).

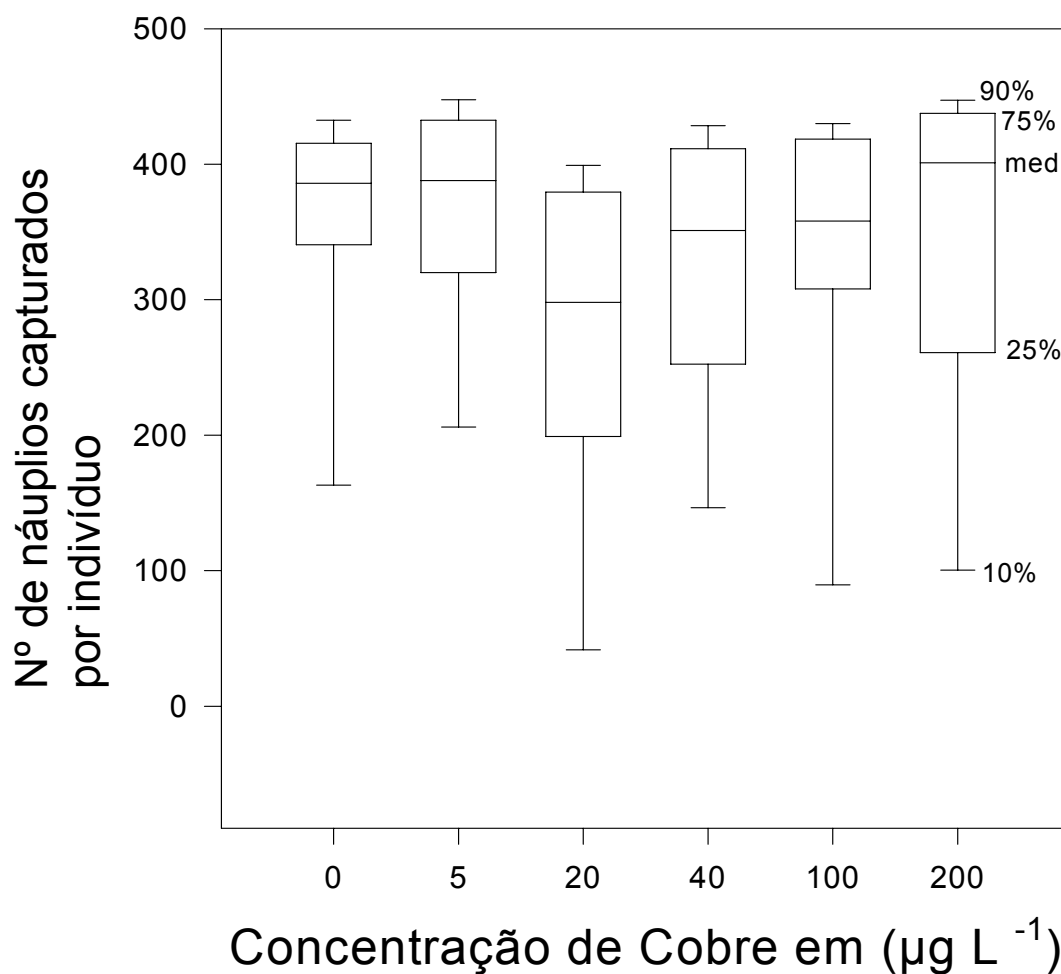


Figura 15- Número de náuplios de *Artemia* (mediana (med) e percentis 10%, 25%, 75% e 90%) capturados por juvenis de *P.vivipara* após 96h de exposição ao cobre (Kruskal-Wallis, $H_5 = 8,3$; $p = 0,14$). (C) controle.; $n=15$.

5. DISCUSSÃO

5.1 Fenantreno

Alterações no comportamento natatório podem interferir na alimentação, no crescimento e na capacidade de fugir de predadores. A hipoatividade pode reduzir as taxas de alimentação, devido à diminuição da taxa de encontro com as presas (Fuiman et al., 2006). Além disso, a hipoatividade pode reduzir também as taxas de encontro com os predadores, diminuindo a vulnerabilidade à predação (Zhou e Weis, 1998). Por outro lado, a perda de desempenho natatório pode reduzir a resistência da presa e a capacidade para nadar fora da rota de predadores, o que pode aumentar a vulnerabilidade de larvas e juvenis.

Foi observado que os peixes expostos ao fenantreno durante 96 horas não apresentaram alteração das velocidades de natação espontânea (Figura 7). A velocidade desenvolvida durante a natação espontânea é considerada baixa, e é utilizada pelos peixes para exploração e manutenção do território (Plaut, 2001). Estes resultados sugerem que os peixes expostos às concentrações testadas de fenantreno não sofreram alterações em seu sistema de locomoção relacionado com atividade espontânea. A natação espontânea não exige dos peixes movimentos de alta velocidade e resistência, fatores necessários para realizar processos de captura de presas ou fuga de predadores.

Os resultados do teste de resistência natatória indicam que tanto os peixes do grupo controle como das demais concentrações de exposição ao fenantreno conseguem atingir as variadas velocidades impostas no teste, desde as mais baixas, que já são maiores que as atingidas durante a natação espontânea, até as velocidades mais altas, utilizadas na captura de presas e fuga de predadores (Plaut, 2001) (Figura 9).

No entanto, Kennedy et al, (2006) expôs *Cupea palasi* a fração solúvel de petróleo em água (FSA), abordagem usada na ecotoxicologia com o objetivo de simular um derrame de petróleo em água. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, inclusive o fenantreno, constituem fração significativa da FSA. Foi observada uma redução de até 40% da velocidade crítica de natação dos peixes expostos a 100 µg L⁻¹ de hidrocarbonetos aromáticos por 8 semanas, demonstrando que derivados de petróleo podem levar a uma redução da resistência natatória de peixes.

Com relação aos dados obtidos para *P. vivipara* neste estudo, a interpretação conjunta dos resultados de natação espontânea e resistência natatória indica que os peixes continuam com a capacidade de atingir tanto baixas como altas velocidades,

mesmo após terem sido expostos ao fenantreno nas concentrações testadas, e sugere que sua fisiologia e aparatos relacionados à natação não foram alterados significativamente durante a exposição.

O teste de avaliação da atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis é uma variação do teste que avalia a atividade natatória espontânea, porém neste utiliza-se de presas para que seja simulada uma situação de busca e captura de presas pelos peixes. Os resultados da atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis dos peixes expostos ao fenantreno diferem daqueles encontrados na atividade natatória espontânea para os mesmos peixes, pois foi verificado um decréscimo da velocidade média dos peixes expostos às concentrações crescentes de fenantreno (Figura 8). Apesar dos resultados da atividade espontânea e do teste de resistência natatória indicarem que os peixes conseguem atingir a velocidade necessária para capturar presas, é evidente o estabelecimento de um estado de hipoatividade relativo ao controle durante o teste de captura de presas à medida que as concentrações de fenantreno aumentam. Esta hipoatividade pode diminuir a taxa de encontro dos predadores com as presas, podendo supostamente levar a uma diminuição de alimento ingerido. A velocidade que um peixe atinge para capturar uma presa é uma resposta a um estímulo proveniente desta interação com a presa. Para que haja uma resposta ao estímulo, que pode ser expresso pela decisão em atacar e pela velocidade de ataque e captura, o peixe deve receber o estímulo, que pode ser captado pelo animal por diversos meios sensoriais como visão, linha lateral e olfato. Se os órgãos sensoriais receptores do estímulo estiverem alterados pelo poluente o estímulo pode ser percebido de forma alterada ou mesmo não ser percebido, o que pode resultar em uma diminuição da resposta ao estímulo, representada pela diminuição da busca da presa pelo predador, ou também pela diminuição de sua velocidade em direção a presa. Neste experimento foi detectado um déficit na acuidade visual dos indivíduos testados (Figura 10), com diferença estatisticamente significativa nos peixes expostos ao tratamento com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno, correlacionada com um déficit estatisticamente significativo da capacidade de captura de presas pelos juvenis de *P.vivipara* testados no mesmo tratamento (Figura 11). Desta forma, tanto o estabelecimento de um estado de hipoatividade natatória quanto um déficit na acuidade visual podem ter influenciado na redução na capacidade de capturar presas pelos peixes expostos ao fenantreno.

A alteração do apetite do animal também é um dos fatores que pode influenciar na busca de presas pelo predador, causando diminuição da velocidade do peixe durante

a captura de presas, pois este não sente-se estimulado a se alimentar. Hornung et al., (1996) em seus estudos observou que contaminantes ambientais podem afetar a motivação para se alimentar ou apetite e/ou a habilidade para capturar presas. Um déficit sensorial ou falta de apetite também pode ter influenciado na redução da velocidade de natação dos peixes expostos à concentrações crescentes de fenantreno durante a atividade natatória sob o estímulo de presas.

Contaminantes podem alterar o comportamento alimentar, incluindo interações predador-presa, e podem ter efeitos inclusive na cadeia alimentar (Weis et al., 2003). A diminuição da busca por presas causa uma decréscimo de ingestão de energia pelos peixes (Fuiman et al., 2006), reduzindo e retardando assim o crescimento, o que pode causar decréscimo populacional, visto que o recrutamento também pode ser reduzido.

Alterações no comportamento alimentar de peixes em experimentos de laboratório tem sido notadas em resposta à exposição a concentrações subletais de vários poluentes (Little *et al.*, 1990; Morgan and Kiceniuk, 1990).

Peixes em estágios iniciais de desenvolvimento são especialmente sensíveis a contaminantes, pois as larvas e juvenis têm uma necessidade de se alimentar com frequência para suprir suas necessidades metabólicas, e uma captura de presas eficiente é essencial para a sua sobrevivência (Zhou et al., 2001). Portanto, alterações no comportamento alimentar podem estar relacionadas ao comprometimento do crescimento e possível declínio populacional (Weis, *et al.*, 1999; Weis, *et al.*, 2001).

Assim, os dados deste trabalho sugerem que a exposição de juvenis de *P.vivipara* ao fenantreno pode levar a uma diminuição da captura de presas. Resultados semelhantes também são compartilhados por Carvalho et al., (2008) que ao expor o dourado *Salminus brasiliensis*, à concentrações de 10, 50 e 100 µg L⁻¹ de fenantreno, também obtiveram como resultados a não alteração da atividade natatória espontânea, acompanhada de uma diminuição da captura de presas e de um déficit da acuidade visual.

Segundo Peters *et al.* (1997), a diminuição de presas capturadas por um peixe, o que pode ser entendido como menos energia ingerida, pode eventualmente provocar um decréscimo no crescimento e prolongar a fase juvenil, aumentando o risco de predação e reduzindo a sobrevivência destes juvenis que passarão a constituir a população de adultos reprodutores.

5.2 Cobre

Como já foi mencionado acima, a atividade natatória, seja espontânea ou sob estímulo de presas disponíveis, possui grande importância por envolver os mais variados fatores que incluem a condição fisiológica para se atingir velocidade necessária para capturar presas. Nos experimentos em que houve exposição de juvenis de *P.vivipara* às concentrações crescentes de cobre não houve alteração nos valores das velocidades médias tanto da atividade natatória espontânea (Figura 12), como da atividade natatória sob estímulo de presas disponíveis (Figura 13). Também não foi detectada alteração na capacidade dos peixes expostos ao cobre em capturar presas (Figura 15). Por outro lado, juvenis de *P.vivipara* expostos ao cobre durante o período de 96 horas apresentaram uma diminuição da resistência natatória (Figura 14). Respostas semelhantes têm sido observadas em outros estudos. Em experimento de exposição do peixe estuarino *Pomatoschistus microps* ao cobre nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g L}^{-1}$, também houve decréscimo significativo da resistência natatória dos peixes expostos a concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Vieira et al., 2009).

Waiwood e Beamish (1978) realizaram trabalhos de exposição da truta arco-íris ao cobre em água com pH ácido e básico, e observaram que a capacidade natatória dos peixes expostos era reduzida principalmente em águas com pH ácido. Resultados semelhantes foram obtidos por Beaumont et al., (1995), que expuseram *Salmo trutta* ao cobre em água ácida, e observaram uma redução entre 25 a 50% da capacidade natatória dos peixes. Também foi observada diminuição da resistência natatória em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, na carpa *Cyprinus carpio* e no peixe-japonês *Carassius auratus* após exposição ao cobre (De Boeck et al., 2006).

Uma das principais hipóteses para explicar essa redução da resistência natatória sugere que o metal pode estar interferindo nas trocas gasosas, através da indução de deficiências ionorregulatórias, e de uma diminuição do consumo máximo de oxigênio durante o exercício, causada por deficiências nas trocas gasosas a nível branquial (Beaumont et al., (1995).

Outra hipótese propõe que o cobre ao entrar em contato com o tecido branquial em concentrações tóxicas causa inchaço do epitélio branquial, e esse aumento na espessura da barreira de difusão branquial dificultaria a passagem de oxigênio para o sangue, diminuindo assim a capacidade natatória dos peixes. Com o objetivo de investigar esta idéia, Waser et al., (2009) expôs truta arco-íris ao cobre e observou que não houve diferença significativa na espessura das brânquias entre os grupos de peixes

expostos e não expostos ao cobre, apesar de ter sido detectada uma diminuição da resistência natatória nos peixes expostos. Waser et al. (2009) sugerem que outros fatores diferentes de alterações na estrutura branquial estariam causando esta redução na resistência natatória.

Com base nestes trabalhos citados acima e no presente experimento, fica claro que a exposição de peixes ao cobre causa diminuição da resistência natatória em diversas espécies, inclusive no *Poecilia vivipara*, espécie utilizada neste trabalho. No entanto são necessários mais estudos para se entender quais são as alterações que o cobre causa a nível de estrutura de brânquias ou outros órgãos , e que levam a diminuição da resistência da capacidade natatória.

Esta diminuição da resistência natatória pode implicar numa maior dificuldade no escape de predadores durante ataques sucessivos, bem como no estabelecimento de posição em habitats adequados em situações de corrente adversas (Plaut, 2001), como no caso de fluxos de maré com velocidades de corrente mais elevadas, situação frequentemente enfrentada pela espécie nos ambientes estuarinos em que habita.

6. Conclusões

O estabelecimento de um estado de hipoatividade natatória durante a captura de presas, associado a um déficit na acuidade visual podem explicar pelo menos parcialmente a redução na capacidade de capturar presas pelos peixes expostos ao fenantreno.

No experimento de exposição de *P.vivipara* ao cobre foi evidenciada uma diminuição de resistência dos peixes ao esforço natatório, que levaria a uma debilitação dos movimentos de natação em altas velocidades, como no caso da fuga de predadores ou na manutenção da estabilidade de posição numa corrente de maré em estuários, de importância para a sobrevivência da espécie.

O sistema experimental desenvolvido para avaliar resistência natatória de peixes mostrou-se bastante prático em sua utilização, possui baixo custo de fabricação, é robusto, podendo ser adaptado para os diferentes métodos de medição da resistência natatória.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, M.d.C., Murphy, C.A., Rose, K.A., McCarthy, I.D., Fuiman, L.A., 2006. Maternal body burdens of methylmercury impair survival skills of offspring in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Aquatic Toxicology* 80, 329-337.
- Amaral, M.C.B., A.C.T. Ortiz, C.H.D. , 2001. Activity Determination of Na⁺ K⁺ - ATPase and Mg⁺⁺ - ATPase Enzymes in the Gill of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes) in Different Salinities. . *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44, n.1 1-6.
- Anderson, J.W., Neff, J.M., Cox, B.A., Tatem, H.E., Hightower, G.M., 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine Biology* 27, 75-88.
- Barron, M.G., Carls, M.G., Heintz, R., Rice, S.D., 2004. Evaluation of Fish Early Life-Stage Toxicity Models of Chronic Embryonic Exposures to Complex Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures. *Toxicol. Sci.* 78, 60-67.
- Beamish, F.W.H., 1966. Swimming endurance of some northwest Atlantic fishes. *J. Fisher. Res. Bd. Can.* 23.
- Beamish, F.W.H., 1978. Swimming capacity, in: Hoar, W.S., R., J.D. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press Inc, 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.
- Bidone, E.D., 2001. Environmental risk increase due to heavy metal contamination caused by a copper mining activity in Southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, pp. 277-286.
- 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.

Carls, M.G., Marty, G.D., Hose, J.E., 2002. Synthesis of the toxicological impacts of the Exxon Valdez oil spill on Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska, U.S.A. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 153-172.

Carls, M.G., Rice, S.D., Hose, J.E., 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 481-493.

Carvalho, P.S.M., 2002. Effects of 2,3,7,8-TCDD in swim-up rainbow trout. Evaluation at different levels of biological organization with a focus on visual function. PhD Thesis. University of Missouri Columbia.

Carvalho, P.S.M., Kalil, D.D., Novelli, G.A., Bainy, A.C., Fraga, A.P., 2008. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*. *Mar Environ Res* 66, 205–207.

Carvalho, P.S.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E., 2002. Ontogenetic improvement of visual function in the medaka *Oryzias latipes* based on an optomotor testing system for larval and adult fishes. *Animal Behaviour* 64, 1-10.

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.

Depledge, M.H., Forbes, T.L., Forbes, V.E., 1993. Evaluation of cadmium, copper, zinc, and iron concentrations and tissue distributions in the benthic crab, *Dorippe granulata* (De Haan, 1841) from Tolo Harbour, Hong Kong. *Environ Pollut* 81, 15-19.

Erik Baatrup, Hayley, M., 1998. Animal Locomotor Behaviour as a Health Biomarker of Chemical Stress. Institute of Biological Sciences.

Evans, B.I., Fernald, R.D., 1990. Metamorphosis and fish vision. *Journal of Neurobiology* 21, 1037-1052.

Fairbrother, A., Ankley, G.T., Birnbaum, L.S., Bradbury, S.P., Francis, B., Gray, L.E., Hinton, D., Johnson, L.L., Peterson, R.E., Van der Kraak, G., 1999. Reproductive and developmental toxicology of contaminants in oviparous animals, in: Di Giulio, R.T., Tillitt, D.E. (Eds.), Reproductive and developmental effects of contaminants in oviparous vertebrates. SETAC Pellston workshop on reproductive and developmental effects of contaminants in oviparous vertebrates. SETAC, Pensacola, Florida, USA, pp. 283-362.

Falcão, E.C.S., 2007. Estrutura da comunidade de formas iniciais de peixes em uma gamboa do estuário do rio Catuama, Pernambuco - Brasil, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia UFPE, Recife.

Fisher, L.G.P., L.E.D., Vieira, J.P., 2004. Peixes estuarinos e costeiros. Série Biodiversidade do Atlântico Sudoeste, 126.

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.

Gerking, S.D., 1994. Feeding ecology of fish, 1st Ed. ed. Academic Press, San Diego.

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.

Gregg, J.C., Fleeger, J.W., Carman, K.R., 1997. Effects of suspended, diesel-contaminated sediment on feeding rate in the darter goby, *Gobionellus boleosoma* (Teleostei: Gobiidae). *Marine Pollution Bulletin* 34, 269-275.

Hornung, M.W., Zabel, E.W., Peterson, R.E., 1996. Additive interactions between pairs of polybrominated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners in a rainbow trout early life stage mortality bioassay. *Toxicol Appl Pharmacol* 140, 345-355.

- Incardona, J.P., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 191-205.
- Johnson, A., Carew, E., Sloman, K.A., 2007. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 84, 431-438.
- Kane, A.S., Salierno, J.D., Gipson, G.T., Molteno, T.C., Hunter, C., 2004. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. *Water Res* 38, 3993-4001.
- Kennedy, C.J., P., F.A., 2006. Effects of exposure to the water-soluble fraction of crude oil on the swimming performance and the metabolic and ionic recovery postexercise in pacific herring (*clupea palasi*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2715–2724.
- Letcher, B.H., Rice, J.A., Crowder, L.B., Rose, K.A., 1996. Variability in survival of larval fish: disentangling components with a generalized individual-based model. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 787-801.
- Linbo, T.L., Stehr, C.M., Incardona, J.P., Scholz, N.L., 2006. Dissolved copper triggers cell death in the peripheral mechanosensory system of larval fish. *Environ Toxicol Chem* 25, 597-603.
- Little, E.E., and S.K. Brewer., 2001. Neurobehavioral toxicity in fish, in: Schlenk, D., Benson, W.H. (Eds.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts New Perspectives: Toxicology and the Environment*. Taylor and Francis, London.
- Little, E.E., Archeski, R.D., Flerov, B.A., Kozlovskaya, V.I., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology* 19, 380-385.
- McLusky, D.S., 1995. *Practical handbook of Marine Science* : Edited by M.J. Kennish; Times Mirror International Publishers, London (CRC Press, Boca Raton, FL); 1994;

2nd edition, 566 pp.; GBP 74.00; ISBN 0-8493-3712-7. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 185, 139-140.

Mehrle, P.M., Buckler, D.R., Little, E.E., Smith, L.M., Petty, J.D., Peterman, P.H., Stalling, D.L., 1988. Toxicity and Bioconcentration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran in Rainbow Trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 47-62.

Meniconi, M.F.G., Gabardo, I.T., 2002. Brazilian Oil Spills Chemical Characterization - Case Studies. *Environmental Forensics* 3, 303-321.

Morgan, M.J., Kiceniuk, J.W., 1990. Effect of fenitrothion on the foraging behavior of juvenile atlantic salmon. *ENVIRON. TOXICOL. CHEM.* 9, 489-495.

Murphy, C.A., Rose, K.A., Alvarez Mdel, C., Fuiman, L.A., 2008. Modeling larval fish behavior: scaling the sublethal effects of methylmercury to population-relevant endpoints. *Aquat Toxicol* 86, 470-484.

Nelson, J.A., 1990. Muscle metabolite response to exercise and recovery in yellow perch *Perca flavescens*: Comparison of populations from naturally acidic and neutral waters. *Physiol. Zool.* 63, 886-908.

Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*, 4th Ed. ed. John Wiley and Sons, London.

Paiva, A.C.G., 2009. *Ecologia de Peixes Estuarinos-ecifais e Caracterização Ambiental dos Estuários de Pernambuco*. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia. .

Peters, E.C., Gassman, N.J., Firman, J.C., Richmond, R.H., Power, E.A., 1997. *Ecotoxicology of Tropical Marine Ecosystems*. 16, 12-40.

Plaut, I., 2001. Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 131, 41-50.

Reidy, S.P., Kerr, S.R., Nelson, J.A., 2000. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic. *Cod. J. Exp. Biol.* 203, 347-357.

Saglio, P., Bretaud, S., Rivot, E., Olsen, K.H., 2003. Chemobehavioral changes induced by short-term exposures to prochloraz, nicosulfuron, and carbofuran in goldfish. *Arch Environ Contam Toxicol* 45, 515-524.

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.

Smith, G.M., Weis, J.S., 1997. Predator-prey relationships in mummichogs (*Fundulus heteroclitus* (L.)): Effects of living in a polluted environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 209, 75-87.

Souza, J.R.B., Carvalho, P.S.M., 2010. Bioindicadores e Biomarcadores no sistema bêntico, in: Leitão, S.N.O.E.D. (Ed.), *Bioindicadores de Qualidade Ambiental*. Instituto Brasileiro Pró-cidadania, Recife.

Thetmeyer, H., Kils, U., 1995. To see and not be seen: the visibility of predator and prey with respect to feeding behaviour. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 126, 1-8.

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.

Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Science of The Total Environment* 395, 87-100.

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*. Taylor and Francis, London, UK, Third Edition.

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. *Mar Environ Res* 55, 27-38.

Weis, J.S., Smith, G.M., Zhou, T., 1999. Altered predator/prey behavior in polluted environments: implications for fish conservation. *Environmental Biology of Fishes* 55, 43-51.

Weis, J.S., Weis, P., 1989. Effects of Environmental Pollutants on Early Fish Development. *Reviews in Aquatic Sciences* 1, 45-73.

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., Bertoletti, E., 2006. *Ecotoxicologia aquática-princípios e aplicações*, São Carlos.

Zhou, T., Scali, R., Weis, J.S., 2001. Effects of methylmercury on ontogeny of prey capture ability and growth in three populations of larval *Fundulus heteroclitus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 41, 47-54.

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.