TIAGO GABRIEL CORREIA

**INFLUÊNCIA DO ALUMÍNIO E DO pH ÁCIDO
SOBRE A FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE PEIXES
TELEÓSTEOS CONTINENTAIS**

São Paulo

2008

TIAGO GABRIEL CORREIA

**INFLUÊNCIA DO ALUMÍNIO E DO pH ÁCIDO
SOBRE A FISILOGIA REPRODUTIVA DE PEIXES
TELEÓSTEOS CONTINENTAIS**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre
em Ciências, na Área de
FISIOLOGIA.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Correia, Tiago G.

Influência do alumínio e do pH ácido sobre a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos continentais, 204 pg.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2008. Departamento de Fisiologia.

1– Fisiologia reprodutiva; 2 – Alumínio ; 3 pH ácido ; 4 –
Esteróides
5 – Biomarcadores; 6 – Peixes.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Orientador(a)

Dedico este trabalho:

*aos meus pais Carlos Alberto Correia
e Sônia Pinheiro Correia e às minhas irmãs
Ana Flavia e Thais Iara, que além de laços de sangue
são a essência de tudo que sou.*

Percebi ainda outra coisa debaixo do Sol:
Os fortes nem sempre triunfam na guerra;
Os sábios nem sempre tem comida;
Os prudentes nem sempre são ricos;
Os instruídos nem sempre tem prestígio;
Pois o tempo e o acaso afetam a todos. *Eclesiastes 9:11*

Tenham cuidado para que ninguém os escravize
a filosofias vãs e enganosas, que se fundamentam
nas tradições humanas e nos princípios elementares
deste mundo, e não tem Cristo. *Colossenses 2:8*

AGRADECIMENTOS

A bíblia diz: o que as suas mãos tiverem que fazer, que o façam com toda a sua força. Não sei o que seria de mim se não fosse a bondade e a misericórdia de Deus que me sustentaram ao longo de toda essa jornada e sem as maravilhosas pessoas que me ajudaram com amizade, carinho, respeito, solidariedade, conhecimento, sabedoria, prontidão, tolerância, paciência, honestidade, dedicação e amor.

Muitos são os nomes e rostos daqueles que tomaram parte deste momento tão especial na minha vida, mas seria uma negligência de minha parte não citar alguns desses nomes, então a todos vocês só me resta dizer uma coisa:

Muito obrigado!

Aos funcionários da Piscicultura de Ponte Nova: Marcos Daniel Reno de Faria, Milton Nunes de Santana (veio da piada) e em especial a Denésio Leite de Almeida (eterno palmeirense).

Ao Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAEE) por disponibilizar a Piscicultura de Ponte Nova para a realização dos ensaios com *Oreochromis niloticus*.

Aos grandes amigos Bruno (Magal), Marina e em especial ao Gustavo (Bingulo), pois não tenho como retribuir a uma amizade tão inestimável.

Aos *brothers* do apê, Rubão (Juntão) e Richard (Madruga) pelo apoio moral, pelo exemplo de caráter, pela manutenção e cuidados com o notebook e é claro, pela eterna amizade.

A toda a galera do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, Paulo, Jaboti, Vanessa, Cristiéle, Aline e em especial ao Jajá e Kadu (pelo apoio logístico) à Amanda, ao Renato, pelo apoio na preparação das lâminas histológicas, à Juliane Suzuki por sua colaboração nas análises dos esteróides e à Larissa Suzuki por sua incomparável excelência em todo tipo de atividades no laboratório.

Ao amigo Dr. Elton Colares (galôôô!) e sua família, por me abrigarem e me alimentarem enquanto estive no frio do Rio Grande concluindo parte de minhas análises.

À Sandra Carvalho, Indianara F. Barcarolli e Marianna B. Jorge, do Departamento de Ciências Fisiológicas – FURG pelo apoio nas análises físico – químicas e íons plasmáticos.

Ao professor André Fernando de Oliveria e Astrea Filomena S.Silva Laboratório de Pesquisa em Química Analítica e Físico-Química da UMC pelo apoio nas análises de água e no delineamento do desenho experimental com *A. fasciatus*.

À professora Dra. Maria Inês Borella do Laboratório de Endocrinologia de Peixes ICB/USP por ceder o seu laboratório para o processamento das análises histológicas, por toda sua atenção,

consideração e carinho e ao Cruz Alberto, pela ajuda nos cortes histológicos, sua prontidão e consideração para comigo.

Ao professor Dr. Adalto Bianchini do Departamento de Ciências Fisiológicas – FURG, por dedicar seu tempo para me ajudar, pelo companheirismo, cordialidade, paciência, amizade e principalmente por todos os ensinamentos, pois seus conselhos e conhecimentos foram essenciais neste trabalho.

Ao professor Dr. José Eduardo Bicudo e a professora Dra. Silvia Cristina Ribeiro Souza pelo uso do laboratório e da sala de estudos.

Ao Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf por ter gentilmente cedido os exemplares de *Oreochromis niloticus*.

Ao Coordenador do Programa de Pós – graduação, Dr. Gilberto Fernando Xavier por todo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro do projeto (Processo: 06/50920-5).

A minha família por me apoiar em todos os momentos e sempre me incentivar a seguir com meus sonhos.

À Celice, por estar sempre ao meu lado, por todo seu carinho, dedicação e amor incomparável.

À minha orientadora e amiga, Dra. Renata Guimarães Moreira, por ser a melhor orientadora do mundo, pela sua amizade, cuidados, consideração, dedicação, paciência, inteligência, respeito e principalmente por acreditar em mim e ser parte da concretização dos meus ideais.

Em especial agradeço a Deus por colocar pessoas abençoadas no meu caminho, e por me confortar com sua palavra todos os dias da minha vida.

Índice

Lista de Abreviações	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Anexos	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
2. Objetivos	16
2.1 – Objetivo geral	16
2.2 – Objetivos específicos	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1 – Testes preliminares	17
3.1.a– Testes para ensaios com <i>Astyanax fasciatus</i>	17
3.1.b– Testes para ensaios com <i>Oreochromis niloticus</i>	19
3.2 – Preparação e manipulação do contaminante metálico	20
3.3 – Ensaio de toxicidade	21
3.4 – Desenho experimental	22
3.4.1 – Ensaio de Toxicidade crônica	22
3.4.2 – Ensaio de Toxicidade aguda	25

3.5 – Características das espécies modelo	28
3.5.1 – <i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier, 1819)	28
3.5.2 – <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)	29
3.6 – Técnicas analíticas e monitoramento dos bioensaios	30
3.7 – Amostras de tecido e plasma	31
3.8 – Biomarcadores	32
3.8.1 – Biomarcadores morfológicos	32
3.8.2 – Biomarcadores fisiológicos	33
3.9 – Análise histopatológica do epitélio branquial	34
3.10 – Análise estatística	34
4. Resultados	35
4.1 – Composição iônica e características limnológicas	35
4.2 – Variáveis experimentais e ensaios de toxicidade	36
4.2.1 – Temperatura e oxigênio dissolvido	36
4.2.2 – pH	37
4.2.3 – Compostos nitrogenados	38
4.2.4 – Alumínio	39
4.3 – Interações comportamentais	42
4.4 – Sobrevivência	43
4.5 Hormônios esteróides	44
4.5.1 – Cortisol	44
4.5.2 - 17 α -Hidroxiprogesterona (17 α OHP)	45
4.5.3 – Estradiol (E ₂)	46

4.6 – Substratos energéticos	46
4.6.1 – Lipídios totais	46
4.6.2 – Proteínas totais	48
4.7 – Íons plasmáticos	48
4.7.1 - Ca^{2+}	48
4.7.2 - Na^{+}	49
4.7.3 - K^{+}	49
4.7.4 – Cl^{-}	49
4.7.5 Mg^{2+}	50
4.8 – Osmolalidade	50
4.9 – Análise morfológica e Microscópica	50
4.9.1 – Ovários	50
4.9.2 – Fígado	53
4.9.3 – Brânquias	55
4.10 – Índice gonadossomático (IGS)	57
4.11 – Índice hepatossomático (IHS)	58
4.12 – Massa corpórea	58
5. Discussão	59
5.1 – A relação entre as características da água e os ensaios realizados	59
5.2 – Biomarcadores utilizados nos ensaios com <i>A. fasciatus</i> e <i>O. niloticus</i>	74

6. Conclusões	99
6.1 - <i>Astyanax fasciatus</i>	99
6.2 – <i>Oreochormis nilocitus</i>	100
7. Referências bibliográficas	101
8. Figuras	128
9. Tabelas	177
10. Anexos	179

Lista de Abreviações

17 α -OHP - 17 α Hidroxiprogesterona
17 α ,20 β DHP - 17 α , 20 β -dihydroxy – 4 –pregnen – 3 – one
ACTH - Hormônio Adrenocorticotrópico
ALT - Alanina Transaminase
ANOVA – Análise de Variância
AST - Aspartato Transaminase
cAMP – adenosina monofosfato cíclico
CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT - Carbono Orgânico Total
CYP 19 α - P450 aromatase 19 α
DSL - Diagnostic Systems Laboratories
E₂ - 17 β - Estradiol
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA - Elisaimunoensaio
ER-E₂ - Receptores Específicos de Estradiol
FSH - Hormônio Folículo Estimulante
FURG - Fundação Universidade Federal do Rio Grande
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotropinas
GtH I - Gonadotropina I
GtH II - Gonadotropina II
H.E - Hematoxilina - Eosina
HSP - Heat Shock Proteins
IB/USP - Instituto de Biociências da USP
IGS - Índice Gonadossomático
IHS: Índice Hepatossomático
LDH - Lactato Desidrogenase
LH - Hormônio Luteinizante
Lt – Lipídios Totais
MDH - Malato Desidrogenase
MIS - Maturation - Inducing Steroid

metHb - Meta-Hemoglobina

MOD - Matéria Orgânica Dissolvida

MS-222 - Tricafina Metanosulfonato

OD - Oxigênio Dissolvido

Pt – Proteínas Totais

P450 scc - Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme

RNAm – RNA Mensageiro

SMA - Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo

T4 - Tiroxina

VTG - Vitelogenina

Wg - Massa das gônadas

Wh - Massa do Fígado

Wt - Massa corpórea

Lista de Tabelas

Tabela 01: Dados morfométricos e ponderais (valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão).

Tabela 02: Composição iônica da água (Unidade = Mm).

Tabela 03: Variáveis limnológicas analisadas.

Lista de Figuras

FIGURA 01. Concentração de alumínio total em testes com EDTA

FIGURA 02. Concentração de alumínio em testes sem EDTA

FIGURA 03. Panorama geral e atividades que antecederam o início da realização dos ensaios crônicos com *Astyanax fasciatus*. **A e B:** Barragem de Ponte Nova – Salesópolis – SP; **C** : Rio Tietê, em trecho ainda preservado e isento de ação antrópica, local de captura dos animais; **D** : Rio Tietê, trecho próximo a comporta da Barragem de Ponte Nova, área influenciada por atividade antrópica mas sem poluição; **E:** Manejo dos animais nos tanques de cultivo; **F:** Tanques de cultivo na piscicultura de Ponte Nova, local onde os animais ficaram confinados antes do experimento; **G e H:** Caixas plásticas no biotério do Instituto de Biociências da USP, local onde os experimentos foram realizados.

FIGURA 04. Água do reservatório da Barragem de Ponte Nova antes de se tornar ideal para a utilização nos bioensaios.

FIGURA 05. Água com solução estoque de alumínio após período de 12 horas para decantação das partículas em suspensão. Detalhe de material decantado (seta).

FIGURA 6. Etapas dos experimentos com *Oreochromis niloticus*. **A:** Manejo e captura dos animais nos tanques de cultivo; **B:** Monitoramento da qualidade de água; **C e D:** Disposição das caixas experimentais e local onde os ensaios agudos ocorreram.

FIGURA 7: Espécies modelo escolhidas para este estudo no momento da coleta de material biológico. **A:** *Astyanax fasciatus* em destaque; **B:** *Oreochromis niloticus* em destaque; **C e D:** Coleta de sangue; **E e F:** Incisão na região ventral expondo os órgãos a serem coletados (ov = ovário; fg = fígado).

FIGURA 8: *Astyanax fasciatus*: **A**: Aspecto macroscópico das Gônadas em estágio maduro maduras; **B**: Fígado – Aspecto macroscópico.

FIGURA 9: *Oreochromis niloticus*: **A**: Aspecto macroscópico das Gônadas em estágio maduro na cavidade abdominal; **B**: Fígado – Aspecto macroscópico.

FIGURA 10. Variação do pH no experimento agudo com *O. niloticus*, grupo alumínio em pH neutro.

FIGURA 11. Variação do pH no experimento agudo com *O. niloticus*, grupo alumínio em pH ácido.

FIGURA 12. Variação do pH no experimento agudo com *O. niloticus*, grupo controle.

FIGURA 13. Variação do pH no experimento agudo com *O. niloticus*, grupo controle em pH ácido.

FIGURA 14. Variação do pH no experimento crônico com *A. fasciatus* realizado em dezembro de 2006. (**C** = controle, **A** = alumínio em pH neutro, **B** = alumínio em pH ácido).

FIGURA 15. Variação do pH no experimento crônico com *A. fasciatus* realizado em fevereiro de 2007. (**C** = controle, **A** = alumínio em pH neutro, **B** = alumínio em pH ácido).

FIGURA 16. Variação de amônia durante os experimentos piloto com *A. fasciatus*.

FIGURA 17. Variação de amônia durante dezembro de 2006.

FIGURA 18. Variação de amônia durante fevereiro de 2007.

FIGURA 19: Variação de nitrito (NO_2). Ensaio crônico realizado em dezembro de 2006.

FIGURA 20: Variação de nitrito (NO_2): Ensaio crônico realizado em fevereiro de 2007.

FIGURA 21: Variação de amônia (NH_3): Ensaio agudo. Os asteriscos indicam os momentos seguidos às trocas de água.

FIGURA 22: Variação de nitrito (NO_2): Ensaio agudo. Os asteriscos indicam os momentos seguidos às trocas de água.

FIGURA 23. Comportamento da concentração de alumínio. **A:** Concentração de alumínio lábil nas horas iniciais do experimento crônico realizado em dezembro de 2006; **B** e **C:** Concentração de alumínio lábil e total, respectivamente do experimento crônico realizado em dezembro de 2006. **C** = controle, **A** = Alumínio em pH neutro, **B** = alumínio em pH ácido.

FIGURA 24: Concentração de alumínio lábil entre os grupos experimentais no experimento crônico com *A. fasciatus* realizado em fevereiro de 2007. **C** = controle, **A** = Alumínio em pH neutro, **B**= alumínio em pH ácido.

FIGURA 25: Concentração de alumínio total entre os grupos experimentais no experimento crônico com *A. fasciatus* realizado em fevereiro de 2007. **C** = controle, **A** = Alumínio em pH neutro, **B** = alumínio em pH ácido

FIGURA 26: Concentração de alumínio lábil entre os grupos experimentais no experimento agudo com *O. niloticus*. **C** = controle em pH neutro, **A** = alumínio em pH neutro, **D** = controle em pH ácido, **B** = alumínio em pH ácido. Os (*) indicam os momentos de troca de água.

FIGURA 27: Concentração de alumínio total entre os grupos experimentais no experimento agudo com *O. niloticus*. **C** = controle em pH neutro, **A** = alumínio em pH neutro, **D** = controle em pH ácido, **B**= alumínio em pH ácido. Os (*) indicam os momentos de troca de água.

FIGURA 28: Exemplar de *A. fasciatus* morto durante o período experimental em resultado das severas agressões recebidas pelos demais espécimes. A região do círculo demonstra a nadadeira caudal parcialmente devorada, a seta aponta para local de agressão com perda de tecido.

FIGURA 29: Cortisol plasmático. **A:** Ensaios com *A. fasciatus*; **B:** Ensaios com *O. niloticus*. Letras diferentes significam valores estatisticamente distintos.

FIGURA 30: Progesterona plasmática. **A:** Ensaios com *A. fasciatus*; **B:** Ensaios com *O. niloticus*. Letras diferentes significam valores estatisticamente distintos.

FIGURA 31: Estradiol plasmático. **A:** Ensaios com *A. fasciatus*; **B:** Ensaios com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam valores estatisticamente distintos.

FIGURA 32: Concentração média de lipídios totais nos ensaios crônicos com *A. fasciatus*. A: Lipídios gonadais; B: Lipídios hepáticos; C: Lipídios plasmáticos. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 33: Concentração média de lipídios totais nos ensaios agudos com *O. niloticus*. A: Lipídios gonadais; B: Lipídios hepáticos; C: Lipídios plasmáticos. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 34: Concentração média de proteínas totais nos ensaios crônicos com *A. fasciatus*. A: Proteínas gonadais; B: Proteínas hepáticas; C: Proteínas plasmáticas. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 35: Concentração média de proteínas totais nos ensaios agudos com *O. niloticus*. A: Proteínas gonadais; B: Proteínas hepáticas; C: Proteínas plasmáticas. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 36: Concentração plasmática do íon cálcio. **A:** Ensaio crônico com *A. fasciatus*; **B:** ensaio agudo com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 37: Concentração plasmática do íon sódio. **A:** Ensaio crônico com *A. fasciatus*; **B:** ensaio agudo com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 38: Concentração plasmática do íon potássio. **A:** Ensaio crônico com *A. fasciatus*; **B:** ensaio agudo com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 39: Concentração plasmática do íon cloreto. **A:** Ensaio crônico com *A. fasciatus*; **B:** Ensaio agudo com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 40: Concentração plasmática do íon magnésio nos ensaios crônicos com *A. fasciatus*.

FIGURA 41: Concentração osmótica plasmática de *O. niloticus*.

FIGURA 42: Cortes histológicos dos ovários de *Astyanax fasciatus*. **A e B: Grupo Controle** - Maturação avançada, OV = oócitos vitelogênicos; N = com núcleo central, seta = oócitos perinucleolares; **C:** Grupo em exposição ao alumínio em pH neutro - presença de oócitos perinucleolares e cortical alveolares mais pronunciada do que no grupo controle: OV = oócitos vitelogênicos, N = com núcleo central, seta = oócitos perinucleolares, CA = oócito cortical alveolar, V = formação de vitelo; **D:** Grupo em exposição ao alumínio em pH neutro – Presença de oócitos maduros com abundantes glóbulos de vitelo (GV); PN = oócitos perinucleolares, seta = nucléolos. **A:** aumento de (400x); **B,C, D:** aumento de (25x).

FIGURA 43: Cortes histológicos dos ovários de *Oreochromis niloticus*. **A:** Grupo alumínio em pH neutro. Aspecto microscópico de um ovário maduro OV = oócitos vitelogênicos; N = com núcleo central; **B:** Grupo alumínio em pH ácido. Aspecto de um oócito vitelogênico, VL = vacúolos vitelogênicos, GV = glóbulos de vitelo, seta = camada folicular; **C e D:** Grupos controle em pH neutro e controle em pH ácido, respectivamente. Características do ovário de uma espécie de desova parcelada com oócitos em vários estádios de desenvolvimento, com maior destaque aos

oócitos vitelogênicos (OV). Oócitos perinucleolares (seta), oócitos cortical alveolares (CA). **A, C, D:** aumento de (25x); **B:** aumento de (100x).

FIGURA 44: Cortes histológicos do fígado. **A:** *A. fasciatus*. Presença de vasos sanguíneos e eritrócitos no tecido hepático (seta); **B:** *A. fasciatus*. Grupo em exposição ao alumínio. Presença de linfócitos no tecido hepático, (seta). Hepatócitos descaracterizados, nota-se uma desagregação celular, o que descaracteriza o tecido. **C:** *A. fasciatus*. Grupo em exposição ao alumínio. Tecido hepático com células hipertrofiadas, o círculo destaca os hepatócitos hipertrofiados. **D:** *A. fasciatus*. Grupo em exposição ao alumínio em pH ácido. As setas indicam a presença de células linfocitárias no tecido hepático. Reparar alterações morfológicas na estrutura dos hepatócitos; **E:** *O. niloticus*. Grupo em exposição ao alumínio. Notar as células hipertrofiadas no tecido hepático; **F:** *O. niloticus*. Grupo com exposição ao alumínio em pH ácido. Tecido hepático. As áreas mais escuras pertencem ao sistema vascular. **A e D:** aumento de (100x); **B, E, F:** aumento de (200x); **C:** aumento de (400x).

FIGURA 45: Cortes histológicos do tecido branquial de *A. fasciatus*. **A:** Grupo controle, LS = lamela secundária, LP = lamela primária, (aumento de 100x); **B:** Grupo Controle. Detalhe da disposição lamelar isenta de fusão e/ou colapso entre si. (aumento de 400x); **C:** Grupo em exposição ao alumínio em pH neutro. Em destaque (círculo) colapso deste epitélio e fusão lamelar em processo inicial (aumento de 100x); **D:** Grupo em exposição ao alumínio, detalhe do epitélio respiratório, com inúmeras telangiectasias (T) e fusão no epitélio lamelar (F) (aumento de 200x); **E:** Grupo em exposição ao alumínio em pH neutro. Intensa fusão lamelar em todo o tecido, EC = ectasias (aumento de 100x). **F:** Grupo alumínio em pH ácido. Corte histológico de um exemplar sobrevivente durante o período experimental. Notar os mesmos padrões patológicos observados em (E). HP = células hipertrofiadas (aumento de 200x).

FIGURA 46: Cortes histológicos do tecido branquial de *O. niloticus*. **A e B:** Grupos controle, E = ectasias em formação. A região dentro do círculo em destaque aponta colapsos na região da lamela secundária, observar o

desprendimento epitelial celular nestas mesmas lamelas (seta); **C**: Grupo alumínio em pH ácido. Presença de ectasia (E), F= fusão das lamelas secundárias e alteração no epitélio (seta); **D**: Grupo alumínio em pH ácido. A área delimitada dentro dos círculos indica alteração no epitélio, observar o estreitamento da lamela secundária (seta). **E**: Grupo alumínio em pH neutro. A área dentro do círculo indica fusão nas lamelas, alteração no epitélio (setas). **F**: Grupo controle em pH neutro. Desprendimento epitelial celular das lamelas secundárias (seta) e áreas de alteração epitelial (x). Em todas as imagens, o aumento é de 100x.

FIGURA 47. Índice gonadossomático. **A**: *A. fasciatus*; **B**: *O. niloticus*.

Letras diferentes significam valores estatisticamente distintos.

FIGURA 48: Índice hepatossomático. **A**: *A. fasciatus*; **B**: *O. niloticus*.

FIGURA 49: Índice de massa corpórea. **A**: *A. fasciatus*; **B**: *O. niloticus*.

Lista de Anexos

ANEXO 1: Protocolos de Análises dos esteróides.

ANEXO 2: Análises de substratos metabólicos

ANEXO 3: Protocolos de análises de água

Resumo

A reprodução em peixes é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e os fatores que alteram o funcionamento adequado deste eixo são chamados de disruptores endócrinos. Muitos metais têm o papel de disruptores endócrinos e dentre eles destaca-se o alumínio que, além de afetar o sistema endócrino de algumas espécies de peixes, pode alterar a deposição e/ou mobilização de substratos energéticos nestes animais. Sabe-se que o pH pode modular em muitos casos as respostas fisiológicas decorrentes da exposição de peixes a alguns metais, como é o caso do alumínio. Desta forma, o presente trabalho objetiva avaliar as possíveis alterações na fisiologia reprodutiva de duas espécies de peixes teleósteos continentais quando os mesmos são expostos às altas concentrações de alumínio e em pH ácido. Para avaliar estes efeitos foram conduzidos 2 tipos de experimentos: um crônico, realizado com fêmeas de uma espécie de desova total (sincrônica em grupo), *Astyanax fasciatus* (lambari), durante a sua fase reprodutiva, pelo período de 14 dias; e outro agudo, pelo período de 96 horas, com fêmeas de *Oreochromis niloticus* (tilápia), espécie de desova parcelada (assincrônica) também em fase reprodutiva. Foram determinadas as concentrações plasmáticas de hormônios esteróides como o cortisol, o estradiol e a 17 α OHP utilizando-se kits de elisaimunoensaio; substratos energéticos, como proteínas e lipídios, no fígado, plasma e gônadas, assim como os principais íons plasmáticos (cálcio, potássio, cloro, magnésio e sódio) também foram analisados. Análises histológicas das gônadas, fígado e brânquias foram conduzidas com a finalidade de avaliar o efeito do alumínio e do pH ácido nestes tecidos. Os resultados do presente trabalho evidenciam que o alumínio e o pH ácido afetam a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos, mas o efeito deste metal está relacionado à estratégia reprodutiva dos animais. Os dados mostram que em peixes de desova total, como o lambari, os efeitos do alumínio são mais evidentes na fase de vitelogênese, alterando a ação dos estrógenos e os processos de mobilização de lipídios e proteínas em uma fase anterior à maturação final. Já na tilápia, os efeitos do alumínio e do pH ácido são mais evidentes na fase de maturação final e ovulação, uma vez que alterações foram observadas na concentração do progestágeno 17 α OHP, precursor do MIS em peixes teleósteos.

Abstract

Fish reproduction is controlled by the hypothalamic-pituitary-gonad axis and factors that alter the normal function of this axis are known as endocrine disrupters. Many metals act as endocrine disrupters, including aluminium, a metal that affects endocrine and metabolic parameters in fish. It is also known that the pH can alter the endocrine disruptor effect of metals such as aluminium in fish. Considering that, this work aims to analyze the alterations in the reproductive physiology of two freshwater teleosts exposed to high aluminium concentrations in an acidic pH environment. To evaluate these effects, two experiments were conducted: the first experiment was designed to evaluate chronic effects by using mature *Astyanax fasciatus* females, a group synchronic species over a 14 day period; the second experiment was aimed to assess acute effects over a 96 hour period using *Oreochromis niloticus* mature females, an asynchronous species. The plasma profile of the steroids hormones, cortisol, estradiol and 17 α OHP were analyzed using EIA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) kits. Metabolic substrates as protein and lipids were analyzed in liver, gonads and plasma and the main plasmatic ions (potassium, sodium, chloride, magnesium and calcium) were also determined. Histological analyses were performed in liver, gonads and gills to evaluate the influence of aluminium on these organs. The results showed that aluminium as well as the acidic pH affects the reproductive physiology of the analyzed species, but the effects were different, according to the reproductive strategy of the respective species. Group synchronic species suffer from the aluminium effects in vitellogenic events, such as estradiol, lipid and protein concentrations in a period prior to final maturation. In contrast, the effects of aluminium and pH in tilapia were more evident in final maturation/ovulation processes than in vitellogenesis, as a result of alteration in the 17 α OHP concentration, the MIS (maturation induction steroid) precursor in teleosts.

1. INTRODUÇÃO

As últimas décadas do século XX e os primeiros anos do novo milênio têm sido marcados pelo despertar da sociedade humana para a exploração sustentável dos recursos naturais e ações de preservação da Biosfera frente às atividades extrativistas geradoras de degradação. Diante deste quadro, sem assumir uma postura pejorativa, perspectivas nefastas não seriam lúgubres a ponto de devanear uma possível extirpação biológica.

Entre os diversos problemas ecológicos e a dúbia postura da sociedade em enfrentar veemente estes males, a poluição se propaga em proporções inconcebíveis e provavelmente irreparáveis, se constituindo em um dos maiores desafios a serem enfrentados pela humanidade atualmente.

Todos os ecossistemas da biota terrestre têm sofrido severas injúrias de origem antrópica, e atualmente ainda não se dispõe de um modelo teórico e instrumental adequado para interagir com a complexa temática ambiental que governa o planeta (Elliott, 2002).

Entre todos os impactos ambientais causados pelo homem, a poluição das águas mostra-se como a mais nociva. Grande parte da humanidade vive sob perigo de doenças transmitidas pela água e pela falta de abastecimento. Além disso, também são observados efeitos subletais que podem apresentar conseqüências imprevisíveis para a fauna aquática, como por exemplo, problemas biológicos, tais como, mudanças nas funções celulares, metabólicas, bioquímicas,

fisiológicas e até mesmo na dinâmica ecológica das comunidades e distúrbios sobre o índice de integridade biótica (Araújo, 1998).

Os peixes são um modelo muito importante para se avaliar o real estado de conservação de um corpo d'água, sendo isto evidenciado desde a década de 40 (Heath, 1995). Nenhuma massa d'água pode ser considerada em condições satisfatórias se nela não viverem e proliferarem organismos aquáticos (Heath, 1995). A real condição de preservação de um ambiente aquático só é possível de ser avaliada, ao se mensurar o grau de poluição, para que dessa forma sejam tomadas as iniciativas para minimizar seus impactos e controlar com ações preventivas ou corretivas, seus efeitos. Neste contexto, conhecer a toxicidade específica de certos poluentes e sua influência sobre a fauna íctica, constitui uma ferramenta valiosa nas atividades destinadas à preservação do ambiente aquático (Mucci *et al*, 1987).

As águas continentais encontram-se impactadas por uma grande variedade de poluentes cujas fontes principais são os efluentes líquidos de origem doméstica e industrial que muitas vezes não recebem o tratamento adequado. A enorme diversidade e complexidade destes poluentes resultam em efeitos biológicos diversos. Tais efeitos e conseqüências estão relacionados com a composição química de cada poluente despejado no ambiente aquático e da interação entre ambos (Zagatto & Bertoletti, 2006).

As vastas categorias químicas dos poluentes aquáticos se expressam de maneiras diferentes dependendo do tipo de ambiente (dulcícola, marinho, estuarino), além disso, os efluentes aquáticos contêm mais de um contaminante, o

que pode resultar em interações toxicológicas com possíveis efeitos sinérgicos, antagônicos, de potenciação ou de adição (Mozeto & Zagatto, 2006). Neste contexto estão inseridos os poluentes, ou contaminantes químicos da classe dos metais, mais comumente citados na literatura como metais pesados.

A riquíssima composição de água doce em todo território nacional apresenta vários rios em severas condições de impacto causados por poluentes, em grande escala por metais. O Rio Tietê pode ser incluído nessas condições e um fato preocupante é que este rio é um dos mais importantes do Estado de São Paulo, abastecendo importantes municípios como a própria cidade de São Paulo. Este rio nasce no município de Salesópolis, a 96 km da capital e dirige-se para o interior do estado. Após percorrer 3500 km, desemboca no mar junto com os rios Paraná e Prata (Adorno, 1999).

A Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA) considerou a bacia do Alto Tietê como de alta prioridade no Programa de Gestão Integrada de Ativos Ambientais, cujo objetivo geral é: “Estimular a adoção de práticas sustentáveis entre os diversos setores cujas atividades impactam o meio ambiente e para o fortalecimento da infra-estrutura organizacional e de regulamentação do poder público para o exercício da gestão ambiental, melhorando a qualidade ambiental e gerando benefícios sócio-econômicos” (PNMA, 2001).

Sabe-se que o rio Tietê apresenta vários problemas relacionados à poluição, dentre eles a contaminação por metais, e se observam altas concentrações de alumínio, com valores desde 1,81 mg/L até 5,47mg/L (CETESB, 2004, 2006), o que corresponde à cerca de 18 vezes excedente o valor

recomendado pelo (CONAMA, 2005). O trecho que passa por Mogi das Cruzes ainda apresenta várias populações de peixes que ali sobrevivem, entretanto, ainda não existem muitos dados sobre as condições fisiológicas e ecológicas destas populações.

Os efeitos tóxicos do alumínio são potencializados nos ambientes onde o pH é ácido, situação esta bem comum no referido trecho do Tietê, onde os valores de pH variam entre 5,28 a 6,8 (CETESB, 2004, 2006).

O alumínio é um metal que não ocorre em estado puro na natureza, ele é encontrado de forma combinada em rochas e minerais (devido à alta afinidade pelo oxigênio). Embora constitua apenas cerca de 1% da massa da Terra, o alumínio é o primeiro metal e o terceiro elemento químico (O = 45,5%; Si = 25,7%; Al = 8,3%; Fe = 6,2%; Ca = 4,6%; outros = 9,7% em massa) mais abundante da crosta, e que pode ser economicamente explorado pelo homem (Constantino *et al*, 2002).

O alumínio é encontrado em rochas ígneas, com feldspatos (aluminossilicatos tridimensionais), micas (silicatos lamelares) e em minerais como a criolita, espinélio, granada, berilo e coríndon. Muitas pedras preciosas contêm alumínio, como o rubi e safira, por exemplo. O minério de importância industrial para obtenção do alumínio é a bauxita, que se forma em regiões tropicais e subtropicais pela força das intempéries (Constantino *et al*, 2002).

O alumínio não é muito solúvel em água, entretanto a chuva ácida (formando ácidos inorgânicos) pode solubilizar parte deste metal, e uma vez no meio aquoso pode apresentar numerosas formas. A forma catiônica pode reagir

com diversos ânions produzindo uma diversidade de complexos. Na ausência significativa de ânions, o alumínio vai formar hidróxidos e a relativa estabilidade destes hidróxidos vai ocorrer em função do pH e da concentração aniônica (Smith, 1996).

Alguns ácidos orgânicos como o cítrico, oxálico e tartárico presentes no meio aquático podem solubilizar o alumínio a partir da bauxita apenas por causar uma simples diminuição no pH. Concomitantemente a estes eventos, a ocorrência de substâncias húmicas que estão presentes naturalmente nas águas continentais contêm grupos carboxil e fenólicos que reagem fortemente com íons de alumínio. Muitas destas espécies orgânicas podem promover a formação de gibsit, conferindo assim um processo natural de controle do alumínio (Smith, 1996). Estes processos geralmente ocorrem em áreas íntegras, ou com baixos índices de agressão antrópica.

O alumínio dissolvido na água pode ocorrer em diferentes formas físico-químicas, desde simples formas iônicas a polímeros, colóides e partículas. O principal fator abiótico que influencia as diferentes espécies químicas apresentadas por este metal é o pH (Teien, 2007). De maneira geral, pode-se dizer que o pH tem um forte controle na especiação de metais, pois determina hidrólise metálica, polimerização, agregação, precipitação e a competição de prótons por locais de ligação disponíveis (Smith, 2002).

As espécies inorgânicas de alumínio ocorrem desde pH 7,2 com mudanças de formas predominantemente iônicas hidroxiladas complexas para vários tipos de monômeros e polímeros de hidróxidos de alumínio, e em baixo pH, quando

surgem as formas iônicas livres. Estas mudanças nas formas do alumínio em função do pH é que influenciam a toxicidade para os peixes (Guibaud, 2005).

As formas hidroxiladas $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$ e $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ que ocorrem em uma faixa de pH neutro estão entre as espécies tóxicas para a vida aquática, entretanto, a forma iônica livre (Al^{3+}), que ocorre a partir de pH 5,5 tem se mostrado ser a mais tóxica (Berthon, 2002).

A concentração da espécie química dominante deste metal ocorre em função não apenas do pH, mas também pela ação da temperatura da água, força iônica e pela influência de ligantes inorgânicos: fluoretos (F^-), sulfatos (SO_4^{2-}) e $\text{Si}(\text{OH})_4$; além de matéria orgânica como ácido húmicos e fulvicos. Não apenas a concentração é importante para determinar os efeitos tóxicos, mas também a distribuição das espécies metálicas e em particular a sua estabilidade (Guibaud, 2005).

Alguns complexos de alumínio são muito estáveis e tal estabilidade depende da acidez da solução, aumentando conforme o pH é maior do que 7. Esta estabilidade é levemente mais fraca nos ambientes estuarinos e marinhos, provavelmente devido à alta força iônica para hidrólise nestes ambientes que influenciam fortemente a complexação de íons metálicos trivalentes (Alberti, 2005).

É geralmente aceito que espécies de alumínio de menor peso molecular, principalmente de natureza inorgânica são primariamente responsáveis pela toxicidade na água porque são capazes de passar através de membranas biológicas (Gensemer, 1999). A maior parte das espécies de alumínio na água é

derivada de hidróxidos, apesar disso, a matéria orgânica de composição heterogênea e sílica (oligomérica) tem o papel mais importante na biodisponibilidade do alumínio. A complexação de metais pesados por matéria orgânica natural, especialmente substâncias húmicas é um importante processo nas águas naturais, solos e sedimentos (Tipping, 2005).

A separação das espécies de alumínio seria a estratégia ideal em análises de toxicidade, mas tal procedimento é extremamente difícil, pois um re-equilíbrio entre as espécies químicas pode ocorrer durante o processo de determinação do metal ou na coleta de amostras (Lian *et al.*, 2004). De uma forma geral, um apurado conhecimento sobre a química do alumínio em águas naturais é essencial para o entendimento da toxicidade e biodisponibilidade (Alberti *et al.*, 2005).

Em países escandinavos o alumínio juntamente com o pH ácido são agentes tóxicos tão intensos sobre a fauna íctica que promoveram declínios e até mesmo a eliminação total da população natural de peixes. Fatidicamente, estes efeitos não são recentes sobre aquela região, com dados na literatura desde os anos 50 (Poléo, 1997).

Atualmente se sabe que os íons de alumínio e não de hidrogênio (H^+) são os principais responsáveis pela morte dos peixes nestas águas. As formas inorgânicas de baixo peso molecular de alumínio, freqüentemente referido como alumínio inorgânico monomérico foram apontadas como as mais tóxicas para os peixes naquela região (Alberti *et al.*, 2005).

Muito da literatura básica sobre os efeitos do alumínio em peixes se refere a trabalhos com salmonídeos, (Allin & Wilson, 2000), no entanto estes estudos

foram baseados na sobrevivência em campo, com a sensibilidade dos animais correlacionada ao pH da água e não a concentração metálica como a principal causa (fonte) da toxicidade do alumínio (Poléo, 1997).

Poléo (1995), demonstrou que a toxicidade do Al em pH ácido é mais prejudicial do que apenas a toxicidade causada pelo pH baixo durante exposições agudas e mostrou ainda que a toxicidade do alumínio também depende da temperatura, sendo mais tóxico conforme esta aumenta. Infelizmente mais dados que ratifiquem estas evidências ainda são escassos na literatura.

O efeito de acidificação da superfície das águas se destaca por resultar no declínio das populações naturais de peixes (Exley, 1997) e o alumínio é o principal agente tóxico em águas acidificadas (Exley, 1997). Muitos efeitos fisiológicos da exposição de peixes ao pH ácido já estão descritos na literatura, as observações iniciais datam da década de 70. Atualmente sabe-se que entre estes efeitos subletais, os de nível agudo mais comuns são: Alto consumo de oxigênio e altos níveis plasmáticos de glicose e cortisol (Tam, 1987), disfunções sobre a regulação iônica e osmótica branquial (influxo e efluxo) (Tam, 1987) e também sobre a atividade das enzimas anidrase carbônica e Na^+/K^+ ATPase (Buckler, 1994).

Entre os efeitos crônicos, ou secundários está a diminuição de processos dependentes de energia, como por exemplo, o crescimento e a reprodução (produção de ovos e deposição de vitelo) (Tam, 1987). A modulação endócrina também se destaca como freqüente resposta fisiológica frente ao estresse causado pelo pH ácido e, na maior parte das vezes com a participação do alumínio (Heath, 1995).

Dois hormônios hipofisários mostram-se sensíveis a este quadro: Prolactina e arginina vasotocina. A prolactina é importante por ter entre seus efeitos, a redução da permeabilidade no epitélio branquial (BROWN, 1993), e há indícios de que a arginina vasotocina também esteja envolvida em processos de osmorregulação (Heath, 1995).

Segundo Wendelaar Bonga (1997) o cortisol é obviamente é um hormônio extremamente importante nas respostas adaptativas ao estresse ácido, porém um outro hormônio que apresenta secreção aumentada neste tipo de situação é o ACTH, pois o pH ácido é um potente agente de ativação das células secretoras deste hormônio. Embora inúmeros hormônios participem da resposta fisiológica ao estresse ácido, com ou sem altas concentrações de alumínio, distúrbios sobre a síntese de vários hormônios são observados, entre os quais estão o cortisol, a prolactina e também hormônios da tireóide (Waring *et al.*, 1996).

As substâncias que poluem os ecossistemas e de alguma forma alteram o sistema endócrino dos animais são conhecidas *Endocrine Disrupting Chemicals* (do inglês, substâncias disruptoras, ou desreguladoras endócrinas). Estas substâncias ou xenobióticos, interferem sobre o sistema endócrino, alterando os processos de síntese e/ou degradação de hormônios, seja bloqueando os receptores hormonais ou mimetizando os hormônios verdadeiros, e da mesma forma que os hormônios, exercem efeitos biológicos em baixas concentrações (pg/L ou ng/L) (Matthiessen & Johnson, 2007).

Os disruptores endócrinos também podem causar efeitos carcinogênicos, reprodutivos, neurotóxicos e disparar respostas imunes. De forma geral estes

compostos são hormônios sintéticos, ou derivados de poluentes orgânicos que atuam da maneira supramencionada (Matthiessen, 2003). Embora não sejam propriamente disruptores endócrinos, metais como o alumínio interferem negativamente sobre a integridade de hormônios esteróides sexuais de peixes (Norris *et al.*, 2000).

Peixes que vivem em exposição crônica a metais apresentam alterações no metabolismo energético. Evidências apontam dificuldade em converter a energia do alimento consumido em massa corpórea, ou seja, populações de áreas poluídas apresentam indivíduos menores do que aqueles que vivem em áreas não poluídas (Levesque *et al.*, 2002). Estudos semelhantes demonstraram perturbações sobre o metabolismo de carboidratos (Sjobeck *et al.*, 1984 *apud* Levesque, 2002), com modificações na formação de glicogênio hepático em tilápias (Wendelaar Bonga, 1997), diminuição do estoque de lipídios nos músculos e vísceras (Munkittrickand & Dixon, 1988), além do aumento na atividade de enzimas metabólicas como a aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) (Vijayan, 1997).

A permanência de uma espécie em um ecossistema está em grande parte relacionada à sua capacidade reprodutiva. Em ambientes poluídos, todos os mecanismos de desintoxicação, bem como os que conferem tolerância são fundamentais para a sobrevivência da espécie; entretanto, a continuidade de cada espécie em ambientes poluídos, não apenas refere-se a faculdade de permanecer

no ambiente, mas também a sua capacidade de se reproduzir na presença dos poluentes (Kime, 1995).

Os peixes apresentam uma enorme variedade de padrões reprodutivos e diversas estratégias na forma como empregam recursos para este processo (Vazzoler, 1996). Considerando-se que cada espécie tem uma ocupação geográfica delimitada por fatores ecológicos, ela deve apresentar uma única estratégia reprodutiva e, para tanto, apresentar adaptações anatômicas, fisiológicas, comportamentais e energéticas específicas (Vazzoler, 1996). O período reprodutivo para peixes teleósteos tropicais está relacionado com os fatores ambientais, que por sua vez, agem conjuntamente sobre os organismos e possibilitam condições ideais e necessárias para a reprodução (Vazzoler, 1996).

Os fatores abióticos cuja importância está vinculada à reprodução destes animais são, o aumento do índice de chuvas, maior tempo na incidência da luz solar (fotoperíodo), elevação da temperatura, aumento no nível fluviométrico, e possivelmente outros fatores; contudo, a reprodução nos peixes, embora desencadeada primariamente por tais fatores, é modulada endogenamente através de um sistema neuroendócrino singular (Vazzoler, 1996).

O controle hormonal da reprodução em peixes ocorre através de um eixo neuroendócrino composto pelo hipotálamo – hipófise – gônadas. Os fatores ambientais modulam a atividade deste eixo e a série de eventos que se sucedem ocorre da seguinte maneira: O sistema sensorial capta as mudanças sazonais nos fatores ambientais (estímulos) e são transformados em uma resposta neuronal ou uma mensagem neuroendócrina até o hipotálamo (Korf, 2006).

A glândula pineal também participa deste controle, pois atua como um transdutor foto-neuroendócrino. Esta glândula contém fotorreceptores extraoculares que atuam como detectores de luminosidade (fotoperíodo) que regulam a síntese de um mensageiro neuroendócrino, a melatonina (Korf, 2006).

A atividade da melatonina não se restringe aos eventos reprodutivos através de estímulos hipotalâmicos, este hormônio está relacionado à regulação do ciclo circadiano, a síntese de prolactina, hormônio do crescimento, pigmentação e outros aspectos neuroendócrinos (Korf, 2006).

Sob a influência dos fatores ambientais (através do sistema sensorial) e também sob efeito modulador da melatonina, o hipotálamo passa a sintetizar e secretar um neurohormônio conhecido como GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) que estimula a adenohipófise a sintetizar as gonadotropinas (I e II), ou GtH I, análoga funcionalmente ao hormônio folículo estimulante de mamíferos (FSH) e GtH II, também análogo funcionalmente ao hormônio luteinizante de mamíferos (LH) (Rocha e Rocha, 2006).

Em fêmeas adultas de peixes teleósteos, a GtH I é transportada através do sangue até as gônadas (ovários), e na a camada de células foliculares, mais precisamente sobre a camada teca promove a síntese de testosterona (andrógeno) tendo o colesterol como molécula precursora. A testosterona é transportada à camada granulosa onde é convertida em 17β - estradiol (E_2) através do complexo enzimático citocromo P450 – aromatase (Billard, 1992).

O esteróide gonadal (E_2) é secretado dos ovários e via corrente sanguínea é transportado até o fígado. O núcleo dos hepatócitos possui receptores

específicos (ER) para este hormônio e promovem a transcrição de genes da vitelogenina (VTG), que consiste em uma complexa biomolécula de natureza lipoglicofosfoprotéica (Mommsen & Walsh, 1988). A VTG é transportada através do plasma sanguíneo até os oócitos juntamente com íons metálicos, como Ca^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} (Montorzi *et al.*, 1994; Montorzi *et al.*, 1995).

Os oócitos absorvem as moléculas de vitelogenina através de endocitose, mediada por receptores na membrana (Shibata, 1993), em seguida ela é proteoliticamente clivada em unidades menores: lipovitelina, fosvitina e fosvetes (Matsubara *et al.*, 1999), para então, finalmente ocorrer a produção de vitelo para nutrir os embriões em crescimento (Wahli, 1981).

Com a síntese de (E_2) e a exportação de vitelogenina pelo fígado, a hipófise, estimulada pelo GnRH passa a secretar a GtH II, que atua sobre a camada teca estimulando-a a sintetizar 17α -hidroxiprogesterona (17α OHP), que por sua vez é transportada a camada granulosa onde serve de substrato para a enzima 20β -hidroxiesteróide – desidrogenase passando a ser $17\alpha 20\beta$ dihidroxy-4-prenen-3-one, este é, o hormônio da maturação final e ovulação para a maioria de teleósteos (Nagahama, 1997).

As complexas vias metabólicas e moleculares da síntese da vitelogenina nos hepatócitos, são passíveis de ser afetadas por alumínio (Mugiya, 1998). Alguns poluentes, ao serem absorvidos, causam nos peixes sérios distúrbios endócrinos, metabólicos, ou ainda afetam a reprodução, sendo estes distúrbios, principalmente devido aos desajustes no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. (Nagahama, 1997). Estas manifestações dos efeitos da poluição sobre o controle

endócrino dos peixes podem ocorrer no hipotálamo, na hipófise, ou nas gônadas, além de interferir sobre o metabolismo hepático (Heath, 1995).

Entre os efeitos dos poluentes sobre o eixo endócrino, pode-se destacar diminuição na síntese dos esteróides gonadais, vitelogenina, gonadotropinas e aumento nos níveis de dopamina (Karels *et al.*, 1998). São relatadas também elevações nos níveis de cortisol em tilápias, (Foo & Lam, 1993), impedimento e/ou atraso no amadurecimento de espermatogônias em espermatócitos de *Oncorhynchus mykiss* (Karels *et al.*, 1998) além de elevação e/ou diminuição dos níveis de esteróides fora do período reprodutivo e inibição da síntese de gonadotropinas, com simultâneo bloqueio sobre as gônadas de responderem à ação destas (Cooney, 1995)

Considerar a reprodução, a tolerância ao estresse, a capacidade de aclimação e as atividades metabólicas e enzimáticas, por exemplo, são apenas alguns poucos parâmetros que podem ser empregados nos estudos voltados a avaliar os efeitos tóxicos e deletérios dos poluentes sobre o biótopo e a biocenose (Depledge, 1993). Embora as agressões aos ambientes não cessem, tais estudos são importantes para que ações sejam voltadas à preservação da biodiversidade e busquem modificar as taxas de extinções (Elliott, 2002).

Diante dos complexos mecanismos que envolvem a reprodução de peixes, os intrincados eventos que podem abranger a dinâmica de um composto metálico nos ecossistemas aquáticos e as demais manifestações biológicas e ecológicas, é imperativo uma interação interdisciplinar entre a fisiologia e a ecotoxicologia para uma melhor interpretação de eventos dessa natureza, e até o presente momento

as pesquisas nesta área para os peixes neotropicais abrangendo aspectos reprodutivos e metabólicos são escassas, ou inexistentes.

O objetivo principal desta pesquisa não é de relatar as condições e sobrevivência na exposição ao alumínio e pH ácido, mas sim o de avaliar tais efeitos sobre a reprodução, que por sua vez tem profunda relação com aspectos ecológicos, fisiológicos e de conservação das espécies em seu hábitat natural; portanto, para se alcançar tais objetivos, é necessário utilizar várias ferramentas que remetem a ecotoxicologia e que acabaram por estreitar a interface entre estas subáreas do conhecimento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho objetiva avaliar as possíveis alterações na fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos continentais quando os mesmos são expostos às altas concentrações de alumínio e em pH ácido.

2.2. Objetivos Específicos

Analisar os efeitos do alumínio no desenvolvimento ovariano, principalmente na fase de vitelogênese. Essa análise foi realizada utilizando-se como indicadores o índice gonadosomático e a análise microscópica dos ovários

Avaliar a influência do alumínio na concentração plasmática dos principais esteróides envolvidos no processo de vitelogênese e maturação final das gônadas, estradiol e progesterona, respectivamente, assim como os substratos energéticos, lipídios e proteínas.

Comparar o efeito da exposição do alumínio em espécies com diferentes estratégias reprodutivas, considerando-se ainda ensaios crônicos e agudos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Testes preliminares

A presença de íons metálicos dissolvidos na água resulta em uma série de reações físico-químicas com outras substâncias que também estejam dissolvidas na água, sendo estas reações influenciadas pelas próprias características físico-químicas deste meio. Nos ecossistemas aquáticos, alguns atributos dos íons metálicos, tais como, a concentração e as espécies químicas, são determinados e influenciados por eventos biogeoquímicos naturais, como também por ação antrópica.

Como apresentado anteriormente, este trabalho teve entre seus objetivos, avaliar os efeitos de um metal específico, o alumínio (Al_{13}) sobre a fisiologia de peixes teleósteos continentais, sendo necessário definir antecipadamente uma concentração específica do alumínio dissolvido na água.

3.1.a. Testes para ensaios com *Astyanax fasciatus*

Inicialmente, os ensaios utilizados foram do tipo estático (sem troca de água). Como em condições artificiais as forças que influenciam a dinâmica de um íon metálico dissolvido é diferente das que ocorrem no ambiente natural é preciso a realização de testes preliminares para estabelecer as concentrações pretendidas do metal dissolvido.

O alumínio dissolvido em meio aquoso teve seu comportamento observado em testes pilotos necessários para determinar a variação em sua concentração ao

longo do tempo. Nos experimentos pilotos (sem peixes), foram realizados testes adicionando-se EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético - $C_{10}H_{16}N_2O_8$) à água. O EDTA é um composto orgânico que age como ligante polidentado, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos (Kawamura, 2006). Esta propriedade proporciona o uso do EDTA como anticoagulante no sangue, pois "inativa" os íons cálcio, que promovem a coagulação sanguínea.

A habilidade do EDTA de se complexar e assim "inativar" íons metálicos é usada como antídoto para envenenamento por chumbo (Kawamura, 2006). O EDTA também está presente em detergentes e xampus, pois se combina com o cálcio e o magnésio, evitando que se precipitem com o produto, como acontece com o sabão quando usado com águas ricas em cálcio e magnésio (Kawamura, 2006).

Portanto, o EDTA foi utilizado durante os testes preliminares para avaliar o seu potencial em se complexar com o alumínio e assim manter mais estável a concentração deste metal dissolvido. A adição de EDTA leva à formação do complexo aniônico $Al(EDTA)^-$, aumentando a estabilidade do alumínio em formas solúveis.

Após os testes com e sem a aplicação do EDTA, os bioensaios foram conduzidos na ausência deste composto. Os resultados obtidos nestes testes iniciais estão demonstrados nas figuras 1 e 2.

Frente aos resultados obtidos com o EDTA e a decisão de não utilizá-lo nos experimentos, foi adicionado aos bioensaios o $NaHCO_3$, substância que teoricamente poderia auxiliar a manter o alumínio dissolvido em melhores

concentrações. Embora tenha sido utilizado nas duas etapas de testes com *A. fasciatus*, o mesmo não teve qualquer efeito observado sobre a concentração de alumínio.

3.1.b. Testes para ensaios com *Oreochromis niloticus*

Durante os testes com a espécie *O.niloticus* foi adotada uma nova metodologia, que se acreditou ser mais adequada a este tipo de estudo. Nesta etapa do experimento foi avaliado o efeito do alumínio sobre a espécie mencionada em ensaios do tipo agudo (96 horas) e dinâmico (com troca de água).

A introdução do alumínio na água ocorreu de maneira diferente da anterior, cuja metodologia está descrita no próximo item.

Os testes iniciais compreenderam filtração, decantação e transferência da água entre as caixas teste até que se alcançasse a condição ideal. A preparação dos bioensaios para este tipo de teste foi mais extensa, principalmente pelo fato de que a água utilizada com a primeira espécie de peixe foi obtida do sistema público de abastecimento e já havia passado por todo processo necessário para torná-la potável, reduzindo desta forma, uma série de inconvenientes; contudo, nesta etapa, a água utilizada foi obtida diretamente do reservatório da Barragem de Ponte Nova, sem ter recebido qualquer tipo de tratamento.

Após receber severa atenção para a remoção de partículas, odores e microorganismos através de processos de filtragem, o alumínio foi adicionado em um volume de água maior do que aquele que seria utilizado e deixado por 12 horas em descanso (decantação); este procedimento garantiu que grande parte do

material ainda em suspensão, tais como algas, fossem mais satisfatoriamente reduzidos. Apenas após ter sido manipulado desta maneira, o volume de água necessário foi cuidadosamente bombeado para outro recipiente onde o experimento foi conduzido.

3.2. Preparação e manipulação do contaminante metálico

O metal utilizado neste projeto foi o alumínio (Al_{13}) na forma de $AlK(SO_4)_2$. A massa de 1,1428 g deste sal, que corresponde a uma concentração de 0,5 mg/L de alumínio em 130L de água foi dissolvida primeiramente em um volume de 500 ml e a solução obtida foi transferida para caixas plásticas com o volume de 130 litros de água. Da mesma forma, 10g de $NaHCO_3$ também foram dissolvidos e adicionados. Este método foi adotado durante os ensaios com *A. fasciatus*.

Devido a uma série de dificuldades procedimentais enfrentadas para a realização dos ensaios com *A. fasciatus*, um novo método foi adotado para os ensaios com *O. niloticus*, que consistiu no preparo de uma solução estoque (mãe) de alumínio e o emprego volumétrico desta solução de acordo com a concentração de alumínio dissolvido desejado.

Para o preparo da solução estoque, 90g de $AlK(SO_4)_2$ foram deixados em estufa a 50°C durante 12 horas e após este período foram retirados 76,074g (massa seca) deste sal e dissolvidos em 1L de água MilliQ. Esta solução foi armazenada em frasco de vidro e acidificada com 1,5 ml de HNO_3 65% SUPRAPUR (MERCK); o pH foi verificado e a mesma permaneceu em geladeira.

O volume de 15 ml da solução estoque corresponde a uma concentração de 0,5g de alumínio dissolvido em 130 litros de água em condições experimentais ideais; uma vez que 76,074g (massa seca) de $AlK(SO_4)_2$ correspondem a 4,333g de Al/L (solução estoque). Portanto os 15 ml da solução estoque possuem 0,064995g de alumínio, que em 130 litros resultam em uma concentração de 0,5mg/L de Al_{13} .

3.3 Ensaios de Toxicidade

Os experimentos realizados foram conduzidos em condições artificiais em laboratório com duas espécies de peixes teleósteos continentais, *Astyanax fasciatus*, popularmente conhecido como lambari do rabo vermelho, ou lambari – açu e *Oreochromis niloticus*, conhecida como tilápia.

Dois tipos de ensaios de toxicidade foram utilizados: Teste de toxicidade dinâmico agudo (*Oreochromis niloticus*) e teste de toxicidade estático crônico (*Astyanax fasciatus*).

Existem muitos tipos de ensaios padronizados mundialmente para espécies ou táxons, e embora novos testes sejam criados ou apresentem modificações dos testes preexistentes, qualquer um destes requer atenção para alguns princípios básicos em seu funcionamento e condições específicas (Zagatto, 2006). Diante desta premissa, alguns parâmetros fundamentais que integraram este estudo foram cuidadosamente monitorados: pH, oxigênio dissolvido, temperatura, fotoperíodo, compostos nitrogenados, concentração de alumínio e alcalinidade.

Os ensaios de toxicidade aguda foram conduzidos com a espécie *Oreochromis niloticus*, com duração total de 96 horas. Segundo Elliott (2002), este tipo de estudo constitui a base dos estudos ecotoxicológicos.

A literatura atual define testes crônicos como aqueles em que o período de exposição é maior do que 10% da longevidade de um organismo (Cooney, 1995 *apud* Zagatto, 2006), por outro lado, este mesmo autor aponta que este tipo de teste apresenta-se sob três variações, o que inclui testes sobre um determinado ciclo de vida, ou período.

A espécie *Astyanax fasciatus* foi mantida em exposição ao alumínio durante 21 dias, período este compreendido em sua época de reprodução, o que constitui um teste crônico e também estático por não ter sido realizada renovação de água dos bioensaios.

3.4 Desenho experimental

3.4.1 Ensaios de toxicidade crônica

Os exemplares de *Astyanax fasciatus* utilizados neste experimento foram inicialmente coletados no rio Tietê e mantidos em viveiros de cultivo por aproximadamente um ano na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova, no município de Salesópolis – SP.

Apenas as fêmeas desta espécie foram utilizadas. Estas foram acondicionadas em sacos plásticos com água e oxigênio e transportadas da piscicultura até o biotério do Departamento de Fisiologia no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, onde o experimento foi realizado. No

biotério, os peixes foram mantidos em caixas de plástico retangulares brancas e opacas, com volume de 130 litros de água. A permanência máxima foi de 21 dias, após 7 dias de aclimação. A figura 3 ilustra detalhes da etapa experimental com esta espécie.

Inicialmente a densidade utilizada foi de 11 animais por caixa, em um total de 9 caixas, correspondendo a 3 grupos experimentais em triplicatas. Os dados morfométricos e ponderais dos animais podem ser visualizados na tabela 1.

O primeiro grupo correspondeu aos animais controle (C), caixas 1, 2 e 3; no segundo grupo ficaram os animais em exposição ao alumínio (A), caixas 4, 5 e 6. Nestes dois grupos, manteve-se o pH neutro. O terceiro grupo (B), caixas 7, 8 e 9, além da exposição ao alumínio, o pH da água foi mantido em torno de 5,5 com adição de ácido clorídrico fumegante (SYNTH).

A água utilizada foi proveniente da rede pública de abastecimento, mantida sob oxigenação constante sete dias anteriores ao período de aclimação dos animais. As caixas dos grupos A e B receberam 1,1428 g de sulfato de alumínio $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (MERCK) e todas as caixas receberam 10g de NaHCO_3 .

Os animais foram alimentados diariamente, *ad libitum* com ração balanceada para peixes, com teor protéico de 32% e cada caixa passou por higienização freqüente, retirando-se por sifonagem as fezes e a ração não consumida.

O período experimental se iniciou após sete dias (período de aclimação) da permanência dos animais nas caixas. Terminado o período de aclimação, 9 animais foram sacrificados, restando 10 animais por caixas para o período

experimental. A água de cada caixa recebeu aeração constante com o uso de compressores de ar externos e também submersos para a manutenção da concentração adequada de oxigênio; a temperatura foi controlada através de termostatos e, ambos os parâmetros foram monitorados diariamente (oxímetro YSI, mod. 55).

O monitoramento do pH também foi diário (pHmetro portátil, digital, GEHAKA). O pH foi verificado e mantido sob controle diariamente, com a aplicação de hidróxido de sódio (NaOH) ou de ácido clorídrico fumegante (HCl), (ambos da marca SYNTH) conforme a necessidade de elevar ou diminuir respectivamente o pH.

O fotoperíodo utilizado no experimento com iluminação artificial do biotério foi de CE 13:11 (13 horas de claro, 11 horas de escuro). Este padrão de fotoperíodo é o usualmente mais recomendado para experimentos com animais aquáticos (Dunlap, 1989).

As concentrações de alumínio, nitrito e amônia foram periodicamente monitoradas empregando-se métodos colorimétricos (descritos no item 3.6). Foram realizadas duas determinações das concentrações de alumínio, dentre estas, um tipo de amostragem foi para o alumínio lábil (solúvel ou nominal) e a outra para o alumínio total.

Os ensaios com esta espécie foram realizados duas vezes durante o seu período reprodutivo, em dezembro de 2006 e fevereiro de 2007.

3.4.2. Ensaios de toxicidade aguda

Apenas fêmeas de *Oreochromis niloticus* foram utilizadas, todas cultivadas na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova – Salesópolis (SP), local este onde os ensaios foram realizados.

As dificuldades encontradas na realização dos experimentos anteriores levaram a tomar novas medidas com o objetivo principal de causar o menor estresse possível aos animais enquanto estes estiveram confinados nas caixas plásticas. Dessa forma estes animais não foram transportados até o biotério do Instituto de Biociências, mas permaneceram no mesmo local onde estavam aclimatados às características físico – químicas da água. Manter os animais na piscicultura foi uma estratégia para mitigar os efeitos do manejo e da exposição ao alumínio, pois estes ensaios trataram-se de um período bem mais curto, se comparado aos ensaios com *Astyanax fasciatus*.

Como já citado anteriormente, a água utilizada nesta etapa foi bombeada do Reservatório de Ponte Nova, sem passar por qualquer sistema de purificação ou tratamento. No laboratório, a água foi filtrada através de dois filtros portáteis, construídos com celulose, com espessura de 5 micras, impregnados com carvão ativado e projetados para a retenção de partículas sólidas, redução de odores, matéria orgânica e contaminantes químicos, (modelos: IMPAC – CEP 10 e Aqualimp FICZ-10).

Após o processo de filtração esta água foi mantida em duas caixas com volume de 145 litros e adicionados 17ml da solução estoque de alumínio em cada uma, para em seguida serem deixadas em repouso (decantação) durante 12

horas. Este procedimento garantiu que parte do material que não foi retido nos filtros fosse removido, isto se evidenciou principalmente com algas e material clorofilado depositados no fundo das caixas (Figuras 4 e 5).

Para cada duas caixas em preparação, apenas uma foi destinada aos ensaios, pois após permanecerem em repouso durante 12 horas, o volume total de uma destas caixas foi totalmente desprezado e internamente foi feita uma cuidadosa remoção de eventuais partículas ainda remanescentes. Esta mesma caixa recebeu o volume de 130 litros da outra caixa que também havia sido deixada em repouso simultaneamente. Os 15 litros restantes foram desprezados juntamente com o material decantado.

Este conjunto de práticas foi necessário para aproximar as condições consideradas ideais da água em um sistema de bioensaios com íons metálicos. Além disso, estas ações colaboraram para o “equilíbrio do sistema” pois, teoricamente, a água que foi desprezada de uma das caixas, que também continha alumínio, estava com estes íons metálicos sofrendo especiação e complexação com as paredes internas das caixas, fato que poderia ter colaborado para “seqüestrar” íons de alumínio e diminuir sua concentração e disponibilidade para o experimento.

A troca de água em uma das caixas e a adição de 17 ml da solução estoque, ao invés de 15ml (volume correspondente a 0,5mg/l de Al em 130l) foram medidas adotadas para assegurar e otimizar o equilíbrio do sistema, para que o volume a ser utilizado, ou seja, 130 litros, viesse a apresentar a concentração de 0,5 mg/L de Al.

O volume de 2ml a mais da solução estoque, teoricamente, auxiliou a manutenção da concentração de alumínio desejada, pois parte do alumínio reagiu com a água ou com a parede das caixas, e caso este volume extra não tivesse sido aplicado, a concentração de alumínio poderia ter sido menor do que 0,5mg/L. Estes procedimentos devem ser considerados valiosos, tão logo se observem os resultados para a concentração deste metal.

A etapa experimental com *Oreochromis niloticus* foi composta por 4 grupos dos quais dois foram controles (C e D, controle neutro e controle ácido, respectivamente) e dois foram de exposição ao poluente: alumínio em pH neutro (A) e alumínio em pH ácido (B), todos conduzidos em duplicatas. A água das caixa correspondentes aos grupos controle recebeu apenas filtração.

A cada 24 horas foi feita a troca de 90% do volume de água das caixas, não sendo optado pela troca total para minimizar os possíveis efeitos do estresse nos animais. Antes e depois da troca de água, os seguintes parâmetros foram monitorados: temperatura, oxigênio dissolvido e pH, sendo este último monitorado mais regularmente para manter a neutralidade e acidez desejada de acordo com cada grupo experimental. Nos momentos de troca de água, amostras foram recolhidas para a determinação do alumínio, amônia e nitrito.

Para a análise do nitrito, as amostras de água foram processadas diariamente e as amostras para os demais parâmetros foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e refrigeradas. O detalhamento destes protocolos encontra-se nos anexos. A manutenção das caixas seguiu a mesma metodologia dos ensaios crônicos.

A alimentação dos animais foi suspensa 24 horas antes do experimento e posteriormente não receberam nenhuma alimentação. O fotoperíodo utilizado foi o fotoperíodo natural. A figura 6 destaca detalhes das atividades pré – experimento com esta espécie.

3.5 Características das espécies modelo

Foram utilizadas duas espécies de peixes teleósteos continentais, uma destas selecionada para os ensaios crônicos e a outra para os ensaios agudos. Para os ensaios crônicos, a espécie modelo foi *Astyanax fasciatus*, (Fig 7A) nativa da região do Alto Tietê, apresenta estratégia reprodutiva do tipo sincrônico em grupo (reprodução sazonal), ou seja, durante o período reprodutivo, apenas um lote de oócitos amadurece e é eliminado (desova total) (Vazzoler, 1996).

Para os ensaios agudos, a espécie modelo utilizada foi *Oreochromis niloticus* (Fig 7B), espécie exótica que apresenta desova do tipo parcelada ou múltipla. O desenvolvimento ovariano é assincrônico, pois não se evidenciam períodos de reprodução definidos e a liberação dos ovócitos ocorre na medida em que estes atingem a maturação e as condições ambientais sejam favoráveis (Vazzoler, 1996).

3.5.1 *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819)

Astyanax fasciatus (Cuvier, 1819), popularmente conhecido como lambari – açu, ou lambari do rabo vermelho (Brasil meridional), pertence a um grupo de peixes que, de acordo com Godoy (1959), realizam curtas migrações e apresentam o mesmo período reprodutivo de peixes de piracema, sendo que a “época de cheia” proporciona os estímulos necessários à reprodução.

A. fasciatus é uma espécie de pequeno porte com comprimento médio entre 10 a 20 cm, possui o corpo alongado, nadadeira caudal avermelhada, escamas com reflexo dourado, ocelo umeral difuso e linha lateral bem nítida (Vanzolini *et al.*, 1964 *apud* Gurgel, 2004).

O gênero *Astyanax* é um dos mais ricos em espécie e distribuição geográfica entre os Tetragonopterinae e apresentam poucas diferenciações ecológicas, morfológicas e comportamentais, sugerindo um grupo em especiação (Gurgel, 2004).

A distribuição geográfica do gênero *Astyanax* se estende desde a América Central até a Argentina. Este grupo notadamente destaca-se por sua importância na estrutura ecológica dos rios neotropicais, principalmente como forrageiros para algumas espécies carnívoras (Câmara *et al.*, 1991 *apud* Gurgel, 2004).

3.5.2. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) é um ciclídeo não nativo da região neotropical. Sua distribuição é ampla nos rios brasileiros, porém é uma espécie exótica. Esta espécie tem grande valor comercial e é amplamente cultivada em pisciculturas. Apresenta baixa sensibilidade ao manejo e é capaz de adaptar-se facilmente tanto em rios, reservatórios e viveiros de cultivo.

O. niloticus foi utilizada como modelo experimental devido a sua estratégia reprodutiva ser diferente da estratégia empregada por *A. fasciatus* e pelo fato de ser uma espécie de maior porte e considerada menos sensível.

3.6 Técnicas analíticas e monitoramento dos bioensaios

Como descrito anteriormente, o pH e a concentração de oxigênio dissolvido foram parâmetros monitorados com maior intensidade através de aparelhos portáteis. Durante este monitoramento, alíquotas de água foram coletadas e destinadas às análises das condições físico – químicas da água. Parte destas análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Análises Físico – Químicas da Universidade de Mogi das Cruzes (Núcleo de Ciências Ambientais) e também com o Laboratório de Ciências Fisiológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Adicionalmente parte destas análises foi enviada para um laboratório de análises ambientais (prestadora de serviços terceirizados).

A concentração de alumínio lábil, nitrito e amônia foram determinados por espectrofotometria de luz usando, respectivamente, eriocromo cianina R, sulfanilamida/ NNED e reagente de Berthelot como reagentes espectrofotométricos.

Para determinação de alumínio total a amostra foi digerida em sistema fechado com solução de ácido nítrico concentrado, em um microondas (Milestone Ethos Plus). As amostras digeridas foram analisadas em um espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer modelo 3110 empregando-se chama de acetileno-óxido nitroso.

A análise do alumínio total dos ensaios agudos foi determinada com o uso de um espectrofotômetro de chama GBSAAS -932 PLUS.

3.7 AMOSTRAS DE TECIDO E PLASMA

Após o período de exposição nos bioensaios os peixes foram retirados das caixas experimentais, alocados em recipientes menores e anestesiados em água com temperatura reduzida e o anestésico MS-222 (tricáína metanosulfonato – Sigma Dianostis INS, St. Louis M.O. USA) na concentração de 2g/10 litros de água, tamponado com bicarbonato de sódio. Após a anestesia, cada peixe foi colocado sobre uma cuba de dissecação e o sangue foi coletado da vasculatura caudal utilizando-se seringas heparinizadas (Liquemine – Roche®) (Figs. 7C e D). Em seguida, o sangue coletado foi centrifugado por 5 minutos na velocidade de 655,1 g para separação do plasma, que foi distribuído em alíquotas que permaneceram congeladas em freezer – 80°C até a sua utilização.

Para a coleta de sangue de *A. fasciatus* alguns animais não foram anestesiados, mas permaneceram submersos na água durante a coleta. Este procedimento foi adotado para avaliar qual seria o método de coleta de sangue menos estressante para os animais, e também importante para a dosagem do cortisol.

Após a coleta do sangue, cada animal foi sacrificado por dissecação medular na altura do opérculo e os seguintes órgãos/tecidos foram retirados: fígado, ovários, rim, brânquias e músculo branco (Figs. 7 E e F). Logo em seguida, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até a sua utilização. Aspectos morfológicos das gônadas estão destacados nas figuras 8 A,

e 9 A e do fígado nas figuras 8B e 9B, respectivamente para *A. fasciatus* e *O. niloticus*, respectivamente.

3.8. BIOMARCADORES

Foram utilizados biomarcadores morfológicos (análise histológica) e biomarcadores fisiológicos (substratos energéticos, hormônios e íons), pois, de acordo com Depledge (1993), a aplicação de diferentes biomarcadores é importante para avaliar a atuação de estressores em diferentes etapas.

3.8.1 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

O terço médio das gônadas, porções do fígado e das brânquias foram fixados por 24 horas em solução de *Bouin acético* para processamento rotineiro de histologia. Posteriormente, as amostras foram transferidas para o álcool 70% até o momento do processamento, cuja inclusão foi feita em paraplast (Erv-Plast, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda). Foram feitos cortes de 5 µm de espessura utilizando-se o Micrótomo Leica RM 2155, que foram corados pelo método rotineiro com Hematoxilina – Eosina (H.E).

O material foi analisado em microscópio ótico comum (Zeiss Axios Kop II), e as imagens foram coletadas utilizando-se uma câmera digital (Zeiss MC 80 DX) acoplada a um programa de captura de imagens (PIXERA professional).

A massa dos ovários foi registrada, pois é um parâmetro importante para a determinação do estágio de maturação e cálculo do Índice Gonadossomático (IGS). O IGS é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IGS} = \text{Wg} \times 100 / \text{Wt}$$

Wg – massa das gônadas

Wt – massa corpórea

Portanto, o IGS é um índice que expressa a porcentagem que as gônadas representam em relação à massa total do animal e é um indicador eficaz do estado funcional dos ovários.

Além das gônadas, o fígado também foi pesado em balança analítica para o cálculo do Índice Hepatosomático (IHS), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IHS} = \text{Wh} \times 100 / \text{Wt}$$

Wh – massa do fígado

Wt – massa corpórea

O IHS expressa a porcentagem que o fígado representa em relação à massa total do animal e contribui para a interpretação da mobilização energética envolvendo este órgão.

3.8.2. BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS

Os esteróides gonadais, Estradiol (E_2), 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP) e o Cortisol foram quantificados no plasma pelo método de elisaimunoensaio (ELISA), com o uso de kits da marca DSL (Diagnostic Systems Laboratories, INC). para os esteróides gonadais e da marca Adaltis para o cortisol. As leituras ocorreram em leitora de microplaca (Molecular Devices). Os detalhes dos protocolos das dosagens hormonais encontram-se em anexo.

A concentração de lipídios totais do fígado, ovário e plasma foi determinada através do método de Frings *et al.* (1972). Para a extração do lipídio dos tecidos foi utilizado o método de Folch *et al.* (1957) adaptada por Parrish (1999) para amostras de organismos aquáticos.

A concentração de proteínas totais no plasma foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, (1951) e o teor protéico dos tecidos foi determinado pela mesma metodologia, após precipitação e solubilização das proteínas totais segundo metodologia de Milligan & Girard (1993).

Os principais íons plasmáticos foram determinados com o uso de espectrofotômetro de chama GBSAAS -932 PLUS.

O detalhamento destes protocolos encontra-se em anexo.

3.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO EPITÉLIO BRANQUIAL

A descrição dos efeitos lesivos (alterações) sobre o epitélio branquial, basou-se na metodologia seguida por Poleksc & Mitrovic – Tutunddzic (1994) *apud* Furia (2005).

3.10 Análise estatística

Foi aplicado o teste de Análise de Variância (one way ANOVA) seguido do teste de Student – Newman-Keuls. Em alguns casos, os requisitos para a ANOVA não foram encontrados (normalidade e/ou homocetasticidade) e um teste não paramétrico foi utilizado (Kruskal-Wallis), seguido do teste randômico do tipo Dunn's. Para essas análises foi utilizado o programa estatístico SigmaStat (versão

2.0). As análises foram realizadas dentro de cada ensaio experimental, não sendo aplicados testes estatísticos entre os ensaios agudo e crônico.

4. RESULTADOS

4.1. COMPOSIÇÃO IÔNICA E CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS

Alguns dos principais íons da água foram dosados a fim de se caracterizar sua composição química, importante para a realização nos experimentos. Além destes, a alcalinidade, a matéria orgânica dissolvida (MOD), a clorofila e o carbono orgânico total (COT) também foram analisados. As tabelas (2 e 3) mostram as principais características das diferentes fontes de água utilizadas nos experimentos, anteriores ao início dos mesmos.

Os seguintes íons foram analisados na água dos 2 diferentes ensaios realizados: Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Fe^{2+} , e SO_4 . Estas análises revelaram que a água da Barragem de Ponte Nova apresenta uma maior concentração de Fe^{2+} do que a água do sistema público de abastecimento (Tabela 2).

Os resultados da tabela 2 também mostram que a água utilizada no biotério do Instituto de Biociências da USP (sistema público de abastecimento) possui valores de sulfato bem maiores, o que já era esperado, pois esta água passou por tratamento para torná-la potável, e este ânion está presente em sais de alumínio, que são freqüentemente utilizados em processos de decantação. Os teores de matéria orgânica dissolvida e alcalinidade foram bastante similares entre a água destes dois locais (Tabelas 2 e 3).

Outra análise que merece destaque é a concentração de Ca^{2+} que foi maior na água utilizada dos experimentos realizados no biotério do IB/USP do que na Barragem de Ponte Nova.

O laudo técnico das análises de clorofila mostrou ausência deste pigmento na água do biotério, e para a matéria orgânica valores de 30% antes de receber a solução estoque de alumínio e 25% após o período de decantação (experimento agudo) foram observados.

4.2. VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS E ENSAIOS DE TOXICIDADE

4.2.1. TEMPERATURA E OXIGÊNIO DISSOLVIDO

A temperatura média para os bioensaios com *O. niloticus* foi de 20,8 °C para os grupos com alumínio e de 22,3 °C para os grupos controle. Mesmo com a utilização de termostatos foi difícil manter constante a temperatura da água. Fatores externos como umidade e chuvas dificultaram o controle deste fator, uma vez que os grupos controle e alumínio foram realizados com intervalo de 120 horas.

A média das temperaturas dos bioensaios com *A. fasciatus* realizados em Dezembro de 2006 e Fevereiro de 2007, foi respectivamente de 23,5 e 24,7 °C para o grupo controle e 23,9 e 24,7 °C para o grupo A.

A concentração média de oxigênio dissolvido (OD) foi de 7,1mg/L entre todos os grupos experimentais dos ensaios com *O. niloticus*, e a concentração dos ensaios com *A. fasciatus* foi de 4,94 e 5,40 mg/L para o grupo controle e 4,86 e

5,72 mg/L para o grupo A, durante os meses de Dezembro e Fevereiro, respectivamente.

4.2.2. pH

Os resultados apresentados neste trabalho apontam diferenças em vários dos parâmetros fisiológicos analisados, entre os grupos com alumínio em pH neutro e ácido, o que corrobora com muitos trabalhos na literatura. Ao longo dos experimentos realizados, dois valores de pH foram selecionados para compor os grupos experimentais: pH neutro, mantido em torno de 7,0 e pH ácido, mantido em torno de 5,3 e 5,5. O pH demonstrou uma forte tendência a se elevar e atingir valores próximos a 6 (grupos com pH ácido), o que provavelmente ocorreu devido a substâncias presentes na água que foram sendo excretadas pelos animais. Este fato ocorreu nos dois experimentos, mas foi mais pronunciado para o experimento estático – crônicos.

Nos ensaios agudos os valores médios de pH registrados estiveram entre: 7,0 e 7,1 para os grupos controle (C) e alumínio neutro (A) e 5,7 para os grupos controle ácido (D) e alumínio ácido (B). O comportamento do pH para estes ensaios está expresso nas figuras 10, 11, 12 e 13

O valor médio do pH nos experimentos crônicos foi de 7,7 para os grupos controle (C) e alumínio neutro (A), realizados em dezembro e em fevereiro (Figuras 14 e 15).

4.2.3. COMPOSTOS NITROGENADOS

Dois compostos nitrogenados foram analisados na água dos ensaios: NH_3 (amônia total, ou amônia gasosa) e NO_2^- (nitrito). Os ensaios com *A. fasciatus* demonstraram uma variação maior destes parâmetros do que os ensaios com *O. niloticus*, fato que ocorreu devido à duração e característica de cada ensaio.

Em dezembro a concentração média de amônia (NH_3) para o grupo controle foi nula, todavia, o grupo (A) apresentou um maior aumento na concentração deste composto, com os valores mais altos entre o 3º e o 9º dia. Após esta data se registrou uma diminuição nestes valores. A concentração média para este grupo foi de 0,14 mg/L.

Em fevereiro, a concentração média de amônia foi de 0,2 mg/L para o grupo controle e de 0,3 mg/L para o grupo com alumínio. Durante este período experimental não ocorreu um aumento expressivo na concentração de amônia em um momento isolado, mas sim uma sensível variação na concentração ao longo do tempo. As figuras 16, 17 e 18 expressam o comportamento da amônia (NH_3) nos ensaios realizados com *A. fasciatus*.

A concentração média de NO_2 , nos experimentos com *A. fasciatus* nos meses de dezembro e fevereiro em mg/L foi de 0,0 (C), 0,1 (A) e 0,4 (C) e 0,5 mg/L (A), respectivamente. Nos experimentos com *O. niloticus*, a concentração de nitrito se manteve por volta de 0,01 mg/L em todos os tratamentos.

Pelo fato do experimento com *A. fasciatus* ter sido realizado em duas etapas ao longo do ciclo reprodutivo desta espécie, fez – se necessário uma descrição dos resultados observados nestes dois momentos; sendo assim, a

concentração média de (NO_2^-) em dezembro permaneceu com valores baixos durante todo o período experimental, exceto um pico de 0,30 mg/L alcançado pelo grupo (A) figura 19.

Nos ensaios realizados em fevereiro de 2007, embora a média dos grupos tenha sido de até 0,1 mg/L (concentração considerada segura para muitas espécies de água doce), do 1º ao 3º dia a concentração de NO_2 foi baixa entre os grupos, porém, após esta data houve um aumento gradativo, sendo este mais acentuado para o grupo com alumínio (A), que chegou a estar com 1,30 mg/L., fig 20.

Possivelmente, as oscilações nos valores dos compostos nitrogenados podem estar relacionadas com a reposição de água nas caixas e também com o número de animais em cada uma delas. O monitoramento destes compostos nos ensaios agudos revelou concentrações baixíssimas em todos os grupos (Figs 21 e 22).

4.2.4. Alumínio

Os resultados apresentados para as análises de alumínio foram diferentes em alguns pontos, tanto para as análises de alumínio lábil (nominal ou solúvel) quanto para as análises de alumínio total, dessa forma, é importante verificar nos materiais e métodos que diferentes métodos foram aplicados para o preparo dos meios reacionais com este metal.

Nos experimentos com *A. fasciatus*, o método empregado demonstrou não ser eficaz para experimentos ecotoxicológicos, pois não foi possível alcançar uma

concentração de 0,5 ug/mL de alumínio em nenhuma das análises, seja nas formas total ou lábil.

Para a análise dos resultados das duas etapas dos experimentos crônicos, é importante destacar que a adição do $AlK(SO_4)_2$ ocorreu uma única vez (tempo zero) e eventualmente quando o volume de água das caixas (ensaios) baixava, este era completado com um volume de água que também continha alumínio, preparado nas mesmas condições e momento da água presente nas caixas.

O esforço amostral realizado em dezembro revelou no primeiro dia destes ensaios que a concentração estável do alumínio dissolvido ocorreu apenas nas primeiras horas, e antes mesmo de 24 horas, esta concentração (alumínio total) diminuiu para cerca de 50% da concentração inicial, permanecendo próxima a este valor durante a maior parte do período experimental. Valores ainda menores nas análises de alumínio lábil foram registrados (Figura 23).

Na segunda etapa dos experimentos crônicos realizados em fevereiro, a concentração de alumínio lábil permaneceu grande parte do experimento com cerca de 0,3 ug/mL (Figura 24). Comparativamente, houve uma diferença na concentração de 0,1ug/mL de alumínio lábil entre estas duas etapas.

As análises de alumínio total (Figura 25) mostraram uma diminuição na concentração ao longo do tempo, e embora as duas etapas experimentais tenham apresentado diferentes concentrações e leves oscilações, é notório que o comportamento deste metal expresse uma tendência em diminuir sua concentração ao longo do tempo, fato registrado em ambas as análises. Foi observado um nível de maior estabilidade em aproximadamente 0,2 ug/mL.

A concentração do alumínio determinada através das análises deste metal nas formas lábil ou total, demonstrou ser levemente diferente entre as duas etapas ao longo do tempo. A concentração média de alumínio lábil em dezembro foi de 0,01 ug/mL (C) e 0,2 ug/mL (A). E em fevereiro foi de 0,0 ug/mL (C) e 0,3 ug/mL (A); porém, o alumínio total apresentou a mesma concentração média para o grupo (A), 0,2 ug/mL e para o grupo (C), 0,0 ug/mL nestas duas etapas. A concentração de alumínio presente no grupo controle é explicável, pois o alumínio é utilizado para decantação de impurezas durante o processo de tratamento de água no sistema público de abastecimento.

Nos experimentos realizados com *O. niloticus* a metodologia utilizada mostrou-se mais eficaz e foi possível alcançar uma concentração de 0,5 ug/mL de alumínio (lábil). Houve uma sensível variação na concentração de alumínio lábil ao longo do período experimental, esta variação é percebida entre os intervalos de troca de água. Estes ensaios registraram uma concentração média de alumínio lábil de 0,6 ug/ml, valor este com 0,1 ug/mL acima da concentração pretendida para o grupo com alumínio em pH neutro (A) e de 0,5 ug/mL para o grupo com alumínio em pH ácido (B) (Figura 26). A concentração de alumínio total nos ensaios agudos pode ser observada na figura 27.

Dois fatores metodológicos primordiais diferiram entre os dois tipos de ensaios realizados: troca de água e solução estoque. Além disso, a diferença de pH entre os grupos A e B também resultou em diferente comportamento do alumínio, fato evidenciado nas diferentes concentrações registradas.

4.3 INTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Uma das características mais intensas e conspícuas manifestadas pelos lambaris durante sua permanência nas caixas experimentais foi o total desconforto.

Desde os instantes iniciais, foi percebido que os animais encontravam-se agitados, o que já era esperado para um curto espaço de tempo, e que em parte justifica o período de aclimação. Porém, o evidente estresse comportamental ocorreu praticamente durante todo o período experimental, sem ter nenhuma relação perceptível com possíveis fatores de perturbação externos, tais como luminosidade (que foi controlada), proximidade de pessoas, barulhos ou algum outro fator que poderia desencadear perturbações no comportamento dos animais, visto que o local onde permaneceram (biotério) é apropriado para a condução de experimentos dessa natureza, e foi tomado todo cuidado com os elementos referidos.

O comportamento dos animais pode ser descrito por uma intensa movimentação opercular, agitação e movimentos natatórios velozes com saltos, que resultaram em colisões contra as paredes das caixas e contra a tela de proteção superior (tampa). Também foi observada excessiva produção de muco.

Além do comportamento descrito acima estes animais mostraram intensa agressividade entre si. Frente a estes distúrbios comportamentais, alguns indivíduos apresentaram profundos ferimentos e dilacerações provocadas pelos

ataques dos demais membros do grupo, o que culminou na morte de muitos indivíduos (Figura 28).

Mas não apenas ferimentos causados por ataques foram registrados, alguns indivíduos colidiram-se contra a parede interna das caixas com extrema voracidade que também resultou em morte. Entre os indivíduos que morreram desta maneira, alguns apresentaram a mandíbula inferior fraturada.

Houve ainda uma intensa descamação e falta de apetite, o que possivelmente envolveu todos os animais, e não somente os que morreram. Durante o período experimental, a ingestão de alimento pelos animais era muito reduzida e muitas vezes os animais passavam vários dias sem ingerir a ração oferecida.

Diferentemente das manifestações comportamentais, apresentadas pelos lambaris, as tilápias por sua vez permaneceram a maior parte do tempo (em que foi observada) sem sinais de estresse. Mostrou-se menos ativa do que os lambaris e nenhum ataque ou agressão que pudesse ferir vorazmente outro indivíduo foi registrado, exceto pelo comportamento territorial característico de espécies da família Cichlidae. Estes animais mostraram-se mais ativos e alertas apenas nos intervalos de troca de água e com a maior proximidade de pessoas.

4.4 SOBREVIVÊNCIA

A sobrevivência dos exemplares de *O. niloticus* foi de 100% em todos os grupos experimentais. Por outro lado, ocorreu intensa mortalidade de exemplares de *A. fasciatus* durante as duas etapas experimentais. O grupo com alumínio em

pH ácido (B) teve uma mortalidade registrada de 90%, fato que impediu a utilização deste grupo na análise dos resultados. O grupo controle alcançou um índice de mortalidade de 40% e o grupo (A) expressou 30%.

4.5. HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Como já relatado nos métodos, foi feita a análise plasmática de três hormônios esteróides: Cortisol, 17α -hidroxirogesterona (17α OH) e Estradiol (E_2).

4.5.1. CORTISOL

Não foi registrada nenhuma diferença na concentração de cortisol plasmático diretamente relacionada com a metodologia de coleta de plasma, portanto, a metodologia utilizada seguiu-se com a utilização de anestésicos.

A análise de cortisol revelou diferentes concentrações desse hormônio entre os ensaios realizados (Figura 29). Os resultados dos experimentos com *A. fasciatus* revelaram que o grupo A possui mais cortisol do que o grupo C ($P=0,043$). Esta foi a única diferença estatística significativa observada.

Os resultados para os ensaios agudos com *O. niloticus* revelaram que o grupo A (alumínio em pH neutro) não apresentou diferença estatística significativa em relação ao seu controle (C), ($P= 0,514$) e ao controle em pH ácido (D), ($P= 0,081$). Mas apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo alumínio em pH ácido (B) ($P= 0,003$), observando com estes resultados que o grupo (A) possui mais cortisol do que qualquer outro grupo experimental.

O grupo alumínio em pH ácido (B) foi o grupo experimental com a menor concentração de cortisol. A análise estatística não revelou diferenças deste grupo em relação ao seu controle (D), ($P = 0,092$), mas sim em relação ao grupo (C), ($P = 0,002$).

É importante ainda destacar que as concentrações de cortisol observadas nos lambaris chegaram a valores entre 30 e 47 ng/ml, enquanto que nas tilápias, estes valores não ultrapassaram a concentração de 17 ng/ml

4.5.2 17α -HIDROXIPROGESTERONA (17α OHP)

A análise estatística não revelou nenhuma diferença significativa na concentração de 17α OHP entre os grupos nos experimentos realizados com *A. fasciatus*. Nesta análise, o teste de normalidade falhou e o teste aplicado foi do tipo Kruskal Wallis on Ranks ($P = 0,234$).

Os resultados expressos para *O. niloticus* diferem dos resultados apresentados para *A. fasciatus*. O grupo controle em pH neutro (C), não apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo alumínio em pH neutro (A), ($P = 0,188$), mas mostrou-se diferente diante dos resultados para os grupos em pH ácido: D e B ($P = 0,001$).

Diferenças estatísticas significativas também foram registradas entre os grupos: D e B, D e A ($P = 0,001$). Os grupos com alumínio apresentaram valores de 17α OHP, expressos em pg/mol menores do que os grupos controle.

A figura 30 aponta em detalhes os resultados referentes a este hormônio e mostra ainda que as concentrações de $17\alpha\text{OHP}$ nas tilápias são superiores às aquelas encontradas nos lambaris.

4.5.3 ESTRADIOL (E_2)

As análises de estradiol dos ensaios crônicos com *A. fasciatus* revelaram um aumento na concentração plasmática desse hormônio no grupo A, em relação aos demais grupos, controle e inicial ($P < 0,001$).

Os resultados das análises dos ensaios agudos com *O. niloticus* revelaram que não há diferença estatística significativa; embora exista uma tendência a uma quantidade maior deste hormônio nos grupos expostos ao alumínio, quando comparados aos grupos controles. Detalhes referentes a este hormônio estão apresentados na figura 31.

4.6 SUBSTRATOS ENERGÉTICOS

Os resultados das análises de substratos energéticos demonstraram não apenas diferenças estatísticas, mas também respostas fisiológicas distintas entre os animais modelo estudados, o que reflete uma performance metabólica relacionada a cada tipo de ensaio.

4.6.1 LIPÍDIOS TOTAIS

A concentração de lipídios totais nos ovários de *A. fasciatus* foi semelhante entre os grupos: Inicial, Controle e A ($P = 0,314$). O mesmo não ocorreu para os

lipídios hepáticos, cuja concentração foi maior no grupo de exposição ao alumínio em relação aos demais, esta diferença na concentração se mostrou estatisticamente diferente entre A e Inicial ($P=0,004$), e entre A e Controle ($P=0,031$).

O plasma por sua vez, apresentou maior quantidade de lipídios nos grupos C e A em relação ao grupo Inicial, e os valores de P para ambos foram de ($P=0,001$). Não foi registrada diferença estatística entre A e Controle ($P= 0,754$). Detalhes referentes aos lipídios de *A. fasciatus* encontram-se na figura 32.

Os resultados dos ensaios com *O. niloticus* mostraram que os grupos com alumínio possuem praticamente o dobro de lipídios totais nos ovários do que os grupos controle ($P= 0,001$). Não há diferença estatística significativa entre os grupos A e B ($P= 0,448$) e entre C e D ($P= 0,331$).

Os lipídios hepáticos, ao contrário dos lipídios gonadais, apresentaram a maior concentração nos grupos controle do que nos grupos com alumínio. Entre todos os grupos, o grupo B, apresentou a menor concentração (mg/g). A análise estatística revelou que não há diferenças dos grupos controle entre si ($P=0,159$), tampouco entre os grupos alumínio ($P=0,100$), mas há diferença entre D e B ($P= 0,008$), D e A ($P\leq 0,001$); C e B ($P= 0,002$) e entre C e A ($P\leq 0,001$).

Os lipídios plasmáticos apresentaram valores muito próximos na concentração (mg/ml), mostrando diferença estatística significativa apenas entre os grupos B e C ($P= 0,007$). Maiores detalhes referentes aos lipídios destes ensaios estão expressos na figura 33.

4.6.2 PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas totais dos ovários de *A. fasciatus* não revelaram nenhuma diferença estatística entre os grupos ($P = 0,291$), sendo que o mesmo ocorreu para as proteínas hepáticas ($P = 0,447$), e embora não tenham ocorrido diferenças estatísticas entre estes dois tecidos, quando a análise do plasma foi realizada entre os 3 grupos, foi verificado que o grupo (A) possui menos proteínas do que os demais grupos, sendo estatisticamente diferente destes ($P = 0,027$) (Figura 34).

Os resultados das proteínas gonadais (ovários) de *O. niloticus* é bem diferente dos observados para os lambaris. Os grupos com alumínio possuem menos proteína do que os grupos controle, e não há diferenças estatísticas nos grupos controle entre si ($P = 0,078$) e dos grupos alumínio entre si ($P = 0,056$); porém há diferenças entre A e C ($P = 0,004$), A e D ($P = 0,018$) e entre B e C ($P = 0,042$).

Nenhuma diferença estatística foi registrada para proteínas hepáticas ($P = 0,269$) e para as proteínas plasmáticas ($P = 0,285$) (Figura 35).

4.7 ÍONS PLASMÁTICOS

4.7.1 Ca^{2+}

A composição plasmática de Ca^{2+} em *A. fasciatus* revelou maiores concentrações nos grupos Controle e A em relação ao grupo Inicial, sendo estes valores estatisticamente distintos ($P < 0,001$). Por sua vez, os resultados de *O. niloticus*, diferente do que foi observado para os lambaris, revelou maior

concentração deste íon apenas para o grupo controle (C) em relação aos demais grupos. Os valores de (P) na análise estatística foram de: (P= 0,002) entre C e A; (P≤ 0,001) entre C e B; (P= 0,010) entre C e D (Figura 36).

4.7.2 Na⁺

As amostras de sódio plasmático (Na⁺) não apresentaram diferenças na análise estatística para as amostras de *A. fasciatus* (P=0,963). A concentração média deste íon entre todos os grupos foi de aproximadamente 100mM, enquanto que para *O. niloticus* a média foi acima de 200mM; entre estes, os grupos experimentais apresentaram concentração média maior do que os grupos controle. Diferenças estatísticas foram registradas entre o grupo (A) com os grupos (C) e (D) (P= 0,016) (Figura 37).

4.7.3 K⁺

A concentração média de potássio (K⁺) não revelou diferenças na análise estatística para as amostras de *O. niloticus*, enquanto que para *A. fasciatus* o grupo Inicial apresentou a menor concentração deste íon, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos (P=0,003) (Figura 38).

4.7.4 Cl⁻

As análises das amostras de cloreto (Cl⁻) não revelaram diferenças estatísticas para os experimentos realizados com *A. fasciatus* (P = 0,328). Enquanto que em *O. niloticus*, os resultados demonstraram que os grupos com alumínio possuem uma concentração maior do que os grupos controle, e a análise

estatística apontou diferenças apenas entre o grupo (C) controle em pH neutro com os grupos (A) e (B) ($P=0,010$) (Figura 39).

4.7.5 Mg^{2+}

A análise deste íon plasmático foi realizada apenas para *A. fasciatus*, pois para *O. niloticus* houve complicações no processamento das amostras e estes resultados foram descartados.

A concentração iônica de magnésio (Mg^{2+}) das amostras de *A. fasciatus* não revelou diferenças na análise estatística ($P=0,430$) (Figura 40).

4.8. OSMOLALIDADE

A osmolalidade plasmática foi medida apenas em *O. niloticus*. O grupo C demonstrou a maior média, valor este estatisticamente diferente dos grupos A e B ($P<0,001$) (Figura 41).

4.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MICROSCÓPICA

Foram processadas amostras de três tecidos: fígado, ovários e brânquias. As análises histológicas inseriram-se neste trabalho como ferramentas de investigação morfológica dos efeitos tóxicos do alumínio e do pH ácido.

4.9.1 OVÁRIOS

Inicialmente, durante a dissecação dos exemplares de ambas as espécies, as gônadas foram observadas quanto à sua disposição, cor e estado de

maturação aparente, este último foi confirmado apenas após uma análise histológica. Para estas conclusões, seguiu-se a classificação proposta por Vazzoler (1996).

Com relação aos dados macroscópicos dos lambaris, além daqueles referentes ao estágio de maturação e diferenças nos estágios de desenvolvimento dos gametas entre os grupos experimentais, foi possível verificar que a coloração das gônadas apresentou-se sob tons de cinza claro e escuro; porém, no grupo com alumínio, além desta tonalidade, manchas de tom alaranjado, distribuídas de maneira irregular sobre todo este órgão foram visualizadas.

Dispostos ventralmente, os ovários são órgãos pares, alongados, achatados dorso-ventralmente (*A. fasciatus*) (Figura 8A) ou saculiformes (*O. niloticus*) (Figura 9A), situados na cavidade abdominal em posição ventral a órgãos como os rins e à bexiga natatória.

Os ovários de *A. fasciatus* de ambos os grupos experimentais apresentaram oócitos com grande número de grânulos de vitelo dispersos por todo o citoplasma devido aos processos de vitelogênese endógena (ovário) e exógena (fígado). Alguns núcleos dos oócitos observados não apresentaram forma definida e seu contorno mostrou-se irregular (Figuras 42A, C).

Entre os oócitos observados, alguns apresentaram o núcleo ocupando a porção mais central do citoplasma, ou um pouco afastados desta área, estas são características de oócitos na fase de vitelogênese (Figura 42A, B e C).

Apesar do objetivo da análise histológica gonadal ter sido principalmente para a confirmação do estágio de maturação, os resultados demonstraram que os

exemplares de *A. fasciatus* do grupo em exposição ao alumínio apresentaram entre os oócitos vitelogênicos e maduros um grande número de oócitos na fase perinucleolar, ou seja, oócitos com inúmeros nucléolos de diferentes tamanhos juntos a membrana nuclear (Figura 42C). Algumas destas células se apresentaram sob diferentes tamanhos, o que reflete diferentes níveis de maturação.

Ainda entre os oócitos maduros e oócitos na fase perinucleolar estiveram presentes oócitos cortical – alveolares, detectados pela presença de vacúolos citoplasmáticos contendo lipídio (Figura 42C). Estas células são aquelas que estão entre as fases pré-vitelogênicas e vitelogênicas.

A análise macroscópica das gônadas de *O. niloticus*, permitir observar que estes animais estavam possivelmente em condições reprodutivas maduras ou condições bem próximas a esta, pois as gônadas estavam ocupando grande espaço na cavidade abdominal e apresentaram tons de amarelo com pequenos corpúsculos (oócitos) visíveis a olho nu, característicos de um animal maduro ou em condições similares.

Na análise gonadal microscópica dos exemplares de *O. niloticus* notou-se a presença de oócitos em vários estágios de desenvolvimento (Figura 43C e D), e nenhum deles apresentou uma característica manifestada de forma homogênea.

Frente a estes resultados é importante ressaltar mais uma vez o tipo de estratégia de desova apresentada por esta espécie (parcelada). Para estes ensaios os indivíduos foram selecionados de forma a manter os padrões morfométricos e ponderais mais semelhantes possíveis.

A análise microscópica não evidenciou claramente o estágio de maturação gonadal devido à presença de oócitos em diferentes etapas de desenvolvimento. Oócitos em estágio avançado de maturação foram as células gonadais mais abundantes entre todos os animais desta espécie estudados (Figura 43A). Entre as características de uma célula neste estágio de desenvolvimento estão o grande número de corpúsculos (vacúolos) contendo lipídio, como também glóbulos de vitelo em formação depositados no citoplasma (Figura 43B).

Além dos oócitos vitelogênicos, inúmeros oócitos perinucleolares e cortical-alveolares também foram detectados nas gônadas dos animais, independente do grupo experimental (Figura 43C e D).

Com estes resultados, pode-se concluir que o estágio de desenvolvimento gonadal desta espécie se encontra na etapa de maturação avançada e/ou final. A conclusão a respeito do estágio de maturação das gônadas partiu de resultados da análise microscópica juntamente com os dados macroscópicos, além do que foi observado no IGS e na concentração dos esteróides gonadais.

4.9.2 FÍGADO

O tecido hepático foi analisado por ser a região que atua na desintoxicação como também no metabolismo energético, que está diretamente relacionado com os eventos reprodutivos, dentre os quais está a síntese de vitelogenina.

A análise macroscópica do fígado de *A. fasciatus* não foi considerada para os resultados de possíveis efeitos tóxicos do alumínio, pois não foi possível estabelecer um critério para explicar as mudanças na coloração deste tecido,

observadas entre os grupos, visto que por vezes uma coloração vermelha intensa a um marrom escuro se fez presente entre os diferentes espécimes.

Quanto às análises hepáticas macroscópicas de *O. niloticus*, nenhuma característica peculiar foi detectada, ou seja, não foi percebida nenhuma evidência de lesão neste órgão neste tipo de análise.

Nos resultados deste trabalho, foram apresentados apenas dados referentes à análise microscópica deste tecido, a fim de buscar efeitos relacionados a uma possível histopatologia causada pela exposição ao alumínio.

Analizados microscopicamente, os fígados de exemplares de *A. fasciatus* (grupo controle) apresentaram hepatócitos bem delimitados, com núcleo definido e citoplasma regular, e em relação à disposição destas células, estas se mostraram organizadas, sendo possível observar vasos e células sanguíneas em sua constituição morfológica normal (Figura 44A).

Nos grupos expostos ao alumínio, uma intensa atividade leucocitária e uma descaracterização na estrutura organizacional dos hepatócitos foi detectada (Figuras 44B e D). Estes se tornaram dispersos, com núcleo aumentado e citoplasma irregular alongado (Figura 44C).

O fígado de *O. niloticus* dos grupos expostos ao alumínio apresentou os hepatócitos com citoplasma expandido, nestas células o núcleo nem sempre esteve bem visível e definido. (Figura 44E). Vasos e células sanguíneas também sofreram alterações, comparados ao grupo controle (Figura 44F). Nesta mesma figura podem ser observadas áreas de alteração no epitélio.

Por fim, os resultados aqui apresentados apenas ilustram e ratificam a aplicação de biomarcadores histológicos, porém um detalhamento mais profundo destes resultados se faz necessário para sua correta interpretação.

4.9.3 BRÂNQUIAS

As brânquias também foram analisadas por se destacarem como alvo primordial da ação de poluentes, pois constituem a interface entre os meios biológicos e químicos, tal como pode ser verificado na descrição a seguir.

É importante destacar que estas análises não objetivaram uma descrição quantitativa ou qualitativa em detalhes, mas sim verificar a aplicabilidade das brânquias como biomarcador para o alumínio e para o pH ácido entre os tipos de ensaios realizados, e dessa forma, expor descritivamente os efeitos lesivos destes agentes estressores.

As manifestações de agressão ao epitélio celular foram registradas nos dois tipos de ensaios, e embora não tenha sido realizada nenhuma análise quantitativa, os animais dos ensaios crônicos apresentaram uma maior variedade e quantidade destas manifestações quando comparados aos animais dos ensaios agudos.

Não se excluem os animais de ambas espécies do grupo controle, de apresentarem possíveis lesões celulares sobre o epitélio branquial, embora tais situações sejam passíveis de ocorrência, ocorrem em menor grau e número.

A estrutura morfológica das células e a disposição das lamelas secundárias dos exemplares de *A. fasciatus* em condições saudáveis (grupo controle) podem ser verificadas nas figuras 45A e B.

A análise histológica das brânquias de *A. fasciatus* revelou alterações morfológicas sobre a estrutura das lamelas secundárias com acentuada ocorrência de fusão lamelar (associação entre as lamelas primárias ou secundárias) e até mesmo, áreas de colapso nestas lamelas (Figuras 49C, E, F). Ainda nas lamelas secundárias, foram observadas ectasias (aumento, ou dilatação no diâmetro dos vasos através do acúmulo de eritrócitos, seguindo-se a formação de um edema) e telangiectasias (dilatação da vasculatura periférica do epitélio branquial) (Figuras 45D e 45 E).

As ectasias ou aneurismas e as telangiectasias foram observadas em grande intensidade nos animais expostos ao alumínio, mas em menor intensidade, quando comparadas à ocorrência de fusão lamelar que se difundiu entre todos os grupos experimentais.

Além destas lesões, células com hipertrofia, ou seja, com acúmulo de líquido no citoplasma e com conseqüente aumento do diâmetro citoplasmático também foram detectadas, embora a presença deste tipo de lesão tenha sido menos observada (Figura 45F).

A análise histológica das brânquias de *O. niloticus* revelou que camadas de células epiteliais se desprenderam das lamelas secundárias. Este tipo de lesão se manifestou apenas nesta espécie, porém, não apenas nos grupos com alumínio, mas também nos grupos controle; neste último, ectasias e fusão nas lamelas secundárias também foram observadas (Figuras 46A, B e F).

Outras lesões comuns nos grupos em exposição ao contaminante metálico foram, áreas de alteração epitelial, estreitamento e fusão das lamelas secundárias,

ectasias e colapso na superfície lamelar nos grupos com alumínio (Figuras 46C, D e E). Os dois grupos de animais em exposição ao alumínio (ácido e neutro) apresentaram os mesmos tipos de lesão, não ocorrendo em nenhum dos casos observados uma lesão específica para um destes grupos, embora o grupo alumínio em pH ácido tenha apresentado uma intensidade destas lesões de forma mais intensa do que no grupo alumínio em pH neutro.

Estruturalmente as brânquias de *O. niloticus* e de *A. fasciatus*, são diferentes, fato facilmente constatado após uma simples observação microscópica destas estruturas, entretanto, uma interpretação destas diferenças estruturais requer uma análise mais específica, o que não ocorreu nesta pesquisa; mas, independente disso, as análises mostraram que o tipo de lesão e como estas se propagam não foram exatamente os mesmos entre estas duas espécies.

4.10. ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS)

Os resultados do IGS de *A. fasciatus* revelaram que houve uma diminuição nos valores deste parâmetro entre todos os grupos durante o período experimental, pois tanto o grupo controle quanto aquele exposto ao alumínio tiveram o IGS reduzido em relação ao grupo inicial ($P < 0,001$). A análise estatística revelou que os grupos A e Controle não apresentam diferenças significativas ($P = 0,102$).

Conforme mencionado anteriormente, tomou-se o cuidado para selecionar os exemplares de *O. niloticus* para que estivessem em estádios de desenvolvimento gonadal semelhantes, uma vez que este animal apresenta

desova parcelada pois, caso contrário, os resultados obtidos poderiam ser arbitrários ou de difícil interpretação para alguns parâmetros, como por exemplo, o IGS.

Os resultados obtidos demonstram que a seleção dos espécimes modelo alcançou índices satisfatórios quanto à homogeneidade no desenvolvimento gonadal, não sendo detectada diferença estatística entre os grupos experimentais ($P= 0,762$) (Figura 47).

4.11. ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS)

A análise do IHS mostrou não haver diferenças estatísticas significativas no experimento crônico com *A. fasciatus* ($P= 0,323$) e nem no experimento agudo com *O. niloticus* ($P= 0,393$) (Figura 48).

4.12. MASSA CORPÓREA

A massa corporal total de cada animal foi registrada e os valores médios de cada grupo estão expressos na figura 33. Frente à homogeneidade apresentada, não ocorreram diferenças estatísticas significativas, nem para *A. fasciatus* ($P=0,085$) como para *O. niloticus* ($P= 0,530$) (Figura 49).

5. DISCUSSÃO

5.1 – A RELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA E OS ENSAIOS REALIZADOS.

A civilização humana desde a sua existência usufrui os recursos naturais deste planeta não apenas para sua sobrevivência, mas também para a expansão e desenvolvimento da sociedade como um todo. Conseqüentemente, ao longo do tempo, a industrialização, o crescimento exacerbado dos grandes centros urbanos, a evolução tecnológica, entre outras características, trazem consigo o poder de agentes de transformação e deterioração da Biosfera.

Infelizmente, apenas em 1960, a poluição se tornou um fato reconhecido internacionalmente, embora desde 1863 já existissem estudos de efeitos de despejos industriais com organismos aquáticos (Zagatto & Bertoletti, 2006). Na década de 1940 o uso de testes com peixes já era recomendado para avaliar os efeitos da poluição e nestes estudos iniciais, percebeu-se que algumas espécies de peixes eram mais sensíveis do que outras (Zagatto & Bertoletti, 2006).

Atualmente existem ensaios padronizados para poluentes específicos com organismos teste definidos, e protocolos de execução validados e reconhecidos mundialmente, contudo, há muita discussão entre os pesquisadores que trabalham com ecotoxicologia a respeito da real importância ecológica de muitos desses ensaios, uma vez que estes são realizados em condições laboratoriais.

Avaliar os efeitos de um metal dissolvido na água sobre a fauna aquática com a utilização de bioensaios requer o monitoramento de várias características

físico – químicas do meio para que se possa afirmar que os dados obtidos são resultantes apenas de um metal específico, e não de seu efeito combinado com demais fatores que sobre ele exercem influência, e de forma excludente, tais resultados não seriam atribuíveis apenas ao contaminante metálico (Andersen, 2006).

Cabe destacar que os problemas que envolvem a poluição aquática independente do tipo de ensaio realizado, seja ele feito em laboratório ou em campo, seja através de testes com uma única espécie, ou multiespécies, em microcosmos ou em mesocosmos, todos objetivam praticamente o mesmo fim, a proteção dos ecossistemas e da vida aquática.

O cerne desta pesquisa se afigura em uma perspectiva fisiológica da reprodução de peixes em rios neotropicais poluídos por alumínio e acidez, e as práticas ecotoxicológicas prevalecem como ferramentas essenciais na investigação desta problemática.

Após serem instituídos os objetivos nos quais todo o trabalho aqui apresentado se orientou, e descartada a hipótese de se efetuar estudos em campo devido a vários inconvenientes, prevaleceu a execução de testes laboratoriais. Sendo assim, uma série de testes piloto foi realizada para se estabelecer os procedimentos adequados na condução dos experimentos.

Inicialmente, manter a concentração de alumínio dissolvido em torno de 0,5 ug/ml nos ensaios com os peixes se constituiu em um desafio. Os resultados mostram que o comportamento deste metal é influenciado por alguns parâmetros abióticos, inerentes a constituição da água, tais como pH, temperatura, íons

dissolvidos, dureza, alcalinidade, matéria orgânica e diversos ânions, o que demonstra autenticidade com dados da literatura (Rosseland *et al.*, 1992;; Vance *et al.*, 1996; Teien *et al.*, 2006; Teien *et al.*, 2007).

Conforme apresentado nos resultados, nos ensaios com *A. fasciatus* conduzidos no biotério (USP), a concentração do alumínio manteve-se em torno de 0,5 ug/ml apenas nas horas iniciais, posteriormente, este valor diminuiu até cerca da metade, o que permite supor que as condições físicas e químicas da água utilizada tenham sido um dos elementos responsáveis por estes resultados.

A aplicação de EDTA não surtiu o efeito desejado sobre a concentração de alumínio, o que levou a decisão de não utilizá-lo nos experimentos; nem mesmo o pH, que seria a “força motriz” sobre o comportamento do alumínio não exerceu efeitos consideráveis, pois as concentrações deste metal para os ensaios em pH 7,0 e em pH 5,5 se mostraram similares, em ambas as análises realizadas (lável e total).

Os parâmetros da qualidade de água não foram monitorados para serem relacionados com a concentração do alumínio, mas sim para manter um sistema considerado ideal, com condições controladas, para que os resultados dos biomarcadores expressassem efeitos do alumínio e da acidez unicamente, impedindo a expressão de resultados equivocados.

Não é simples gerir uma explanação a respeito da concentração de alumínio observada nestes ensaios, porém, é possível discorrer sobre alguns fatores: A água utilizada nestes ensaios foi obtida do sistema público de abastecimento, tendo recebido tratamento para torná-la potável. Neste tratamento,

esta água possivelmente recebeu $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (sulfato de alumínio) para decantar impurezas, fazendo com que a quantidade de SO_4^{2-} aumentasse sensivelmente.

Além disso, as substâncias utilizadas nas estações de tratamento seguem um padrão, e é provável que além de altas concentrações de sulfato, também estivessem presentes altas concentrações de flúor, portanto (F^-) e de cloreto (Cl^-), respectivamente utilizados para a prevenção de cáries na população e para a purificação (desinfecção) da água.

Estes e outros ânions poderiam então, formar complexos com os cátions de alumínio hidrolisados e, refletir dessa forma sobre sua concentração e biodisponibilidade. Esta possibilidade de que o alumínio possa ter reagido com ânions inorgânicos, além de ser capaz de formar hidróxidos com (OH^-) não deve ser descartada, pois é provável que todas estas moléculas estivessem presentes na água utilizada. Segundo Bianchini & Bowles (2002), ligantes inorgânicos, como cloretos, bicarbonatos, tiosulfatos, entre outros, reduzem a biodisponibilidade de metais pela redução na concentração de íons metálicos livres.

Não apenas as características supramencionadas da água podem ter tido efeito sobre a concentração do alumínio, pois deve-se levar em consideração que o método empregado para adicionar este metal na água dos ensaios com *Astyanax fasciatus* não é ideal para este tipo de estudo, contudo, apesar deste método não ser adequado, vale lembrar que mesmo assim, a concentração inicial do alumínio esteve de acordo com a massa do sal utilizada, o que em parte exime o método utilizado desta situação.

A estes fatores inclui-se o local onde os bioensaios ocorreram, ou seja, as caixas que serviram como “aquários” para a execução dos mesmos. Estas são constituídas de plástico, e dessa maneira, a superfície de contato das paredes internas destas caixas, na interface com a água, pode ter sido um local para complexação de cátions de alumínio e, portanto, ter colaborado para a diminuição da concentração deste metal.

O correto entendimento de como os íons metálicos sofrem especiação, complexação, competição e causam toxicidade, requer uma análise das características da qualidade de água (Paquim *et al.*, 2002). Para uma discussão mais plausível a respeito dos resultados envolvendo a concentração do alumínio nos experimentos crônicos com *A. fasciatus* seria necessária a utilização de modelos computacionais específicos para este tipo de estudo como, por exemplo, o MINEQL (Paquim *et al.*, 2002).

Experimentalmente, o ensaio conduzido com os lambaris não se assemelha ao que foi conduzido com a tilápia, entretanto a concentração de alumínio pretendida inicialmente no experimento foi a mesma.

Enquanto que nos ensaios crônicos não foi possível manter a concentração de 0,5 ug/ml de alumínio, nos ensaios agudos o conjunto de novas práticas garantiu satisfatoriamente que esta concentração fosse mantida durante todo o período experimental, e embora tenha sido realizada a troca de água a cada 24 horas, este parece não ter sido o fator decisivo que colaborou para a estabilidade da concentração de alumínio, pois como observado nos gráficos, entre os intervalos de troca de água, não ocorreu diminuição nesta concentração.

Atribui-se então o que foi observado, primeiramente ao método de introdução do contaminante metálico na água, desde o preparo da solução estoque, até a sequência de eventos pré-experimentais. Quanto à troca de água entre as caixas, para manter o “sistema equilibrado” e evitar a perda de íons metálicos devido a complexação com a superfície interna das caixas, (conforme descrito nos métodos), foi adicionado um volume extra da solução estoque em virtude da possibilidade destes eventos de complexação virem a ocorrer.

Considerar até este ponto que a parede das caixas plásticas não interferiu na concentração de alumínio nos experimentos agudos também pode ser aplicado aos experimentos crônicos, entretanto, o que impera nesta situação é o método de adição do alumínio na água, pois além de todos estes fatores, está a composição química da água utilizada nos ensaios agudos.

Enquanto a água dos ensaios crônicos pode ter apresentado diversos ânions inorgânicos, a água dos ensaios agudos certamente continha altos teores de matéria orgânica que poderiam da mesma forma, ter se complexado com os cátions de alumínio, sendo esta mais uma justificativa para o volume extra da solução estoque utilizado, mas os resultados demonstraram que nos ensaios com pH neutro a concentração esteve acima de 0,5ug/ml, enquanto que em pH ácido esteve um pouco abaixo; dessa forma, pode-se notar claramente a influência do pH.

Por fim, sugere-se que a composição química da água e o método de adição do contaminante metálico neste meio podem ter sido os fatores decisivos para a manutenção da concentração do alumínio, porém, uma investigação

química mais profunda seria necessária para amparar e subsidiar melhores conclusões.

A temperatura e o oxigênio destacam-se entre os principais fatores abióticos que podem interferir nos resultados de ensaios ecotoxicológicos (Aragão & Araújo, 2006). O oxigênio dissolvido OD influencia a toxicidade de várias substâncias dissolvidas na água. Alguns íons metálicos como Cu, Pb e Zn, tornam-se mais tóxicos em situações de hipóxia (Exley, 1997) e, peixes nessas condições apresentam estratégias fisiológicas de aclimatização, como por exemplo, alterações sobre o metabolismo energético (Almeida – Val *et al.*, 2000). Portanto, é de extrema importância manter sob condições ideais e controladas a concentração de OD em estudos ecotoxicológicos.

A concentração de OD nos experimentos agudos foi mantida dentro de índices considerados seguros para peixes, portanto não expressaram qualquer efeito negativo sobre os experimentos. Na primeira etapa experimental com os lambaris (dezembro de 2006), apesar da concentração de OD ter apresentado valores considerados baixos, esta não ficou abaixo dos níveis críticos o suficiente (Boyd, 1990) para inviabilizar os resultados obtidos. Na etapa seguinte (fevereiro de 2007) a concentração de OD também não alcançou valores em suas concentrações considerados ideais, embora estes tenham sido sensivelmente melhores do que na primeira etapa experimental.

Consente-se que os resultados de cada biomarcador apresentado para os experimentos que envolveram *A. fasciatus* não se eximem completamente de possíveis efeitos conjuntos dos contaminantes utilizados com os efeitos de baixa

oxigenação, uma vez que a concentração de OD das duas etapas experimentais, ainda que inferiores aos valores recomendados, não chegaram a níveis críticos capazes de causar situações de hipóxia. Além disso, para uma análise mais segura destes dados seria necessário avaliar o consumo de oxigênio pela espécie em questão, tanto em águas íntegras, como também contendo alumínio. Nenhum estudo dessa natureza foi encontrado na literatura para esta espécie, que pudesse pelo menos servir como referência a uma visão comparativa.

A temperatura, da mesma forma que o OD influencia a fisiologia dos peixes, alterando o metabolismo energético e, seus efeitos não se restringem apenas a ação biológica, pois influencia a solubilidade de muitas substâncias, inclusive sobre o oxigênio dissolvido, além de ser capaz de modificar a estrutura química de várias substâncias dissolvidas (Aragão & Araújo, 2006).

Em diversos casos, a temperatura afeta a toxicidade aguda de xenobióticos, porém em outros, não, pois como as altas temperaturas aceleram o metabolismo, podem acelerar as taxas de excreção e desintoxicação (Rattner & Heath, 1995). O comportamento dos íons metálicos dissolvidos na água também é influenciado pela temperatura, o que justifica o registro diário deste parâmetro para mantê-lo sob condições controladas. Os resultados em todos os experimentos conduzidos estiveram com as temperaturas ideais para ambas as espécies estudadas, dessa forma, não teve qualquer interferência negativa sobre os biomarcadores apresentados.

Os compostos nitrogenados monitorados neste estudo (NH_3 e NO_2) são fundamentais em estudos ecotoxicológicos, como também nos estudos de cultivo

em cativeiro de peixes com interesse comercial, de onde emerge grande parte da literatura disponível a respeito da toxicidade destes compostos.

Em relação à amônia não ionizada (NH_3) a diferença nos resultados observados entre os ensaios com a tilápia e o lambari está relacionada principalmente com o tempo de cada ensaio e pelo fato de que nos ensaios agudos foi realizada a troca de água. Frente aos resultados apresentados para a tilápia, qualquer comentário sobre possíveis efeitos de toxicidade para este composto seria irrelevante, pois as concentrações observadas diariamente foram praticamente nulas, o mesmo não sendo verdadeiro para os ensaios crônicos.

O fato dos ensaios crônicos com *A. fasciatus* terem sido conduzidos sem a troca de água acarretou no aumento da concentração deste composto durante o período experimental, cujos valores médios para cada grupo (descrito nos resultados) implicam em possíveis efeitos tóxicos.

A literatura disponível não define de forma clara quais valores apontam seguramente os efeitos não tóxicos, letais e subletais da exposição de peixes a amônia (NH_3), contudo, existem vários estudos que descrevem as conseqüências desta exposição e sugerem quais concentrações podem vir a ser tóxicas, embora haja um consenso de que não há um valor definido e que cada espécie pode apresentar diferentes níveis de sensibilidade.

Alguns autores como Boyd (1990) e Lemarié (2003) descrevem respectivamente que os níveis tóxicos subletais de NH_3 para muitas espécies de peixes de água doce estejam entre 0,05 e 0,4 mg/L ou entre 0,05 e 0,2 mg/L.

Valores menores do que 0,05 mg/L não são considerados tóxicos e valores acima de 0,4 mg/L seriam letais.

Para se considerar efeitos de toxicidade em peixes expostos a concentrações subletais de NH_3 é preciso observar fatores que influenciam esta toxicidade. Entre estes fatores, pode-se destacar inicialmente as características da própria água, como por exemplo, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade, pois interferem na proporção entre os íons de NH_3 e de NH_4^+ (Whitfield, 1974; Lemarié, 2003), pois o NH_3 é de 300 a 400 vezes mais tóxicos do que o NH_4^+ . Juntamente com estas propriedades da água estão as características do indivíduo e da espécie, tais como a idade e o tamanho. Ruyet *et al.*, (1997) em estudos de toxicidade deste composto sobre juvenis de *Scophtalmus maximus* demonstra que o tamanho do indivíduo influencia no limite de toxicidade e sensibilidade.

Segundo Ruyet *et al.*, (1997); Russo & Thurston, (1991); a amônia (NH_3) é estressante aos peixes mesmo em baixas concentrações, independente da sensibilidade de cada espécie. Primariamente, os efeitos da toxicidade se manifestam no aumento do consumo de O_2 , pois o NH_3 difunde-se através da membrana das células branquiais e como consequência dificulta as trocas gasosas e desestabiliza mecanismos osmorregulatórios; entre outros efeitos ocorre a alteração do comportamento de natação e a diminuição no apetite (Ruyet *et al.*, 1997).

Os efeitos subseqüentes acarretam no aumento deste composto no sangue e nos tecidos, como músculos, fígado e cérebro Heath (1995), Russo & Thurston

(1991); Tomasso, (1994). Os efeitos sobre o sistema nervoso central, oriundos de exposição crônica podem acarretar em aumento na atividade da enzima glutamina sintetase, a qual transforma o glutamato (neurotransmissor excitatório) em glutamina, pela adição da molécula de NH_3 , ou através da transformação da amônia em uréia (Wood, 1993).

Uma análise cuidadosa do que está descrito na literatura em relação à toxicidade da amônia não ionizada (NH_3) para peixes, pode ser relacionada aos resultados dos ensaios apresentados nesta pesquisa, entretanto, tais efeitos de toxicidade não podem obviamente ser considerados separadamente, mas sim em conjunto com os efeitos tóxicos do alumínio, acidez e NO_2^- . Estes detalhes estão discutidos no próximo item junto aos biomarcadores.

O monitoramento dos compostos nitrogenados permitiu demonstrar seguramente que nos ensaios agudos não houve qualquer complicação de toxicidade para as tilápias relacionadas a estes compostos, todavia, como os resultados dos ensaios crônicos demonstraram aumento na concentração tanto de NH_3 como de NO_2^- , principalmente na segunda etapa experimental, antes de se considerar os efeitos da toxicidade do alumínio sobre a fisiologia dos lambaris, é necessária uma breve revisão dos efeitos tóxicos do NO_2^- da mesma forma que foi feito para o NH_3 , os quais são essenciais para subsidiar a discussão a seguir.

Semelhante ao que ocorre com a amônia, a sensibilidade à toxicidade do NO_2^- é diferente entre as espécies de peixes, e é provável que esta diferença esteja baseada na capacidade que cada espécie tem de acumular esta substância Willians & Eddy, (1986) argumentam que é preciso ter cautela quando se compara

a toxicidade do NO_2^- entre diferentes espécies de peixes, pois as características da água podem influenciar a toxicidade.

Estudos com *Sciaenops ocellatus* adaptados à água doce numa exposição de 48 horas, mostram que a concentração letal de NO_2^- foi de 2,8 mg/L, enquanto que na água do mar foi de 85,7 mg/L; já para a espécie *Anguilla anguilla*, também aclimatada à água doce, a concentração letal foi de 84mg/L, e na água do mar foi de 974 mg/L, ambos em 168 horas (Lima, 2005). De acordo com Boyd (1990), as concentrações seguras de NO_2^- estão entre 0,02 e 0,1 mg/L. Valores acima desta faixa de tolerância seriam estressantes para os peixes.

O NO_2^- é absorvido ativamente através do epitélio branquial e pode se acumular em altas concentrações nos fluídos corporais e assim causar vários distúrbios fisiológicos (Margiocco *et al.*, 1983). Presumivelmente, o mecanismo pelo qual o NO_2^- é absorvido pelas brânquias é através do mesmo mecanismo de troca de iônica entre $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, o que acarreta no fato de que espécies com altas taxas de absorção de Cl^- , como por exemplo a truta arco – íris e a perca, são mais sensíveis ao NO_2^- do que espécies com menores taxas de absorção deste íon (Kroupova, 2005).

Kroupova (2005) também comenta que este composto após ser absorvido parece ter o sangue como alvo primordial, e quando em altas concentrações se difunde para as hemácias provocando a oxidação do átomo de ferro da molécula de hemoglobina, convertendo – a em meta-hemoglobina (metHb), estabelecendo um quadro de hipóxia e cianose (Kroupova, 2005). O sangue de peixes nesta situação pode mudar de coloração passando do vermelho para um marrom

“chocolate”, comumente conhecido como doença do sangue marrom, devido aos efeitos do (NO_2^-) sobre a hemoglobina (Boyd, 1990).

Estudos com exemplares de matrinxã (*Brycon cephalus*) expostos a 0,2; 0,4 e 0,6 mg/L de NO_2^- mostraram que este composto causou alterações hematológicas nestes animais, tais como a diminuição do hematócrito, da hemoglobina total e do número de hemácias. Além disso, o conteúdo de meta-hemoglobina aumentou de 1% a 69% apenas em 24 horas de exposição e drasticamente de 5-6% para 90% em 96 horas, o que conseqüentemente resultou em anemia hemolítica para estes animais (Avilez *et al.*, 2004).

Jerolyn *et al.*, (1995) compararam duas espécies de peixes expostos à concentração subletal de NO_2^- (mg/L) em ensaios agudos, e demonstraram os seguintes resultados: a porcentagem de conversão de hemoglobina pra meta-hemoglobina varia de uma espécie para a outra, a concentração de íons plasmáticos como, por exemplo, o Cl^- , diminui e o tempo de recuperação a perda de íons plasmáticos também é diferente entre as espécies. Além disso, estes autores demonstraram também que a temperatura influencia estes resultados, pois age sobre a atividade da enzima meta-hemoglobina redutase, que aparentemente funciona mais lentamente em peixes aclimatados a baixas temperaturas.

Neste mesmo aspecto, Kroupova (2005) descreve que peixes altamente ativos são mais sensíveis aos efeitos do NO_2^- devido ao maior requerimento de hemoglobina na respiração, e que a quantidade de meta-hemoglobina necessária para causar qualquer dano ao peixe depende de fatores ambientais, entre os

quais está o pH, com maior toxicidade em torno de pH 5,7. Contudo, este mesmo autor ainda salienta que o aumento da meta-hemoglobina pode ocorrer em respostas inespecíficas a condições de estresse.

Outros distúrbios plasmáticos causados por exposição de peixes ao NO_2^- também foram observados por Avilez *et al.*, (2004), como alterações nos íons plasmáticos, como a concentração de K^+ que aumentou no plasma de indivíduos expostos ao NO_2^- durante um curto período de tempo (24 h), e a concentração de Cl^- que aumentou após a exposição de 96 horas. Por outro lado, a concentração de Na^+ e as proteínas plasmáticas permaneceram inalteradas. Já em estudos com *Sparus sarba*, os níveis plasmáticos de K^+ não sofreram alterações, mas ocorreu um aumento na atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase nas brânquias (Deane & Woo, 2007) de animais expostos ao NO_2^- .

Entre outros efeitos do NO_2^- sobre a fisiologia de peixes estão alterações hepáticas, tais como degeneração celular, acúmulo de NO_2^- e infiltração de células com características de macrófagos, além de vasodilatação do sistema circulatório (Costa, 2002), alterações na coloração da pele, e lesões no epitélio dos ductos biliares e no pâncreas, que podem resultar em inchaços abdominais devido à excessiva quantidade de fluido na cavidade abdominal e estômago (Costa, 2001).

Influências do NO_2^- sobre o metabolismo energético também já foram descritas, como a concentração de glicose e lactato plasmáticos que aumentaram em alevinos de *Rhamdia quelen*, indicando a ativação do metabolismo anaeróbico nesta condição de estresse (Lima, 2005).

Desajustes endócrinos também são atribuídos ao NO_2^- , como em *Sparus sarba* que ocorreu diminuição nos níveis do hormônio tireoideano, tiroxina (t_4) na em situações de exposição ao NO_2^- . Além destes efeitos, também foi constatada uma situação de estresse celular, pois ocorreu um aumento na síntese de proteínas de estresse, *Heat Shock Proteins* (HSP 70) nas brânquias e também nos rins e fígado (HSP 90) (Deane & Woo, 2007).

Mecanismos de desintoxicação que convertem NO_2^- em NO nos peixes, podem inibir o citocromo P450 scc (*cholesterol side chain cleavage enzyme*), o qual integra a conversão do colesterol em hormônios esteróides, e dessa forma poderia prejudicar a síntese de hormônios esteróides (Panesar & Cham, 2000).

A toxicidade do NO_2^- no meio aquático depende de vários fatores da água, por exemplo, a salinidade a concentração de OD e a concentração de alguns íons, como exemplo o Cl^- e o Na^+ , que apresentam forte efeito na diminuição da toxicidade do (NO_2^-) (Willians & Eddy, 1986).

O pH se sobressai como um dos mais importantes fatores que influenciam a toxicidade de várias substâncias presentes na água, entres as quais estão os compostos nitrogenados (amônia, nitrato, nitrito), o cianeto e os metais (Aragão & Araújo, 2006). A solubilidade do alumínio ocorre em função do pH, que é o mais importante fator ambiental que controla a toxicidade deste metal (Mount, 1988; Vuorinen, 2003).

As respostas biológicas apresentadas por *A. fasciatus* e por *O. niloticus* nos ensaios realizados sob a exposição do alumínio e do pH ácido, juntamente com as variáveis abióticas registradas, estão discutidas logo a seguir.

5.2. BIOMARCADORES UTILIZADOS NOS ENSAIOS COM *A. fasciatus* e *O. niloticus*

As brânquias são os principais órgãos alvo do alumínio e do pH ácido e os efeitos da toxicidade destes poluentes nestes órgãos manifestam-se por disfunções ionorregulatórias, osmorregulatórias, respiratórias (Raymond *et al.*, 1983; Neville, 1985; Mount *et al.*, 1988; Playle *et al.*, 1989; Exley *et al.*, 1991; Poléo, 1997; Gensemer & Playle, 1999), acidose plasmática, hipóxia e redução da osmolalidade plasmática (Poléo, 1997). Os problemas ionorregulatórios são causados pela interação de espécies de alumínio positivamente carregadas, principalmente o Al^{3+} com a superfície branquial carregada negativamente. (Gensemer & Playle, 1999).

Uma vez “ligado” na superfície branquial, o alumínio diminui a absorção ativa de íons pela redução da atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase, por danificar as células de cloreto, ou talvez por interferir sobre os canais iônicos (Gensemer & Playle, 1999). De uma forma geral, os distúrbios na regulação iônica envolvem principalmente a perda plasmática de sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) (Muniz & Leivestad, 1980; Vuorinen *et al.*, 2003), sendo esta a causa primária da morte de muitos peixes (Sayer *et al.*, 1991), juntamente com a diminuição do hematócrito e das proteínas plasmáticas (Mount *et al.*, 1988, Raymond *et al.*, 1983).

Alterações nas concentrações iônicas de Cl^- e Na^+ não foram observadas no experimento crônico com *A. fasciatus*, mas sim no experimento agudo com *O. niloticus*, que será discutido posteriormente.

A concentração registrada para o magnésio esteve dentro de padrões normais, já em relação ao potássio, primeiramente poderia ser sugerido que o aumento da concentração deste íon no grupo (A) estaria relacionado ao tipo de sal utilizado para a adição do alumínio na água, pois este contém potássio em sua molécula ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$), e isto poderia ter causado um aumento na concentração de potássio na água dos ensaios e dessa forma os peixes poderiam tê-lo absorvido por simples difusão. Entretanto esta hipótese pode ser descartada uma vez que o grupo controle também apresentou aumento na concentração plasmática deste íon.

Sabe-se que o NO_2^- interfere na homeostase do potássio, causando um aumento deste íon no plasma, que é liberado a partir de compartimentos intracelulares. Este efluxo de potássio para o plasma ocorre nas hemácias através da estimulação do mecanismo de co-transporte entre Cl^- e K^+ pelo NO_2^- (Knudsen & Jensen, 1997). Estes mesmos autores sugerem que o NO_2^- pode interferir na Na^+K^+ - ATPase provocando uma alteração no balanço destes íons.

Aggeraard & Jensen (2001) *apud* Martinez & Souza (2002) relatam que a truta arco-íris exposta ao NO_2^- apresenta um aumento do K^+ plasmático e uma diminuição do Cl^- , também plasmático. Martinez & Souza (2002) em um estudo comparativo entre as espécies *Prochilodus lineatus* e *Astyanax altiparanae* expostos a 30 mg l^{-1} de NaNO_2 (0,06 mM de nitrito) durante 96 horas, mostraram que em *P. lineatus* ocorreu um aumento do K^+ plasmático, e que esta espécie é mais sensível aos efeitos do NO_2^- do que *A. altiparanae*, que é uma das espécies de peixes mais resistentes ao NO_2^- , fato que pode estar relacionado a atividade da

enzima metHB redutase, que reduz a meta-hemoglobina de volta a hemoglobina. Além disso, mostraram ainda que a diferença na sensibilidade ao NO_2^- entre estas duas espécies pode estar relacionada a diferenças na permeabilidade do epitélio das brânquias ou das hemácias ao NO_2^- .

Antes de discutir os resultados da concentração de Ca^{2+} plasmático, é necessário fazer uma breve descrição da toxicidade aguda do alumínio e sua relação com este íon. Os íons de alumínio positivamente carregados (Al^{3+}), ou hidróxidos de alumínio podem se ligar facilmente em locais negativamente carregados da superfície branquial. Estes locais atuam como núcleos de polimerização do alumínio, que então se acumula nas brânquias devido a estes processos, como também a processos de precipitação (Poléo, 1995).

A polimerização do alumínio primeiramente causa hipóxia, pois ocorre o aumento da secreção de muco que pode resultar em severa obstrução dos espaços interlamelares, cuja consequência vai ser a redução do fluxo de água sobre a superfície branquial e o aumento do espaço para difusão dos gases respiratórios (Exley *et al.*, 1991; Poléo, 1995).

Intracelularmente, o alumínio pode substituir íons como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} , ligados a biomoléculas, ou ainda se ligar ao fosfato e ao ATP. Pode-se dizer que a mais séria consequência do acúmulo intracelular de alumínio são alterações na homeostase citosólica do Ca^{2+} , que resulta em morte celular (Poléo, 1995). Portanto, o cálcio tem um papel importante nos efeitos tóxicos do alumínio, e a alteração sobre sua composição plasmática em peixes expostos a este metal está

relacionada a processos de interação entre estes dois metais que ocorre inicialmente na mucosa branquial.

Na mucosa branquial, o alumínio se “liga” aos seguintes grupos funcionais na superfície das membranas das células branquiais: fosfatos, carboxilatos, carbonils, hidroxils, fosfolipídios, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina e proteínas transportadoras de membrana (co-fatores metálicos), reduzindo dessa forma a fluidez da membrana (Exley, 1991), além de se ligar a glicoproteínas (muco) que recobrem a superfície das brânquias. Adicionalmente há uma interação competitiva entre as espécies de alumínio com, Ca^{2+} , Na^+ e Mg^{2+} e até H^+ , que da mesma forma pode alterar a permeabilidade da membrana (Exley, 1991).

Entre os resultados observados nos ensaios crônicos, a concentração de Ca^{2+} plasmático dos exemplares de *A. fasciatus* do grupo inicial foi menor pelo fato de que estes animais foram amostrados 14 dias antes dos outros animais, sendo que todos os exemplares, dos três grupos estavam no período reprodutivo, e nesta fase, ocorre a vitelogênese, onde a concentração de Ca^{2+} plasmático aumenta para que a VTG seja transportada até os ovários na forma de complexos com este íon (Vuorinen *et al.*, 2003); portanto, a exposição crônica ao alumínio não exerceu influência sobre a concentração plasmática do Ca^{2+} , fato que pode estar relacionado a uma possível aclimação fisiológica destes animais.

A composição iônica plasmática de *O. niloticus* está relacionada aos efeitos do alumínio e/ou do pH ácido, dependendo do grupo experimental considerado. Nenhum efeito de toxicidade foi relacionado aos compostos nitrogenados,

temperatura ou OD, pois todos estes parâmetros foram mantidos em condições ideais.

Os íons plasmáticos, Na^+ e Cl^- , dos exemplares *O. niloticus* expostos ao alumínio aumentaram após o período de exposição de 96 horas. Estes resultados mostram-se contraproducentes e distintos de trabalhos publicados a respeito dos efeitos do alumínio e do pH ácido em ensaios agudos. Nenhum efeito foi evidenciado sobre o K^+ plasmático, entretanto para o Ca^{2+} , enquanto os ensaios crônicos mostraram aumento na concentração deste metal tanto para o controle quanto para o grupo com alumínio, nos ensaios agudos os efeitos de diminuição deste íon nos grupos com alumínio e no grupo controle em pH ácido foram evidentes.

Para interpretar os resultados observados para o Ca^{2+} com as tilápias, é preciso considerar que, assim como os lambaris, estes animais também estavam em processo de vitelogênese, além disso, a água utilizada nestes ensaios continha praticamente a metade da concentração de Ca^{2+} da água dos ensaios com os lambaris.

Sabe-se que os íons Ca^{2+} protegem as brânquias contra os efeitos tóxicos causados pelo alumínio, onde se destacam inicialmente os distúrbios ionorregulatórios (Exley *et al.*, 1991). Ao mesmo tempo, altas concentrações de alumínio interferem no balanço de Ca^{2+} , assim, a toxicidade do alumínio é resultante da diminuição na concentração deste íon, que se agrava ainda mais em águas ácidas, porque ocorre desestabilização da membrana das células

branquiais e deste modo a permeabilidade eletrolítica fica reduzida (Gensemer & Playle, 1999).

Estudos sobre os efeitos da toxicidade do alumínio e do pH sobre peixes neotropicais são escassos (Barcarolli & Martinez, 2004), situação esta pior para o gênero *Astyanax*, exceto por poucos estudos, tais como Salibian & Fichera (1981) com *A. fasciatus* e Gil *et al.*, (1993) em estudos com *Astyanax bimaculatus*. Nenhum estudo foi encontrado na literatura referente ao comportamento de animais deste gênero sob influência do alumínio.

Sabe-se que salmonídeos expostos ao alumínio e à acidez aquática apresentam desordem comportamental, que abrange rejeição alimentar, alteração dos padrões de natação e lentidão nas reações de alerta e morte (Bjerknes *et al.*, 2003). Peixes submetidos ao estresse agudo diminuem a ingestão de alimentos e não tem apetite, sendo estes efeitos atribuídos principalmente ao aumento nos níveis de cortisol (Peuranen, *et al.*, 1993).

As disfunções sobre o comportamento de peixes expostos a condições de acidez podem comprometer a habilidade de sobrevivência e aclimatização. As espécies que conseguem se aclimatizar, possivelmente originarão indivíduos com tamanho reduzido (Buckler *et al.*, 1994). Salmonídeos conseguem se aclimatar a baixas concentrações de alumínio, fato que requer ajustes fisiológicos principalmente sobre a regulação iônica e a respiração, envolvendo reduções nas perdas de íons e mudanças na estrutura branquial (Allin & Wilson, 2000).

O mecanismo de aclimação ao alumínio é incerto, mas aparentemente ocorre um aumento da atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase, que juntamente com

outros mecanismos fisiológicos, muitos dos quais ainda desconhecidos, possibilita a persistência da espécie nos ecossistemas, embora com um alto custo metabólico (Wilson & Wood, 1994).

Foi descrito anteriormente que o comportamento de *O. niloticus* foi considerado normal e que *A. fasciatus* mostrou sinais de estresse, tais como agitação, descamação, falta de apetite, produção de muco e agressividade, além das elevadas taxas de mortalidade, também relacionadas ao estresse. Todos estes sintomas relacionados ao estresse estiveram presentes em todos os grupos experimentais, e pelo fato de não ter sido percebida nenhuma diferença relacionada aos efeitos tóxicos do alumínio, ou dos compostos nitrogenados, que por sua vez, poderiam ser os agentes desencadeadores desse estresse, considera-se que *A. fasciatus* é uma espécie sensível ao manejo e que a sua utilização em testes ecotoxicológicos requer práticas que sejam capazes de minimizar tais efeitos.

O comportamento apresentado por *A. fasciatus* levou a uma re-averiguação dos métodos que foram empregados nos ensaios, o que trouxe a hipótese de se adotar uma nova postura referente ao período de aclimação e também a transposição dos animais da piscicultura até o biotério/USP para uma água com diferentes composições químicas (detalhes nas tabelas 2 e 3), pois estes fatores poderiam estar relacionados ao estresse.

Como vários fatores podem estar relacionados ao comportamento dos lambaris, foi realizado um teste para ponderar a respeito de quais fatores seriam aversivos para esta espécie, portanto, um novo grupo de indivíduos foi

selecionado e mantido na piscicultura com a água e o fotoperíodo aos quais já estavam habituados, e desta vez com uma menor densidade de animais por caixas plásticas. Foi também instituído um grupo com a proporção sexual de 2:1 (fêmeas e machos), relevante para detectar possíveis efeitos de estresse social.

Com essas novas medidas, iniciou-se um novo período de confinamento de *A. fasciatus*, e no desenrolar deste período, várias das características de estresse apresentadas anteriormente se repetiram, e no quinto dia, 100% dos animais em confinamento morreram, sendo que todos estes estavam em condições experimentais adequadas de oxigenação, fotoperíodo e temperatura. A água utilizada e a temperatura foram as mesmas as quais esta espécie estava habituada nos tanques de cultivo, o que demonstra que estas práticas não surtiram efeito para amenizar o estresse sofrido por estes animais.

Acredita-se que possivelmente as caixas plásticas, quanto a sua estrutura (forma e cor) possam ter influência no comportamento observado para esta espécie, comportamento este que por sua vez dificultou a realização dos ensaios crônicos.

Segundo Bradshaw (1986), o estresse é a resultante fisiológica das demandas que excedem as capacidades regulatórias de um organismo, e que o nível ou a intensidade do estresse apresentado pelo animal só pode ser medido a partir da magnitude do desvio de seu estado homeostático normal (Bradshaw, 2007). De acordo com Lima *et al.*, (2006) a ação dos estressores é dupla, eles produzem efeitos que ameaçam ou perturbam o equilíbrio homeostático e também

provocam um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas como ação compensatória e/ou adaptativa, capacitando o animal para superar as ameaças.

Sob estresse constante e intenso, a resposta fisiológica pode perder seu valor adaptativo e tornar-se disfuncional, acarretando danos permanentes à saúde e bem estar (Carmichael, 1984). O aspecto central da adaptação ao estresse é a re-alocação de energia para longe de atividades de alta demanda energética, como crescimento e reprodução em direção a atividades que requerem intensificação para restaurar a homeostase, tais como respiração, locomoção, balanço hidromineral e reparação de tecidos (Lima *et al.*, 2006).

O cortisol plasmático é o indicador de estresse mais largamente utilizado em peixes, qualquer que seja o seu estágio de desenvolvimento (Weendelar Bonga, 1997). Brânquias, intestino e fígado são alvos importantes para o cortisol, os quais refletem as duas maiores ações desse hormônio, isto é, o controle do balanço hidromineral e do metabolismo energético (Lima *et al.*, 2006). Este hormônio é o principal corticosteróide produzido pelos peixes, sendo sintetizado pelas células interrenais, de onde é secretado para a circulação sanguínea, em resposta a muitas formas de estresse ambiental (Mosconi *et al.*, 2006).

O cortisol tem um papel adaptativo nas condições de estresse em curto prazo, porém quando os níveis se elevam e permanecem por um período prolongado, o cortisol pode aumentar a suscetibilidade a doenças, diminuir o crescimento e interferir com a reprodução (Pickering, 1992). Quando o estressor é crônico, concentrações de cortisol podem permanecer elevadas, embora bem abaixo dos níveis de pico (Wendeelar-Bonga, 1997; Liebert & Schrek, 2006).

A resposta primária ao estresse compreende a liberação de catecolaminas e corticosteróides, enquanto que a resposta secundária inclui o aumento dos batimentos cardíacos e do consumo de oxigênio, a mobilização de substratos energéticos e efeitos sobre o balanço hidromineral. A resposta terciária manifesta-se em nível de população, com a inibição do crescimento, da reprodução e supressão da resposta imune (Selye, 1950).

As dosagens do cortisol plasmático de *A. fasciatus* revelaram que o alumínio provocou uma resposta endócrina ao estresse, pois o aumento deste hormônio ocorreu unicamente no grupo (A). Por outro lado, em *O. niloticus* não se pode afirmar que o alumínio causou um aumento na síntese de cortisol. Este estudo não apresentou nenhum dado comparativo para se questionar a respeito do aumento do cortisol quanto ao manejo de *A. fasciatus*, pois os resultados apresentados para o grupo inicial correspondem ao período de aclimação (após 7 dias de confinamento nas caixas plásticas), de forma que não é possível avaliar se o manejo inicial provocou um súbito aumento na concentração deste hormônio, ou se ocorreu uma diminuição a medida que os animais conseguiram se aclimatar às novas condições, sendo esta uma situação comum no manejo de peixes (Weendelar Bonga, 1997).

Os valores semelhantes de cortisol encontrados entre os grupos inicial e controle estão possivelmente relacionados aos efeitos causados pelo confinamento, pois nenhum estressor químico que fosse capaz de produzir uma resposta fisiológica (hormonal) estava presente, e sabe-se que este hormônio é sintetizado em respostas inespecíficas ao estresse.

Apesar do fato de que o cortisol age sobre o balanço hidromineral, as baixas concentrações de Na^+ e Cl^- , como também a alta concentração de K^+ , possivelmente poderiam estar relacionadas aos ajustes realizados por este hormônio, todavia, a ausência na amostragem de indivíduos logo após a captura, dificulta qualquer correlação entre a concentração iônica plasmática e o cortisol.

Quanto aos resultados observados para *O. niloticus*, em uma primeira análise, o grupo (A) apresentou a maior concentração de cortisol, mas o curioso é que o grupo (C), também demonstrou altas concentrações deste hormônio, e neste caso, o que chama a atenção é que o grupo (B) apresentou a menor concentração entre os quatro grupos experimentais. Contrariamente ao que foi observado para o cortisol nestes ensaios, esperava-se que as condições mais estressantes fossem aquelas em que o alumínio estava presente e que em pH ácido este quadro se agravasse, no entanto, os resultados foram contrários aos de diversos trabalhos publicados na literatura, o que implica em considerar as condições pré-experimentais.

Os tanques de cultivo onde os exemplares de *O. niloticus* eram mantidos anteriormente ao início dos ensaios agudos, devido a sua estrutura de alvenaria, possuem uma freqüente variação no pH, que de acordo com dados da piscicultura de Ponte Nova, esta variação chega a ser discrepante, ou seja, variavam desde 4,8 até 8,6. De acordo com estes dados, pode-se supor que devido ao curto tempo de duração dos ensaios e pela variação do pH nos tanques de cultivo, estes animais provavelmente estavam aclimatados a uma água com teores de acidez, dessa forma, quando expostas ao pH neutro, ocorreu um aumento na síntese de

cortisol, pois como mencionado anteriormente, este hormônio participa nos processos de ajustes fisiológicos a condições adversas. Os exemplares mantidos em pH ácido mostraram menor concentração de cortisol, o que sugere um menor desconforto fisiológico. Paralelamente, deve-se levar em consideração o fato de que a tilápia é uma das espécies mais resistentes ao manejo e as adversidades ambientais.

Outras considerações dos efeitos do cortisol podem ser feitas ao se considerar as análises dos esteróides gonadais e dos substratos energéticos, discutidos adiante, pois diversas pesquisas têm demonstrado a capacidade do estresse em inibir o desempenho reprodutivo de peixes (Pickering, 1992). Quando expostos a situações estressantes severas ou de longa duração, os peixes têm seus processos reprodutivos perturbados devido à depressão da atividade hipofisária, principalmente nos níveis plasmáticos de gonadotropinas (Lima, 2006), hormônios esteróides (Pickering, 1992) e à redução no tamanho dos ovos e na qualidade das larvas (Lima, 2006).

Nem todo aumento na concentração de cortisol pode ser atribuído a ameaças no sentido negativo. De modo contrário, a ausência de concentrações claramente elevadas pode não estar relacionada à falta de estressores (Lima *et al.*, 2006). Acredita-se que o grau de resposta fisiológica do cortisol possua um componente genético (Fevolden *et al.*, 2002), sendo que trabalhos mostram que a magnitude do nível de corticosteróides em resposta ao estresse pode ser muito variável entre peixes, mesmo dentro da mesma espécie (Lima *et al.*, 2006).

Embora a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura sugira que o estresse fisiológico afeta negativamente o processo reprodutivo de teleósteos por meio da função endócrina modificada (Lima, 2006), a correlação entre estresse, cortisol e sucesso reprodutivo ainda não está suficientemente clara.

A análise do perfil metabólico energético é importante para estudos que avaliam o efeito da toxicidade de metais sobre peixes, mas infelizmente este tipo de literatura para espécies neotropicais é escasso. Os resultados das concentrações de lipídios totais e de proteínas totais deste estudo apresentaram respostas distintas entre as espécies de peixes estudadas. Estas diferenças podem estar relacionadas ao tipo de desova, a sensibilidade apresentada por cada espécie, com o tipo do ensaio utilizado (agudo e crônico) e também à toxicidade do alumínio, pois não é apenas a concentração metálica que define sua toxicidade, mas também as espécies químicas que variam de acordo com a composição química da água.

Barcarolli & Martinez (2003), não observaram modificações nas proteínas totais e lipídios totais no plasma de *Leporinus macrocephalus* expostos durante 96 horas em 15 ug Al. L⁻¹ em pH 5, mas observaram um aumento na glicose plasmática ocorrendo nas primeiras 24 horas de exposição, que provavelmente se deve ao estresse agudo. Este aumento da glicose plasmática indica a ativação do metabolismo de carboidratos, que em peixes normalmente está sob o controle do cortisol (Brown & Whitehead, 1995 apud Barcarolli & Martinez 2003). Neste mesmo trabalho, estes autores relatam que a hiperglicemia nas primeiras 24 horas experimentais, seguidos de uma diminuição dos lipídios e glicose plasmáticos

após este período de exposição inicial demonstra uma clássica adaptação ao estresse.

Tratando-se do conteúdo de lipídios totais (Lt) das gônadas de *A. fasciatus*, os resultados mostram que não ocorreram influências da toxicidade ou do estresse, pois a concentração manteve-se praticamente a mesma entre os grupos experimentais.

Já em *O. niloticus*, os animais dos grupos expostos ao alumínio mostraram praticamente o dobro de lipídios gonadais quando comparados aos animais dos grupos controle. Propor um possível mecanismo pelo qual os grupos sob o efeito agudo destes estressores químicos tenham incorporado mais lipídios, ao mesmo tempo em que o mesmo não ocorreu no plasma seria pretensioso demais apenas com os biomarcadores utilizados neste estudo. Propor uma explicação plausível para estes resultados requer dosagens de enzimas metabólicas e de outros substratos energéticos, como ácidos graxos, glicogênio e glicose plasmática.

Os efeitos tóxicos de metais e também de acidez, causam lipoperoxidação no fígado de peixes, e dessa forma o teor de lipídios neste órgão diminui (Levesque *et al.*, 2002). A baixa concentração de Lt no fígado de *O. niloticus* dos grupos em exposição ao alumínio indica a toxicidade causada por este metal, sendo este mesmo efeito observado em *Salvelinus fontinalis* expostos ao baixo pH (Tam *et al.*, 1987).

Nos ensaios crônicos, a concentração de Lt mais alta no grupo A mostra que provavelmente o fígado destes animais, após a exposição crônica, se aclimatou às condições de toxicidade, e ao mesmo tempo, deve-se destacar que o

fígado dos animais de ambos os ensaios se encontrava em processo vitelogênico, embora estes dados não possam expressar as condições da síntese de VTG.

Mesmo apresentando contrastes quanto aos lipídios hepáticos totais, as duas espécies estudadas não apresentaram modificações sobre as proteínas hepáticas, e semelhantemente, o mesmo ocorreu para o IHS. Diferenças no tamanho relativo do fígado não podem ser atribuídas simplesmente a diferenças nutricionais em peixes, pois a exposição a vários tipos de poluentes pode resultar no aumento do IHS, mas a exposição a metais pesados e acidez pode causar uma diminuição (Norris *et al.*, 2000), sendo que esta diminuição ocorre principalmente devido à excessiva peroxidação de lipídios, devido a danos nas membranas das células. Vuorinen *et al.*, (2003), relatam que durante determinada época do ano, fêmeas de *Coregonus albula* expostas ao alumínio apresentaram o IHS menor do que os indivíduos do grupo controle; entretanto, após mais de dois meses de exposição, o IHS apresentou uma tendência a ser maior nos animais expostos ao alumínio.

Deve ser levado em consideração também que íons metálicos (especialmente Cd) também podem contribuir na redução da atividade de enzimas hepáticas, entretanto, não ocorre diminuição em toda atividade enzimática no fígado (Norris *et al.*, 2000). Enzimas relacionadas à desintoxicação de poluentes aumentam sua atividade em contraste com as enzimas metabólicas, ao mesmo tempo, ocorre um aumento na síntese de metalotioneínas, que têm sido utilizadas como biomarcadores para a exposição a metais no fígado (Norris *et al.*, 2000).

Os lipídios plasmáticos em teores mais elevados nos grupos controle e (A) dos ensaios com *A. fasciatus* podem estar relacionados ao período de confinamento nas caixas experimentais, que foi duas vezes mais longo do que para o grupo inicial. A maior mobilização deste substrato no grupo (A), possivelmente ocorreu pela ação do cortisol, pois este hormônio aumenta a atividade da enzima triacilglicerol lipase, responsável por quebrar os triglicérides em ácidos graxos livres + glicerol (Wendeelar-Bonga, 1997).

A elevada concentração de lipídio plasmática observada para o grupo controle pode estar relacionada ao fato de que os animais, não apenas deste grupo, mas dos três grupos experimentais encontravam-se em atividade vitelogênica, o que acarreta na maior mobilização de substratos energéticos, ou ainda porque estes animais apresentaram mecanismos adaptativos ao estresse provocados pelo confinamento, que devido ao tempo de exposição (crônico), já não apresentavam altas concentrações de cortisol (Inicial e C) quando foram amostrados. Porém, o cortisol no grupo (A) continuou alto, pois o estressor (alumínio) estava constantemente presente.

Uma outra causa para o aumento da concentração hepática e plasmática de lipídios nos animais expostos ao alumínio no experimento crônico, pode estar relacionada ao conhecido efeito dos poluentes na atividade lipogênica hepática, aumentando a síntese de ácidos graxos (Adams, 1999). Adicionalmente, alguns poluentes podem inibir a oxidação e a utilização dos ácidos graxos, o que da mesma forma eleva a concentração de lipídios hepática (Adams, 1999).

O plasma de *O. niloticus* mostra indistinção no conteúdo lipídico total, fato que pode estar relacionado à duração dos ensaios, cujos efeitos de toxicidade a curto prazo sobre os Lts não se manifestaram, sejam para os efeitos do alumínio como também para o pH, além de que esta espécie pode ser considerada tolerante aos estressores ambientais.

Os peixes utilizam o glicogênio como energia imediata em situações de estresse, e mantêm a sua reserva de glicogênio através da mobilização de outros estoques de energia, tais como lipídios e proteínas. Uma análise do conteúdo protéico em peixes submetidos à ação de estressores auxilia na interpretação dos mecanismos de como estes animais utilizam as proteínas como substratos energéticos. De uma forma geral, nos vertebrados, o cortisol age sobre o metabolismo de proteínas, aumentando o catabolismo protéico muscular, com o objetivo de utilizar os aminoácidos deste tecido na gliconeogênese hepática (Wendeelar-Bonga, 1997). Nesta situação, seria esperado um aumento dos aminoácidos circulantes no plasma, o que não ocorreu no presente experimento e de forma contrária, a concentração de proteínas plasmáticas dos lambaris utilizados no experimento crônico diminuiu quando os animais foram expostos ao alumínio, sugerindo que esta queda na circulação de proteínas esteja relacionada à ação deste metal na síntese de vitelogenina, como será abordado posteriormente.

A análise de proteínas totais (Pt) das gônadas durante o período reprodutivo dos peixes pode ser um indicativo da deposição de componentes vitais para a maturação e crescimento dos oócitos. Ao mesmo tempo, o IHS e as

proteínas hepáticas totais indicam o estado funcional do fígado diante da necessidade de realizar processos de desintoxicação (na presença de poluentes) e ao mesmo tempo na capacidade de síntese protéica deste órgão nos processos de produção de VTG. Finalmente, a análise de proteínas do plasma indica a mobilização deste substrato a partir dos tecidos, como fígado e músculo.

Para *O. niloticus* a concentração de proteínas totais no fígado e no plasma mostraram-se estáveis, mas as análises do conteúdo gonadal demonstraram que os grupos (A e B) possuem menos proteínas do que seus respectivos controles. Este fato pode estar relacionado ao mecanismo de absorção da VTG nos oócitos, que é mediado pelo hormônio folículo estimulante (FSH)

O fígado e as gônadas de *A. fasciatus* mostraram concentrações estáveis de Pt. Por outro lado, a concentração plasmática de Pt do grupo em exposição ao alumínio é a menor entre os grupos, o que sugere disfunções na síntese hepática de VTG, relacionados principalmente a alterações no E₂ plasmático. Estudos mostraram que a administração de cortisol diminui a concentração de VTG plasmática em *catfish* (Sundararaj & Nath, 1981).

Os ciclos reprodutivos circanuais dos peixes são sincronizados com as estações do ano em resposta às condições ambientais, sendo que seu ritmo representa um compromisso que envolve vários fatores endógenos e exógenos; essa sincronização é alcançada pela interação entre o sistema neuro-endócrino e os fatores ambientais (Vazoller & Menezes, 1992).

O início da atividade fisiológica reprodutiva ocorre quando a hipófise é estimulada pelo hipotálamo, via o neurohormônio GnRH (*gonadotropin releasing*

hormone) e inicia a síntese das gonadotropinas (GtH) I e II , cujas funções são de estimular o crescimento e desenvolvimento das gônadas, regulando a formação e a maturação dos gametas indiretamente através dos hormônios esteróides (Harvey & Carolsfield, 1993).

Com a finalidade de subsidiar a discussão apresentada aqui referente aos hormônios esteróides nos peixes, apenas os eventos biológicos que envolvem as fêmeas serão considerados. Os passos que se sucedem a atividade adenohipofisária inicial na síntese e ação do GtH I ocorrem nas células foliculares ovarianas, onde hormônios andrógenos são convertidos em estrógenos.

A esteroidogênese gonadal se inicia com a conversão da molécula precursora dos hormônios esteróides, o colesterol em pregnenolona através da atividade do complexo enzimático localizado na membrana interna das mitocôndrias, o citocromo P450_{scc} (do inglês, *side chain clivage*), que promove a clivagem da cadeia lateral do colesterol (Martyniuk *et al.*, 2006). Em seguida, no retículo endoplasmático liso, a pregnenolona torna-se o substrato para enzimas do complexo citocromo P450 das famílias mono-oxigenases e hidroxil-esteróide desidrogenases, que promovem a seguinte via biossintética de transformação hormonal: Progesterona → 17 α OH P → Androstediona → Testosterona (Martyniuk *et al.*, 2006).

Todos estes eventos de conversão e síntese hormonal até a testosterona (T) ocorrem na camada teca das células foliculares ovarianas. A T é convertida em E₂ por outro citocromo, o P450, aromatase 19 α (CYP 19 a) através da aromatização dos anéis de colesterol, processo este que ocorre na camada

granulosa (Martyniuk *et al.*, 2006). O E₂ é importante não apenas na maturação sexual e controle dos processos reprodutivos em peixes, mas também desempenha um papel chave no desenvolvimento neural e crescimento (Martyniuk *et al.*, 2006).

A ação fisiológica do E₂ em relação à reprodução ocorre no fígado onde existem receptores específicos de E₂ (ER) localizados no núcleo dos hepatócitos. Estes receptores são fatores de transcrição nuclear os quais formam homodímeros antes de se ligar ao DNA e promover a transcrição dos genes da VTG (Mennuet *et al.*, 2005).

Íons de alumínio e também o pH ácido podem interferir sobre a atividade de hormônios esteróides, desde alterações nos processos de síntese nas gônadas (Mount *et al.*, 1988; Kime, 1995; Tam *et al.*, 1990; Tam & Zang, 1996), alterações sobre a vitelogênese (Mugyia & Tanahashi, 1998; Hwang *et al.*, 2000, Berg *et al.*, 2004), alterações sobre a síntese e atividade gonadotrópica (Tam *et al.*, 1990; Kime, 1995) e alterações na maturação dos oócitos e desova (Vuorinen & Vuorinen, 1991; Vuorinen *et al.*, 2003).

Os resultados apresentados neste trabalho para os ensaios estático-crônicos realizados com a espécie *A. fasciatus* demonstraram que o alumínio exerceu influência sobre o hormônio esteróide 17 β estradiol, provocando um aumento em sua concentração plasmática. As dosagens plasmáticas deste hormônio consistiram em um biomarcador capaz de detectar estas alterações, podendo-se inferir em alguns dos prováveis mecanismos de ação deste metal.

Após ser absorvido pelas brânquias, o alumínio atinge a corrente sanguínea, podendo ser acumulado em vários órgãos e tecidos, como por exemplo, fígado, músculo, cérebro, rins, tecido adiposo e brânquias (Peuranen *et al.*, 1993). Como a concentração de E_2 foi elevada, fica claro que o alumínio não exerceu efeito negativo diretamente na síntese deste hormônio, mas não se deve descartar a hipótese de que este metal tenha causado um aumento na síntese da GtH I, o que explicaria as altas concentrações de E_2 .

Sabe-se que o alumínio é capaz de inibir a síntese e/ou exportação de VTG do fígado para o plasma, no entanto o exato mecanismo pelo qual este metal inibe a síntese de VTG não é bem compreendido. O alumínio é conhecido por induzir fosforilações anômalas pela ativação das proteínas quinases dependentes de cAMP (Johnson & Jope, 1987), e/ou por inibir certas proteínas quinases (Katsuyama *et al.*, 1989 *apud* Mugyia *et al.*, 1997). O alumínio pode interferir sobre a fosforilação da VTG, que em sua constituição normal contém um grupo altamente fosforilado, a fosvitina (Mugyia *et al.*, 1997).

Outro efeito do alumínio está na sua capacidade de impedir a transcrição do RNAm da VTG (Hwang *et al.*, 2000), mas também é possível que os íons de alumínio possam atuar sobre os receptores de E_2 , impedindo a formação do complexo ER- E_2 , inibindo dessa forma a ativação do gene da VTG pelo E_2 . Este mecanismo foi sugerido para o Al, pois foi observado para o Zn e Cu, (Yao *et al.*, 1997), cujos efeitos sobre a vitelogênese da mesma forma que o Al, são reversíveis.

Hwang *et al.*, (2000) sugerem que a influência do alumínio sobre os níveis transcricionais do RNAm da VTG depende da concentração deste metal, e a VTG quando transportada no plasma, liga-se a íons metálicos, como o Zn, Ca e Mg (Falchuk & Montorzi, 2001), então, sugere-se que o Al quando em altas concentrações no plasma também seja capaz de se ligar a VTG, possivelmente nos mesmos locais que os íons essenciais ligam-se nesta molécula.

Os mecanismos específicos da ação do Al sobre o E₂ podem ter ocorrido conforme os estudos supramencionados, ou ainda é possível que seja por algum mecanismo desconhecido, pois a o modo como Al age não foi completamente elucidado, mas o que pode ser sugerido nestes estudos é que este metal interferiu sobre a síntese de VTG de *A. fasciatus*.

É importante fazer um adendo a respeito da interação do Cortisol com o E₂ de *A. fasciatus*, pois o grupo (A), que apresentou as maiores concentrações destes dois hormônios, também contou com a menor concentração de proteínas plasmáticas. O cortisol em peixes atua como antagonista na expressão da VTG, pois sabe-se que este hormônio induz baixos níveis na expressão do RNAm da VTG, com conseqüente redução na VTG plasmática, sugerindo que o cortisol atua em um nível pós-transcricional (Berg *et al.*, 2004).

Os efeitos lesivos do Al e também do cortisol observados no grupo (A) podem ser corroborados pela análise dos resultados das Pt deste mesmo grupo, pois estas ocorreram em menor concentração no plasma. Estes dados podem ser utilizados para expressar menores quantidades de VTG sintetizadas,

semelhantemente aos estudos de Mugyia *et al.*, (1997) e Hwang *et al.*, (2000), nos quais o conteúdo de VTG foi demonstrado através da concentração de Pt.

Analisando-se os resultados da concentração plasmática de E_2 e 17α OHP em *O. niloticus*, observa-se que estas fêmeas, que possuem desova parcelada, apresentam a concentração destes esteróides gonadais mais elevada que aquela observada nos lambaris, fato que pode ser explicado pela permanente atividade vitelogênica e ovulatória destes ovários. Considerando-se os grupos experimentais, os dados mostram que não houve nenhum efeito significativo do alumínio sobre a concentração de E_2 , mas pode-se ressaltar que os grupos (A) e (B) apresentaram uma tendência a uma maior concentração deste hormônio do que os grupos controle (como observado nos lambaris). Por outro lado, os resultados demonstraram que ocorreram efeitos contrastantes sobre a concentração de 17α OHP das duas espécies estudadas.

Nenhum efeito foi percebido sobre a concentração de 17α OHP de *A. fasciatus*, enquanto que em *O. niloticus* a exposição ao alumínio em pH ácido causou uma queda na concentração de 17α OHP e por outro lado, o efeito isolado do pH causou um aumento nessas concentrações, sendo mais um indicativo de que estes animais estavam aclimatados às condições de acidez da água. Estes dados mostram que a toxicidade do alumínio se agrava em pH ácido, independente se os animais estão aclimatados ou não (Peuranen *et al.*, 1993).

Após analisar a concentração plasmática de 17α OHP das tilápias, pode-se sugerir alguns possíveis efeitos pelos quais o alumínio tenha causado redução na síntese deste hormônio, principalmente para os grupos (A) e (B). O alumínio pode

ter reduzido a síntese da GtH II na hipófise, bem como ter atuado acima deste eixo endócrino, junto ao hipotálamo, causando distúrbios na síntese de GnRH, responsáveis por estimular a síntese gonadotrópica na hipófise (Rocha & Rocha, 2006).

Uma outra alternativa para a diminuição na síntese de 17α OHP, e que excluiria os mecanismos citados acima, poderia ser uma ação do Al sobre as gônadas, alterando a capacidade deste órgão de ser estimulado pela GtH II, o que explicaria a baixa síntese de 17α OHP. Porém, pelo fato de outros estudos terem demonstrado que o Al é capaz de atuar em nível enzimático, supõe-se que possa ter ocorrido uma super expressão para a atividade da enzima 20α hidróxiesteróide - desidrogenase, cuja função é de converter o 17α OHP em 17α , 20β - dihydroxy - 4 -pregnen - 3 - one ($17,20$ P), ou MIS (do inglês *maturation - inducing steroid*, - hormônio da maturação final), dessa forma também seria possível explicar estes resultados.

Em relação aos biomarcadores morfológicos, pode-se dizer que as análises histológicas permitiram identificar efeitos de toxicidade sobre o fígado e as brânquias das duas espécies. Alguns dos efeitos do alumínio detectados nas brânquias, tais como inflamação, edemas e em alguns casos fusão lamelar, também foram observados por Tietge *et al.*, (1988). Ainda entre as histopatologias observadas, hiperplasias, hipertrofias e vacuolizações foram observadas por Kroupova, (2005) em peixes expostos cronicamente ao NO_2^- .

Estes biomarcadores não evidenciaram nenhum dano nas gônadas, embora lesões neste órgão e atresias nos oócitos sejam freqüentemente

identificadas em análises histológicas (Tam *et al.*, 1990; Vuorinen *et al.*, 1992; Unal *et al.*, 2007).

De uma forma geral os resultados do presente trabalho evidenciam que o alumínio e o pH ácido afetam a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos, mas o efeito deste metal está relacionado ao tipo de estratégia reprodutiva que os animais apresentam. Os dados mostram que em peixes de desova total, como o lambari, os efeitos do alumínio são mais evidentes na fase de vitelogênese, alterando a ação dos estrógenos e os processos de mobilização de lipídios e proteínas anteriores à fase de maturação final. Já na tilápia, os efeitos do alumínio e do pH ácido estão mais relacionados aos processos de maturação final e ovulação, uma vez que alterações foram observadas na concentração do progestágeno 17 α OHP, precursor do MIS em peixes teleósteos.

6. CONCLUSÕES

6.1. *Astyanax fasciatus*

⇒ O alumínio exerce toxicidade nas brânquias e no fígado e provoca alterações histológicas sobre estes órgãos;

⇒ O aumento de K^+ plasmático ocorreu devido ao estresse, e/ou a toxicidade do NO_2^- e do alumínio (este último somente para o grupo A).

⇒ O estresse causado pelo confinamento e os efeitos de toxicidade do alumínio causaram diminuição no tamanho das gônadas;

⇒ A exposição crônica ao alumínio provocou um aumento na síntese de cortisol, que pode ter promovido um aumento na mobilização de lipídios totais para o plasma;

⇒ O alumínio aumenta o E_2 no plasma, e impede a ação deste hormônio no fígado, o que acarreta em diminuição sobre a síntese de VTG e diminuição das proteínas totais plasmáticas;

⇒ As altas taxas de mortalidade, principalmente para o grupo (B) demonstram a intolerância desta espécie ao confinamento para estudos dessa natureza, mostrando que esta espécie é sensível ao manejo e apresenta perturbações comportamentais causadas pelo confinamento, nas condições em que foram realizados estes experimentos.

6.2. *Oreochromis niloticus*

⇒ O alumínio exerce toxicidade nas brânquias e no fígado e provoca alterações histológicas sobre estes órgãos;

⇒ A exposição aguda ao alumínio aumenta a concentração plasmática de Na^+ e Cl^- ;

⇒ A exposição ao alumínio aumenta a deposição de lipídios totais nas gônadas, mas por outro lado reduz a concentração de proteínas neste tecido;

⇒ A ação tóxica do alumínio causou diminuição na concentração de lipídios totais no fígado;

⇒ O alumínio diminui a concentração de 17α OHP plasmática, podendo assim interferir na ovulação e conseqüentemente na desova destes animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M. 1998. Ecological role of lipids in the health and success of fish populations. In: ARTS, M. T. & WAINMAN, B. C. (Eds). *Lipids in freshwater ecosystems*. New York: Springer, p: 132-160.

ADORNO, V. 1999. Tietê: Uma promessa de futuro para as águas do passado. São Paulo: Prefeitura de São Paulo, 156p.

AGGEGAARD, S.; JENSEN, F. B. 2001. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *J. Fish. Biol.* 59: 13 –27p.

ALBERTI, G.; DAGOSTINO, G.; PALAZZO, G.; BIESUZ, R.; PESAVENTO, M. 2005. Aluminium speciation in natural water by sorption on a complexing resin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99: 1779-1787p.

ALLIN, C. J.; WILSON, R. W. 2000. Effects of pre-acclimation to aluminium on the physiology and swimming behavior of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during a pulsed exposure. *Aquatic Toxicology*. 51: 213-224p.

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L., DUNCAN, W. P., SOUZA, F. C. A.; PAULA-SILVA, M. N.; LAND, S. 2000. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon

fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes:Cichlidae):contribution of tissue enzyme levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 125: 219-226p.

ANDERSEN, D. O. 2006. Labile aluminium chemistry downstream a limestone treated lake and an acid tributary: Effects of warm winters and extreme rainstorms. *Science of the Total Environment*. 366: 739- 748p.

ARAGÃO, M. A. & ARAÚJO, P. A. 2006. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: P. A. ZAGATTO & E. BERTOLETTI (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática :Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, p. 117-152.

ARAUJO, F. G. 1998. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o rio Paraíba do Sul. *Rev. Brasil. Biol.* 58 (4): 547-558p.

AVILEZ, I. M.; ALTRAN, A. E.; AGUIAR, L. H.; MORAES, G. 2004. Hematological responses of the neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comparative, Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology*. 139: Issue 1-3. 135-139p.

BARCAROLLI, I.F. & MARTINEZ, C.B.R. 2004. Effects of Aluminum in Acidic Water on Hematological and Physiological Parameters of the Neotropical Fish

Leporinus macrocephalus (Anostomidae). *Bull. Environ. Contain. Toxicol.* 72: 639-646p .

BARTON, B.A. & IWAMA G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. *Ann Rev Fish Dis*, 1:3-26p.

BERG. H; MODIG. C; OLSSON, P. 2004. 17 beta – estradiol induced vitellogenesis is inhibited by cortisol at the post-transcriptional level in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:62-72p.

BERTHON, G. 2002. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coordination Chemistry Reviews* 228: 319-341P.

BIANCHINI, A & BOWLES, K. C. 2002. Metal sulfides in oxygenated aquatic system: implications for the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 133:51-64p.

BILLARD, R. 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture* 100: 263-298p.

BIRGE, W.J.; BLACK. J. A.; WESTERMAN, A. G. 1985. Short –term fish and amphibian testes for determining the effects of toxicant stress on early life stages

and estimating chronic values for single compounds and complex effluents.

Environmental Toxicology and Chemistry, 49: 807 – 821p.

BJERKNES, V.; FYLLINEN, I.; HOLTET, L.; HANS, C. T.; BJORN, O.; KROGLUND, F. 2003. Aluminium in acidic river water causes mortality of farmed atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norwegian fjords. *Marine Chemistry* 83: 169-174p.

BOYD, C. E., 1990. Water quality in ponds for aquaculture. *Alabama Agricultural Experimental Station*, Auburn University, Alabama, USA.

BRODEUR, J. C.; OKLAND, F.; FINSTAD, B.; DIXON, G.; MCKINLEY, R. S. 2001. Effects of subchronic exposure to aluminium acidic water on bioenergetics of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 49: 226-234p.

BROWN, J. 1993, Endocrine responses to environmental pollutants. In: Rankin J, Jensen F (Ed.). *Fish Ecophysiology*. London: Chapman & Hall. 276-296p.

BROWN, J. A.; WHITEHEAD, C. 1995. Catecholamine release and interregal response of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to aluminium in acidic water. *J. Fish. Biol.* 46: 524 – 535p.

BUCKLER, D. R.; CLEVELAND, L.; LITTLE, E. E.; BRUMBAUGH, W. G. 1995. Survival, sublethal responses, and tissues residues of atlantic salmon exposed to acidic pH and aluminum. *Aquatic Toxicology*. 31: 203-216p.

CÂMARA, J. J. C.; RODRIGUES, A. M.; CAMPOS, E. C.; SANTOS, R. A.; MANDELLI, J. 1991. Pesca seletiva do tambiú, *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae), com a utilização de redes de enakgarm ba represa de Ibatinga, rio Tietê, SP, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, SP. 18: 51-60p.

CARMICHAEL, G. J.; 1984. Long distance truck transport of intensively reared largemouth bass. *Prog Fish Cult*. 46:11-115p.

CETESB. 2005. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2004.

CETESB. 2006. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2006.

CLESCERI, L. A.; GREENBERG E, EATON A. D. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA. AWWA. WEF 20th Ed.

CONAMA, 2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. 1-23p.

CONSTANTINO, V. R. L.; ARAKI, K.; SILVA, D. O.; OLIVEIRA, W. 2002. Preparação de compostos de alumínio a partir da bauxita: Considerações sobre alguns aspectos envolvidos em um experimento didático. *Quim. Nova*. 25: 490-498p.

COONEY, J. D. 1995. Freshwater tests. In: RAND, G. M. (Ed). *Fundamentals of aquatic toxicology* 2 th ed. 1125p.

COSTA, O. T. F. 2001. Nitrito: tolerância, hematologia, bioacumulação e morfologia em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalminae). Tese de Doutorado - Universidade Federal de Manaus. 105p.

COSTA, O. T. F. et al. 2002. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*.232: 627-636p.

DEANE, E. E & WOO, Y. S. N. 2007. Impact of nitrite exposure on endocrine, osmoregulatory and cytoprotective functions in the marine teleost *Sparus sarba*. *Aquatic Toxicology*. Vol 82. Issue 2: 85-93p.

DEPLEDGE. M. H. 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates* (M.C. Fossi & C. Leonzio, eds). *Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA*. 271-285 p.

DUNLAP, G. D. 1989. The effects of differing photoperiods during thermal acclimation on oxygen consumption in the hylid frogs, *Acris crepitans* and *Pseudacris triseriata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 94, Issue 3: 519-523P.

ELLIOTT, M. 2002. The role of the DSPIR approach and conceptual models in marine environmental management : an example for offshore wind power. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 3-6p.

EXLEY, C., CHAPPELL, C.; BIRCHALL, J. D. 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *J. Theor.Bio.*, 151: 417-428p.

EXLEY, C.; PINNEGAR, J. K.; TAYLOR, H. 1997. Hydroxyaluminosilicates and acute aluminium toxicity in fish. *J. theor. Biol.* 189: 133-139p.

FALCHUK. K. H; MONTORZI. M. 2001. Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos. *Biometals*. 14: 385-395p.

FENG, C.; TANG, H.; WANG, D. 2007. Differentiation of hydroxyl-aluminum species at lower OH/Al ratios by combination of Al NMR and Ferro assay improved with kinetic resolution. *Colloids and Surfaces A:Physicochem. Eng. Aspects*. 305: 76-82p.

FEVOLDEN, S.; ROED, K.; FJALESTAD, K. 2002 Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation with growth. *Aquaculture*.202: 61-75p.

FOLCH, J., LEES, M., SLOANE, S. G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem* .226: 497–509p.

FOO, J.; LAM, T. 1993. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in tilapia. *Oreochromis mossambicus*, *Aquaculture* 115: 115 –145p.

FURIA, R. R. 2005. Efeitos da fração solúvel em água do mar do petróleo e do diesel sobre a morfologia das bânquias de *Trachinotus* sp (Perciformes: Carangidae). Tese de Doutorado – Instituto Oceanográfico – Universidade de São Paulo. 136p.

GENSEMER, R. W.; PLAYLE, R. C. 1999. The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 29 (4):315-450P.

GIL, H. A.; CORREA, M.; RODRIGUES, G. J. 1993. Efecto del pH y del alumínio en el consumo de oxigeno del pez *Astyanax bimaculatus*. *Acta Científica Venezolana*. 44: 240-244p.

GODOY, M. P. 1959. Age, growth, sexual maturity, behavior, migration, tagging and transplantation of Curimatá (*Prochilodus scrofa*) of Mogi Guaçu river, SP. Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* – SP. 31: 447-477p.

GUIBAUD, G.; GAUTHIER, C. 2005. Aluminium speciation in the Vienne river on its up stream catchment (Limousin region, France). *Journal of Inorganic Biochemistry* 99: 1817-1821P.

GURGEL, H. C. B. 2004. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21 (1): 131-135p.

HANDERSEN, D. O. 2005. Labile aluminium chemistry downstream a limestone treated lake and an acid tributary: Effects on warm winters and extreme rainstorm. *Science of the Total Environment* 366: 739-748p.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. 1993. *Induced breeding in tropical fish culture*. 144p.

HEATH, A. G. 1995. Water pollution and fish physiology. Boca Raton; CRC Press, 359p.

HEMING, T. A.; BLUMHAGEN, K. A. 1988. Plasma acid-base and electrolytes states of rainbow trout exposed to alum (aluminum sulphate) in acidic and alkaline environments. *Aquatic Toxicology*. 12: 125-140p.

HWANG, U. G.; KAGAWA, N.; MUGYIA, Y. 2000. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol - 17β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 119: 69-76p.

JEROLYN, E.; SCHOORE, B.; SIMCO, A.; KENNETH B. D. 1995. Responses of Blue Catfish and Channel Catfish to Environmental Nitrite. *Journal of Aquatic Animal Health*. 7. Issue 4: 304-311p.

JOHNSON. G. V. W; JOPE. R. S. 1987. Aluminium alters cyclic AMP and cyclic GMP levels but not presynaptic cholinergic markers in rat brain in vivo. *Brain Research*. 403: 1-6p.

KARELS, A. E., SOIMASUO, M., LAPPIVAARA, J., LEPPANEN, H., AALTONEN, T. MELLANEN, P. AND OIKARI, A. O.J. 1998. Effects of ECF- bleached Kraft mill effluent on reproductive steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach. *Ecotoxicology* 7: 123-132p.

KATSUYAMA, H; SAIJOH, K; INOUE, Y; SUMINO, K. 1989. The interaction of aluminium with soluble protein kinase C from mouse brain. *Arch. Toxicol.* 63: 474-478p.

KAWAMURA, K.; SHIBUYA, K.; OKUWAKI, A. 2007. Morphology of aluminum phosphate by the AL-EDTA mediated particle formation in aqueous solutions at high temperatures. *Materials Research Bulletin* 42: 256-264p.

KIME, D. E. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Fish Biology and Fisheries* 5: 52-96p.

KNUDSEN, P. K. & JENSEN, F. B. 1997. Recovery from nitrite-induced methaemoglobinaemia and potassium balance disturbances in carp. *Fish Physiol. Biochem.* 16: 1-10p.

KORF, H. W. 2006. The pineal organ. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G. (Eds) *Fish Endocrinology*. Vol2. USA. Science Publishers. p.541-567.

KROUPOVA, H.; MACHOVA, J.; SVODOBOVA, Z. 2005. Nitrite influence in fish: a review. *Vet. Med. – Czech*. 11: 461 – 471p.

LAITINEN, M.; VALTONEN, T. 1995. Cardiovascular, ventilatory and hematological responses of Brown trout (*Salmo trutta* L.), to the combined effects of acidity and aluminium in humic water at winter temperatures. *Aquatic Toxicology*. 31: 99-112p.

LAITINEN, M.; VALTONEN, T. 1995. Cardiovascular, ventilatory and haematological responses of brown trout (*Salmo trutta* L.) to the combined effects of acidity an aluminium in humic water at winter temperatures. *Aquatic Toxicology*. 31: 99 –112p.

LEMARIÉ, G.; DOSDAT, A.; COVÉS, D.; DUTTO, G.; GASSET, E.; RUYET, P. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*. 229: 479-491p.

LEVESQUE, H . M.; MOON, T. W.; CAMPBELL, P. C. G.; HONTTELA, A. 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca*

flavescens) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*. 60: 257-267p.

LIAN, H.; KANG, Y.; ARKIN, Y.; Bi, S.; LI, D.; MEI, S.; WU, X.; TAO, X.; CHEN, Y.; DAI, L.; GAN, N.; TIAN, L. 2004. Fractionation of aluminum in natural waters by fluorometry based on the competitive complexation. *Analytica Chimica Acta* 511: 25–31p.

LIEBERT, A. M. & SCHREK, C. B. 2002. Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF – I and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation. *General and Comparative Endocrinology* 148: 195-202p.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; LEITE, R. C.; MELO, D. C. 2006. Estresse em peixes. *Rev Bras Reprod Anim*. 30: 113-117p.

LIMA, R. L. 2005. Inclusão de sal na ração e a toxicidade do nitrito em alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais – Zootecnia 43p.

LLOYD, R. (1961). Effect of dissolved oxygen concentrations on several poisons to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.* 38: 447p.

LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275p.

LYDERSEN, E.; POLEO, ABS.; PETTERSEN M. N.; RIISE, G.; SALBU, B.; KROGLUND, F. 1994. The importance of “in situ” measurement to relate toxicity and chemistry in dynamic aluminium freshwater systems. *J. Ecol. Chem.* 357-365p.

MARGIOCCO, C.; ARILLO, A.; MENSI, P.; SHENONE, C. 1983. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdineri*. Rich and haematological consequences. *Aquatic Toxicology*. 3: 261 – 270p.

MARTINEZ, C. B. R. & SOUZA, M. M. 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 133: 151-160p.

MARYNIUK, C. J.; GALLANT, N. S.; MARLATT, V. L.; WIENS, C.S.; WOODHOUSE, A. J.; TRUDEAU, V. L. 2006. Current perspectives on 17 β -estradiol (E2). Action and nuclear estrogen receptors (ER) in teleost fish. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G. (Eds) *Fish Endocrinology*. Vol2. USA. Science Publishers. p. 625 –663.

MATHIESSEN, P.; LAW, R.; 2002. Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental Pollution*, 120: 739 – 757p.

MATSUBARA, T; OHKUBO, N; ANDOH, T; SULLIVAN, C.V; HARA, A. 1999. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocytes maturation and early development of barfin flounder (*Verasper moseri*), a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Develop. Biology*. 213: 18-32p.

MATTHIESSEN, P.; JOHNSON, I. 2007. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environmental Pollution* 146: 9-18p.

MENUET, A. A.; KAH, A. F.; PAKDEL, F. 2005. Regulation and function of estrogen receptors: Comparative aspects. In: MELAMED, P.; SHERWOOD, N. (Eds) *Molecular aspects of fish and marine biology*. Vol. 4. p.224-253.

MILLIGAN, C.L.; WOOD, C.M. 1982. Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Biol.* 99, 397- 415p.

MOMMSEN, P. T.; WALSH, P. J. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. IN: *Fish Physiology*. Vol. XI: 347-405p.

MONTORZI, M; FALCHUK, K. H; VALLEE, B. L. 1994. *Xenopus laevis* vitellogenin is a zinc protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 200: 1407-1413p.

MONTORZI, M; FALCHUK, K. H; VALLEE, B. L; 1995. Vitellogenin and lipovitellin: zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry.* 34: 10851-10858p.

MOSCONI, G., CARDINALETTI, G., CAROTTI, M., PALERMO, F., SOVERCHIA. L., POLZONETTI-MAGNI, A .M. 2006. Neuroendocrine mechanisms regulating stress response in cultured teleost species cap. 21, in *Fish Endocrinology*. Vol 2: 694-720p.

MOUNT, D. R., HOCKETT, J. R.; GERN, W. A. 1988. Effect of long – term exposure to acid, aluminum, and low calcium on adult brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Vitellogenesis and ormoregulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 1633-1642p.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. 2006. Introdução de Agentes químicos no ambiente. In: P. A. ZAGATTO & E. BERTOLETTI (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, p. 15 – 38.

MUCCI, J. L. N.; DAMATO, M.; MALAGRINO, W.; ROCAH, A. A. 1987. Estudos comparativos da ação tóxica de efluentes da indústria petroquímica sobre *Poecilia reticulata* e *Poecilia vivípara*. *Revista DAEE* 47: 150 –275p.

MUGIYA, Y.; TANAHASHI, A. 1998. Inhibitory Effects of Aluminium on Vitellogenin Induction by EStradiol-17 β in the Primary Culture of Hepatocytes in the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 109: 37-43p.

MUNIZ, I.P.; LEIVSTAD, H. 1980. Acidification effects on freshwater fish. In: Ecological Impact of Acid Precipitation: Proceedings of an International Conference, Sandfjord, Norway, 84-92p. Drablos, D.and Tollan, A., (Eds.) Oslo, Norway, SNSF Project.

MUNKITTRICK, K. R. ,DIXON, D. G.,1988. Growth, fecundity and energy stores of white sucker (*Catosto muscommer oni*) from lakes containing elevated levels of copper and zinc. *Can.J. Fish Aquat. Sci.* 45:1355–1365p.

NAGAHAMA. Y. 1997. 17 a, 20B, dihydroxy – 4 – pregnen – 3 – one, a maturation inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids*. 62: 190- 196p.

NEVILLE, C.M. 1985. Physiological response of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to acid and aluminum prediction of field responses from laboratory data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 2004-2019p.

NORRIS, D. O.; CAMP, M. C.; MALDONADO, A. T.; WOODLING, J. D. 2000. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 127: 71-78p.

PANESEAR, N. S., CHAM, K. W. 2000. Decreased steroid hormone synthesis from inorganic nitrite and nitrate; studies in vitro and in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 169: 222-230p.

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 historic overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133: 3- 35p.

PARRISH, C.C. 1999. Determination of total lipid, lipid classes and fatty acids in aquatic samples. In: ARTS, M.T., WAINMAN, B.C. *Lipids in freshwater ecosystem*. New York: Springer-Verlag. 4-12p.

PEURANEN, S.; VUORINEN, P. J.; VUORINEN, M.; TUURALA, HEIKI. 1993. Effects of acidity and aluminium on fish gills in laboratory experiments and in the field. *The Science of the Total Environment*. 134. supplement 2: 953-967p.

PICKERING, A. D. 1992. Rainbow trout husbandry: Management of stress response. *Aquaculture*. 100: 125-139p.

PIEDRAS, S. R. N., OLIVEIRA, J. L. R.; MORAES, P. P. R. BAGER, A. 2006. Toxicidade Aguda da amônia não ionizada e do nitrito em alevinos de *Cichlasoma facetum* (JENYNS, 1842). *Ciênc. agrotec., Lavras*. 30: 1008-1012p.

PLAYLE, R.C. & WOOD, C.M. 1989. Water pH and aluminum chemistry in the gill microenvironment of rainbow trout during acid and aluminum exposures. *J. Comp. Physiol. B* 159: 539-550p.

PNMA. 2001. Proteção e Conservação dos Mananciais de Abastecimento da Região Metropolitana do Estado de São Paulo – Alto Tietê- Cabeceiras e Alto Juquiá. PNMA-SP-01/2001. Governo do Est. de São Paulo, 16p.

POLEKSIC, V. & MITROVIC – TUTUNDZIC. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R. R. & LLOYD (Eds). *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. United Nation Fishing News Book. P. 339 – 352p.

POLÉO, A. B. S.; OSTYBE, K., OXNEVAD, S. A.; ANDERSEN, R. A.; HEIBO, E.; VOLLESTAD, L. A.; 1997. Toxicity of acid aluminium – rich water to seven freshwater fish species: A comparative laboratory study. *Enviromental Pollution*. 96: 129-139p.

POLÉO, A.B.S. 1995. Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic Toxicology* 31: 347-356 P.

RATTNER, B. A.; HEATH, A. G. 1995. Enviromental factors affecting contaminant toxicity in aquatic and terrestrial vertebrates. In: Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A. Jr; Cairns J. Jr. Eds. *Handbook ok Ecotoxicology*, 775p.

RAYMOND, M.; SHELBY, L.; GERSKING, D.; JEZIERSKA, B. 1983. Electrolyte balance and energy mobilization in acid – stresed rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and their relation to reproductive sucess. *Env. Biol. Fish.* 8: 115-123p.

ROCHA, M. J.; ROCHA, E. 2006. Morphofunctional aspects of reproduction form synchoronus to asynchoronus fishes – An overview. 570 – 624. In: Reinecke, M., Zaccone, G. & Kappor, B. G. 2006. *Fish Endocrinology. Science Publishers*. Volume 02: 871p.

ROSSELAND, B. O.; BLAKAR, I. A.; BULGER, A.; KROGLUND, F.; KVELLSTAD, A.; LYDERSEN, E. 1992. The mixing zone between limed and acidic river waters – complex aluminum chemistry and extreme toxicity for salmonids. *Enviromental Pollution*. 78: 3 –8p.

RUSO, R.C., THURSTON, R.V., 1991 Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. In: Brune,E.,Tomasso, J.R. (Eds.), *Aquaculture and Water Quality*. WAS Publication, Baton Rouge,USA, p.58–89.

RUYET, J. P. L.; GALLAND, R.; ROUX, A. L.; CHARTOIS, H. 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154: 155-171p.

SALIBIAN, A.; FICHEIRA, L. E. 1981. Ecotoxicology of pyrethroid insecticides short term effects of decis 2-5 on juvenile *Astyanax fasciatus* (tetragonopteridae, pisces) in captivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 70: 265 – 268P.

SAYER, M. D. J., READER, J. P., DALZIEL, T. R. K., MORRIS, R. 1991. Mineral content and blood parameters of dying brown trout (*Salmo trutta* L.) exposed to acid and aluminium in soft water. *Comp. Biochem. Physiol.* 99 C, 345-348p.

SHIBATA. N; YOSHIKUNI. M; NAGAHAMA. Y. 1993. Vitellogenin in incorporation into oocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in vitro. Effects of hormones on denuded oocytes. *Develop growth differ.* 35: 115-121p.

SJOBECK, M. L., HAUX, C., LARSSON, A., LITHNER, G., 1984. Biochemical and hematological studies on perch, *Perca fluviatilis*, from the cadmium-contaminated river Eman. *Ecotox. Environ. Safety* 8: 303–312p.

SMITH, D. S.; BELL, R. A.; KRAMER, J. R. 2002. —Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 133: 65-74p.

SMITH, R. W. 1996. Kinetic aspects of aqueous aluminum chemistry: environmental implications. *Coordination Chemistry Reviews*. 149: 81-93P.

TAM, W. H.; BIRKET, L.; MAKARAN, R.; PAYSON, P. D.; WHITNEY, D. K.; YU, C. K. C. 1987. Modification of Carbohydrate Metabolism and Liver Vitellogenic Function in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) by Exposure to Low pH. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 44: 360-635p.

TAM, W. H.; ZHANG, X. 1996. The development and maturation of vitellogenic oocytes, plasma steroid hormone levels, and gonadotrope activities in acid-stressed brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Zool.* 74: 587-593p.

TAM, W.H.; VALENTINE, B.; FRYER, J.N.; ROY, R.J.J. 1990. Reduction in oocyte production and gonadotrope activity, and plasma levels of estrogens and vitellogenin, in brook trout exposed to low environmental pH. *Can. J. Zool.* 68: 2468-2476p.

TEIEN, H. C.; STANDRING, W. J. F.; SALBU, B. 2006. Mobilization of river transported colloidal aluminium upon mixing with seawater and subsequent deposition in fish gills. *Science of the Total Environment* 364: 149-164P.

TEIEN, H. C; SALBU, B.; KROGLUND, F.; HEIER, L, S.; ROSSELAND, B. O. 2007. The influence of colloidal material on aluminium speciation and estimated acid neutralising capacity (ANC). *Applied Geochemistry* 22:1202-1208p.

TIETGE, J. E.; JOHNSON, R. D. BERGMAN, H. L. 1988. Morphometric changes in gill secondary lamellae of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after long term exposure to acid and aluminum. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1643 – 1648p.

TIPPING, E. 2005. Modelling Al competition for heavy metal binding by dissolved organic matter in soil and surface waters of acid and neutral pH. *Geoderma*. 127:293–304p.

TOMASSO, J.R., 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Rev. Fish.Sci.* 2: 291–314p.

UNAL, G.; TURKOGLU, V.; OGUZ, A. R.; KAPTANER, B. 2007. Gonadal histology and some biochemical characteristics of *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811) having abnormal gonads. *Fish Physiology Biochem.* 33: 153-165p.

VANCE, G. F.; STEVENSON, F. J. SIKORA, F.J. 1996. Environmental chemistry of aluminium – organic complex. In: Sposito G. (Ed). *The environmental chemistry of aluminium*. Lewis Publishers p: 169- 220.

VANZOLINI, E.P.; REBOUÇAS, R.; BRITSKI, H. A. 1964. Caracteres morfológicos de reconhecimento específico em três espécies simpátricas de lambaris do gênero *Astyanax*. (*Papéis avulsos de Zoologia*) SP. 16: 267 – 299p.

VAZOLLER, A, E. M.; MENEZES, N. A. 1992. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). *Rev. Brasil. Biol.* 52 (4): 627 – 640p.

VAZZOLER, A.E.A.M. 1996. *Biologia da Reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá. EDUEM, 169p.

VIJAYAN, M. M., Moon, T. W., 1992. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 49: 2260-2266p.

VIJAYAN, M. M., PEREIRA, C., GRAU, E. G., IWAMA, G. K. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp.Biochem.Physiol.*116C: 89–95p.

VUORINEN, P. J., KEINANEN, M., SEPPO, P AND TIGERSTEDT, C., 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long – term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54: 255-276P.

VUORINEN, P. J.; VUORINEN, M. 1991. Effects of long-term prespawning acid/aluminium exposure on whitefish (*Coregonus wartmanni*) reproduction and blood and plasma parameters. *Finnish Fisheries Research* 12: 125-133p.

VUORINEN, P. J.; VUORINEN, M.; PEURANEN, S.; RASK, M.; LAPPLALAINEN, A.; RAITANIEMI, J. 1992. Reproductive status, blood chemistry, gill histology and

growth of perch (*Perca fluviatilis*) in three acidic lakes. *Enviromental Pollution*. 78: 19-27p.

WAHLI. H; DAWID. I. B; RYFFEL, G. U; WEBER, T. 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science*. 212: 298-304p.

WARING. C. P.; BROWN, J. A.; COLLINS, J. E.; PRUNET, P. 1996. Plasma Prolactin, Cortisol, and Thyroid Responses of the Brown Trout (*Salmo trutta*) Exposed to Lethal and Sublethal Aluminium in Acidic Soft Waters. *General and Comparative Endocrinology* 102: 377-385p.

WENDEELAR BONGA, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev*. 77: 591-625p.

WHITFIELD, M. 1974. The hydrolysis of ammonium ions in sea water. A theoretical study. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 54: 565–580p.

WILLIAMS, E. M.; EDDY, F. B. 1986. Chloride uptake in fresh water teleost and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *Journal of Comparative Physiology B*. 156: 867 –872p.

WILSON, R. W., BERGMAN, H. L., WOOD, C. M.; 1994. Metabolic costs and physiological consequences of acclimation to aluminum in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 527-535p.

WILSON, R. W.; WOOD, C. M. 1992. Swimming performance whole body ions, and gill Al accumulation during acclimation to sub – lethal aluminium in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 10: 149 – 159p.

WOOD, C. M. 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Evans, D. H. (Ed). *The Physiology of fishes*. CRC. Press. London, p. 379 – 425.

ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. (Eds) 2006. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima. 478p.

YEO, I.; MUGIYA, Y. 1997. Effects of extracellular calcium concentrations and calcium antagonists on vitellogenin induction by 17β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105: 294-301p.

8 – FIGURAS

FIGURA 1. Concentração de alumínio total em testes com EDTA.

FIGURA 2. Concentração de alumínio em testes sem EDTA.

FIGURA 3. Panorama geral e atividades que antecederam o início da realização dos ensaios crônicos com *Astyanax fasciatus*. **A** e **B**: Barragem de Ponte Nova – Salesópolis – SP; **C** : Rio Tietê, em trecho ainda preservado e isento de ação antrópica, local de captura dos animais; **D**: Rio Tietê, trecho próximo a comporta da Barragem de Ponte Nova, área influenciada por atividade antrópica mas sem poluição; **E**: Manejo dos animais nos tanques de cultivo; **F**: Tanques de cultivo da piscicultura de Ponte Nova, local onde os animais ficaram confinados antes do experimento; **G** e **H**: Caixas plásticas no biotério do Instituto de Biociências da USP, local onde os experimentos foram realizados.

FIGURA 4. Água do reservatório da Barragem de Ponte Nova antes de se tornar ideal para a utilização nos bioensaios.

FIGURA 5. Água com solução estoque de alumínio após o período de 12 horas para decantação das partículas em suspensão. Detalhe de material decantado (seta).

Figura 6. Etapas dos experimentos com *Oreochromis niloticus*. **A:** Manejo e captura dos animais nos tanques de cultivo; **B:** Monitoramento da qualidade de água; **C e D:** Disposição das caixas experimentais e local onde os ensaios agudos ocorreram.

FIGURA 7: Espécies modelo escolhidas para este estudo no momento da coleta do material biológico. **A:** *Astyanax fasciatus* em destaque; **B:** *Oreochromis niloticus* em destaque; **C** e **D:** Coleta de sangue; **E** e **F:** Incisão na região ventral expondo os órgãos a serem coletados (ov = ovário; fg = fígado).

FIGURA 8: *Astyanax fasciatus*: **A:** Aspecto macroscópico das gônadas em estágio maduro; **B:** Fígado – Aspecto macroscópico.

FIGURA 9: *Oreochromis niloticus*: **A:** Aspecto macroscópico das gônadas em estágio maduro na cavidade abdominal; **B:** Fígado – Aspecto macroscópico.

FIGURA 10. Variação do pH no experimento agudo com *O. niloticus*, grupo alumínio em pH neutro.

FIGURA 11. Variação do pH no experimento agudo com *O. niloticus*, grupo alumínio em pH ácido.

FIGURA 12. Variação do pH no experimento agudo com *O. niloticus*, grupo controle.

FIGURA 13. Variação do pH no experimento agudo com *O. niloticus*, grupo controle em pH ácido.

FIGURA 14. Variação do pH no experimento crônico com *A. fasciatus* realizado em dezembro de 2006. (C = controle, A = alumínio em pH neutro, B: alumínio em pH ácido).

FIGURA 15. Variação do pH no experimento crônico com *A. fasciatus* realizado em fevereiro de 2007. (C = controle, A = alumínio em pH neutro, B = alumínio em pH ácido).

FIGURA 16. Variação de amônia durante os experimentos piloto com *A. fasciatus*.

FIGURA 17. Variação de amônia durante dezembro de 2006.

FIGURA 18. Variação de amônia durante fevereiro de 2007.

FIGURA 19: Variação de nitrito (NO₂). Ensaio crônico realizado em dezembro de 2006.

FIGURA 20: Variação de nitrito (NO₂): Ensaio crônico realizado em fevereiro de 2007.

FIGURA 21: Variação de amônia (NH₃): Ensaio agudo. Os asteriscos indicam os momentos seguidos às trocas de água.

FIGURA 22: Variação de nitrito (NO₂): Ensaio agudo. Os asteriscos indicam os momentos seguidos às trocas de água.

FIGURA 23. Comportamento da concentração de alumínio. **A:** Concentração de alumínio lábil nas horas iniciais do experimento crônico realizado em dezembro de 2006; **B** e **C:** Concentração de alumínio lábil e total, respectivamente do experimento crônico realizado em dezembro de 2006. **C** = controle, **A** = Alumínio em pH neutro, **B** = alumínio em pH ácido.

FIGURA 24: Concentração de alumínio lábil entre os grupos experimentais no experimento crônico com *A. fasciatus* realizado em fevereiro de 2007. **C:** controle, **A** = Alumínio em pH neutro, **B** = alumínio em pH ácido.

FIGURA 25: Concentração de alumínio total entre os grupos experimentais no experimento crônico com *A. fasciatus* realizado em fevereiro de 2007. **C:** controle, **A** = Alumínio em pH neutro, **B** = alumínio em pH ácido.

FIGURA 26: Concentração de alumínio lábil entre os grupos experimentais no experimento agudo com *O. niloticus*. **C** = controle em pH neutro, **A** = alumínio em pH neutro, **D** = controle em pH ácido, **B** = alumínio em pH ácido. Os (*) indicam a troca de água.

FIGURA 27: Concentração de alumínio total entre os grupos experimentais no experimento agudo com *O. niloticus*. **C** = controle em pH neutro, **A** = alumínio em pH neutro, **D** = controle em pH ácido, **B** = alumínio em pH ácido. Os (*) indicam a troca de água.

FIGURA 28: Exemplar de *A. fasciatus* morto durante o período experimental em resultado das severas agressões recebidas pelos demais espécimes. A região do círculo demonstra a nadadeira caudal parcialmente devorada, a seta aponta para local de agressão com perda de tecido.

FIGURA 29: Cortisol plasmático. **A:** Ensaio com *A. fasciatus*; **B:** Ensaio com *O. niloticus*. Letras diferentes significam valores estatisticamente distintos.

FIGURA 30: Progesterona plasmática. **A:** Ensaio com *A. fasciatus*; **B:** Ensaio com *O. niloticus*. Letras diferentes significam valores estatisticamente distintos.

FIGURA 31: Estradiol plasmático. **A:** Ensaios com *A. fasciatus*; **B:** Ensaios com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam valores estatisticamente distintos.

FIGURA 32: Concentração média de lipídios totais nos ensaios crônicos com *A. fasciatus*. **A:** Lipídios gonadais; **B:** Lipídios hepáticos; **C:** Lipídios plasmáticos. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 33: Concentração média de lipídios totais nos ensaios agudos com *O. niloticus*. **A:** Lipídios gonadais; **B:** Lipídios hepáticos; **C:** Lipídios plasmáticos. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 34: Concentração média de proteínas totais nos ensaios crônicos com *A. fasciatus*. **A:** Proteínas gonadais; **B:** Proteínas hepáticas; **C:** Proteínas plasmáticas. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 35: Concentração média de proteínas totais nos ensaios agudos com *O. niloticus*. **A:** Proteínas gonadais; **B:** Proteínas hepáticas; **C:** Proteínas plasmáticas. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 36: Concentração plasmática do íon cálcio. **A:** Ensaio crônico com *A. fasciatus*; **B:** ensaio agudo com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 37: Concentração plasmática do íon sódio. **A:** Ensaio crônico com *A. fasciatus*; **B:** ensaio agudo com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 38: Concentração plasmática do íon potássio. **A:** Ensaio crônico com *A. fasciatus*; **B:** ensaio agudo com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 39: Concentração plasmática do íon cloreto. **A:** Ensaio crônico com *A. fasciatus*; **B:** Ensaio agudo com *O. niloticus*. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

FIGURA 40: Concentração plasmática do íon magnésio nos ensaios crônicos com *A. fasciatus*.

FIGURA 41: Concentração osmótica plasmática de *O. niloticus*.

FIGURA 42: Cortes histológicos dos ovários de *Astyanax fasciatus*. **A** e **B: Grupo Controle** - Maturação avançada, OV = oócitos vitelogênicos; N = com núcleo central, seta = oócitos perinucleolares; **C: Grupo em exposição ao alumínio em pH neutro**, presença de oócitos perinucleolares e cortical alveolares mais pronunciada do que no grupo controle: OV = oócitos vitelogênicos, N = com núcleo central, seta = oócitos perinucleolares, CA = oócito cortical alveolar, V = formação de vitelo; **D: Grupo em exposição ao alumínio em pH neutro** – Presença de oócito maduro com abundantes glóbulos de vitelo (GV); PN = oócitos perinucleolares, seta = nucléolos. **A:** aumento de (400x); **B,C, D:** aumento de (25x).

FIGURA 43: Cortes histológicos dos ovários de *Oreochromis niloticus*.

A: Grupo alumínio em pH neutro. Aspecto microscópico de um ovário maduro OV = oócitos vitelogênicos; N = com núcleo central; **B:** Grupo alumínio em pH ácido. Aspecto de um oócito vitelogênico, VL = vacúolos vitelogênicos, GV = glóbulos de vitelo, seta = camada folicular; **C** e **D:** Grupos controle em pH neutro e controle em pH ácido, respectivamente. Características do ovário de uma espécie de desova parcelada com oócitos em vários estádios de desenvolvimento, com maior destaque aos oócitos vitelogênicos (OV). Oócitos perinucleolares (seta), oócitos cortical alveolares (CA). **A, C, D:** aumento de (25x); **B:** aumento de (100x).

FIGURA 44: Cortes histológicos do fígado. **A:** *A. fasciatus*: Grupo controle. Tecido hepático de exemplar do grupo controle; seta = presença de vasos sanguíneos e eritrócitos; **B:** *A. fasciatus*. grupo em exposição ao alumínio. Presença de linfócitos tecido hepático (seta). Hepatócitos descaracterizados, nota-se uma desagregação celular, o que descaracteriza o tecido. **C:** *A. fasciatus*: Grupo em exposição ao alumínio. Tecido hepático de exemplar com hipertrofia celular, o círculo destaca os hepatócitos hipertrofiados. **D:** *A. fasciatus*: Grupo em exposição ao alumínio em pH ácido. Notar a presença de células linfocitárias no tecido hepático (setas). Reparar alterações morfológicas na estrutura dos hepatócitos; **E:** *O. niloticus*: Grupo em exposição ao alumínio. Tecido hepático com células hipertrofiadas; **F:** *O. niloticus*. Grupo em exposição ao alumínio em pH ácido. As áreas mais escuras no tecido hepático pertencem ao sistema vascular

A e D: aumento de (100x); **B, E, F:** aumento de (200x); **C:** aumento de (400x).

FIGURA 45: Cortes histológicos do tecido branquial de *A. fasciatus*. **A:** Grupo controle, LS = lamela secundária, LP = lamela primária, (aumento de 100x); **B:** Grupo Controle. Detalhe da disposição lamelar isenta de fusão e/ou colapso entre si. (aumento de 400x); **C:** Grupo em exposição ao alumínio em pH neutro. Em destaque (círculo) colapso deste epitélio e fusão lamelar em processo inicial (aumento de 100x); **D:** Grupo em exposição ao alumínio, notar a presença de inúmeras telangiectasias (T), e áreas com fusão do epitélio lamelar (F) (aumento de 200x); **E:** Grupo em exposição ao alumínio em pH neutro. Áreas com fusão lamelar em todo o tecido, EC = ectasias (aumento de 100x). **F:** Grupo alumínio em pH ácido. Corte histológico de um exemplar sobrevivente durante o período experimental. Notar os mesmos padrões patológicos observados em (E). HP = células hipertrofiadas. (aumento de 200x).

FIGURA 46: Cortes histológicos do tecido branquial de *O. niloticus*. **A** e **B**: Grupos controle, E = ectasias em formação. A região dentro do círculo em destaque aponta colapsos na região da lamela secundária, observar o desprendimento epitelial celular nas lamelas secundárias (seta); **C**: Grupo alumínio em pH ácido. Presença de ectasia (**E**); fusão das lamelas secundárias e alteração no epitélio (seta); **D**: Grupo alumínio em pH ácido. A área delimitada dentro dos círculos indica alteração no epitélio, observar o estreitamento da lamela secundária (seta). **E**: Grupo alumínio em pH neutro. A área dentro do círculo indica fusão nas lamelas, alteração no epitélio (setas). **F**: Grupo controle em pH neutro. Desprendimento epitelial celular das lamelas secundárias (seta) e áreas alteração epitelial (x). Em todas as imagens, o aumento é de (100x).

FIGURA 47. Índice gonadosomático. **A:** *A. fasciatus*; **B:** *O. niloticus*. Letras diferentes significam valores estatisticamente distintos.

FIGURA 48: Índice hepatossomático. **A:** *A. fasciatus*; **B:** *O. niloticus*.

FIGURA 49: Índice de massa corpórea. **A:** *A. fasciatus*; **B:** *O. niloticus*.

9 – TABELAS

Tabela 1: Dados morfométricos e ponderais (Média $\pm$ Erro Padrão).

ENSAIO		N	Comprimento Total (cm)	Massa Corpórea (g)	Massa Gonadal (g)	Massa Hepática (g)
CRÔNICO	A INICIAL CTRL	30	15,77 $\pm$ 0,59	49,82 $\pm$ 1,40	4,96 $\pm$ 0,40	0,28 $\pm$ 0,01
		30	15,85 $\pm$ 0,54	58,19 $\pm$ 1,91	7,54 $\pm$ 0,84	0,26 $\pm$ 0,03
		30	14,40 $\pm$ 1,68	56,00 $\pm$ 2,21	6,25 $\pm$ 0,40	0,28 $\pm$ 0,02
	A INICIAL CTRL	30	15,15 $\pm$ 0,29	48,89 $\pm$ 0,89	6,09 $\pm$ 0,55	0,33 $\pm$ 0,01
		30	15,00 $\pm$ 0,33	51,07 $\pm$ 0,54	8,09 $\pm$ 0,60	0,32 $\pm$ 0,03
		30	15,90 $\pm$ 0,96	53,33 $\pm$ 4,98	4,70 $\pm$ 0,77	0,39 $\pm$ 0,09
AGUDO	A	12	18,10 $\pm$ 2,88	94,50 $\pm$ 13,12	2,60 $\pm$ 0,47	1,20 $\pm$ 0,22
	B	12	17,00 $\pm$ 1,64	80,70 $\pm$ 9,26	2,10 $\pm$ 0,26	1,00 $\pm$ 0,19
	C	12	17,00 $\pm$ 2,44	74,60 $\pm$ 6,98	1,58 $\pm$ 0,38	1,00 $\pm$ 0,10
	D	11	17,10 $\pm$ 2,59	93,60 $\pm$ 13,52	1,89 $\pm$ 0,49	1,34 $\pm$ 0,24

As letras indicam os grupos experimentais: A) alumínio em pH neutro; CTRL e C) Controle; B) alumínio em pH ácido; D) controle ácido.

Tabela 2: Composição iônica da água e alcalinidade

	Mg ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Fe (μ g/L)	SO ₄ (mg/L)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)
Biotério USP	0,0022	0,0039	0,0122	0,0661	42	0,018	21
Ponte Nova	0,0016	0,0027	0,0057	0,0861	125	0,002	16

Obs: íons (mM)

Tabela 3: Variáveis limnológicas analisadas.

	Matéria orgânica dissolvida (%)	Clorofila (mg/m ³)	Carbono total (mg/L)	Carbono orgânico (mg/L)	Carbono Inorgânico (mg /L)
Biotério USP	X	X	X	X	x
Ponte Nova	Ausente	30	6,755	3,934	2,822

10 – ANEXOS

ANEXO 1

Protocolos de Análises dos Esteróides

1. 17 α -OHprogesterona

Para análise do hormônio 17 α OH-progesterona, utilizou-se o kit de Elisamunoensaio 17 α OH-progesterona , DSL10-6800 que contém:

- 5 padrões de 17 α OH-progesterona
- 2 controles 17 α OH-progesterona
- Anti soro 17 α OH-progesterona
- Conjugado de Biotina Concentrado 17 α OH-progesterona
- Diluente de Conjugado Biotina 17 α OH-progesterona
- Concentrado Conjugado Enzimático Estreptavidina 17 α OH-progesterona
- Diluente de Conjugado Enzimático de Estreptavidina 17 α OH-progesterona
- Solução de lavagem
- Solução Cromógena TMB
- Solução de interrupção (STOP)
- Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, onde são colocadas as amostras, totalizando 96 poços.

As amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente e homogeneizadas para o início do procedimento da análise.

O suporte com as tiras foi marcado para posterior identificação das amostras, colocando nas primeiras cavidades, 50 μ l dos 6 padrões fornecidos pelo kit (0; 0.1; 0.5; 1.5; 7.5 e 20 ng/ml). Em seguida, 50 μ l do controle 1 e 2 e das amostras foram

colocados nos poços seguintes. Essa análise foi feita em duplicata para padrões, controles e amostras. Foi separado também um poço para o branco.

Solução de Conjugado de Biotina foi preparado no momento do uso do ensaio, utilizando 3,75 ml de Diluente e 75 ul de Concentrado de Biotina, e adicionado 50 ul em cada poço das amostras e reagentes, exceto o branco.

Foi adicionado 100 ul de anti soro em cada poço, agitando a placa levemente por 5 segundos. A placa foi colocada no agitador, onde ficou por 1 hora na velocidade de 170 rpm. Depois de agitado, desprezou-se o conteúdo da placa, lavando cada poço com 300ul de solução de lavagem previamente preparada, por 5 vezes.

Adicionou-se 200ul de Solução de Conjugado Enzimático Estreptavidina em cada poço, exceto o branco, e colocada no agitador por mais 30 minutos na velocidade de 170 rpm. A solução de Conjugado Enzimático Estreptavidina foi preparada no momento do uso do ensaio, utilizando 300 ul de Concentrado e 15ml de Diluente de Estreptavidina.

Após 30 minutos, desprezou-se o conteúdo da placa, novamente lavando cada poço com 300ul da solução de lavagem por 5 vezes.

Foi adicionado 100ul de Solução Cromógena TMB (solução de coloração da reação) em todos os poços e colocada no agitador novamente por 30 minutos. A placa foi coberta com papel alumínio antes de ser colocada no agitador, para que a luz e o oxigênio não interferisse na reação.

Após todo esse procedimento, foi adicionado 100ul da solução STOP (solução de interrupção da reação, de composição ácida) em cada poço, esperando por aproximadamente 15 segundos para a leitura dos resultados.

A placa foi lida em leitora de placa de Elisa a um comprimento de onda de 450nm.

2. Estradiol E₂

Para análise do Estradiol utilizou-se kit de Elisamunoensaio Estradiol EIA da marca DSL-10-4300 que contém:

- 7 padrões de Estradiol
- 2 controles de Estradiol
- Conjugado de Biotina Concentrado/ Estradiol
- Diluente de Conjugado Biotina/ Estradiol
- Concentrado Conjugado Enzimático Estreptavidina/ Estradiol
- Diluente de Conjugado Enzimático de Estreptavidina/ Estradiol
- Solução Cromógena TMB
- Solução de interrupção (STOP)
- Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, totalizando 96 poços.

O procedimento do ensaio foi o mesmo realizado com 17 α -OH-progesterona, com a diferença de que o kit do estradiol não possui o anti-soro, pulando assim essa etapa. Os valores dos padrões do kit Estradiol são de 0; 20; 50; 250; 750; 2000 e 6000 pg/ml. Os resultados foram também lidos em leitora de placa de Elisa a um comprimento de onda de 450 nm.

2. Cortisol

Para análise do Cortisol utilizou-se kit de EIAgen Cortisol da marca ADALTIS[®] que contém:

- 5 padrões de Cortisol

- Cortisol conjugado com Peroxidase
- Solução Cromógena TMB (0,25 gr/L)
- Solução de paragem contendo Ácido Sulfúrico 0,15 mol/L
- Microplaca contendo 12 tiras com 8 poços cada, totalizando 96 poços, revestida com Anti-Cortisol adsorvido nas cavidades.

O procedimento do ensaio foi o mesmo realizado com 17 α OH-progesterona, com a diferença de que o kit do cortisol não possui o anti-soro, pulando assim essa etapa. Os valores dos padrões do kit Cortisol são de 0; 10; 50; 150 e 500 ng/ml. Os resultados foram também lidos em leitora de placa de Elisa a um comprimento de onda de 450 nm.

ANEXO 2

Análises de substratos metabólicos

Lipídios Totais

Foram determinados através do método de Frings *et al.*, (1972) os lipídios totais do plasma, que são dosados diretamente, não necessitando de prévia extração, como ocorre com outros tecidos. Para os tecidos que necessitam de prévia extração, foi utilizado o método de Folch *et al.*, (1957) adaptada por Parrish (1999) para amostras de organismos aquáticos. Para fígado, músculo branco e gônadas, 100mg de tecido foram pesados em balança de precisão, com sensibilidade para 0,0001g. Já para músculo vermelho, foram pesados 50 mg de tecido na mesma balança.

Em seguida foi adicionado 2 ml de solução de clorofórmio:metanol (2:1) e 0,5 ml de água, e as amostras foram homogeneizadas em microprocessador Sentry™ modelo Tempest I.Q.², a 25.000 rpm, por 45 segundos. Após a homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio com tampa de teflon, e os frascos utilizados na extração foram lavados com mais 1 ml de clorofórmio, para evitar perda de lipídios que ficariam retidos nas paredes do frasco. Os tubos com tampa de teflon contendo as amostras homogeneizadas foram centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, a camada orgânica (inferior) foi removida através da técnica das 2 pipetas. Esta técnica consiste em colocar uma pipeta Pasteur longa dentro de outra curta. Com esta pipeta curta, a camada inferior é retirada e transferida para outro frasco. A pipeta curta foi lavada com clorofórmio, e o processo foi repetido por 3 vezes, para extração total dos lipídios teciduais. Os extratos finais foram transferidos para frascos menores, e as amostras foram evaporadas em estufa por 12 horas a 55°C. Após a evaporação, as amostras foram re-suspendidas em 1 ml de clorofórmio e agitadas em Vórtex por 30 segundos, para re-suspensão completa e posterior dosagem.

Para a determinação dos lipídios totais foram pipetados 20ul de plasma ou do extrato já re-suspendido obtido do método de Folch, e no caso das amostras de músculo branco, foi pipetado 100ul, que foram acrescentados a um tubo de ensaio e adicionados de 200 ul de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram levados a um banho fervente por 10 minutos e em seguida, adicionado 5 ml do reagente de fosfovanilina (vanilina + ácido fosfórico + H₂O destilada). Os tubos foram novamente levados para banho, agora a 37°C, por 15 minutos e em seguida foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro, a 540nm. A quantidade

de lipídios totais foi calculada contra uma curva padrão de óleo de fígado de bacalhau (Cod liver oil fatty acid methyl esters, Sigma).

Proteínas totais

A concentração de proteínas totais no plasma foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, (1951). O teor protéico dos tecidos foi determinado pela mesma metodologia, após precipitação e solubilização das proteínas totais segundo metodologia de Milligan & Girard (1993). Na determinação de proteínas totais, o plasma foi inicialmente diluído (fator de diluição a ser determinado em experimentos piloto) com água destilada. Em tubos de ensaio foi adicionada mistura reativa (tartarato de sódio e potássio + sulfato de cobre + carbonato de sódio em hidróxido de sódio). Após 10 minutos, foi adicionado o reativo de Folin-Ciocalteu diluído (1:1) e após 30 minutos a absorbância foi lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 660nm, contra uma curva padrão de albumina sérica bovina (serum bovine albumine, Sigma).

ANEXO 3

1. Determinação de Nitrito pela Reação de Griess

A) Princípio do método:

A reação mais comumente utilizada para determinação de nitrito é a reação de Griess, baseada na reação de diazotação da sulfanilamida com nitrito, seguido do acoplamento do produto dessa reação com a N-1-naftiletilenodiamina em meio ácido.

O composto formado, de coloração púrpura, é proporcional à quantidade de nitrito presente na amostra e apresenta máximo de absorção em 540nm. Espectro de absorção na região do visível do azocomposto produzido na reação de Griess.

B) Pré-tratamento das amostras para determinação de nitrito:

As amostras coletadas devem ser armazenadas em geladeira, sem aditivos. Devem ser analisadas no mesmo dia da coleta. Se estiverem muito turvas é necessário realizar a filtração em membrana de 0,45um.

C) Soluções necessárias:

No preparo das soluções usar preferencialmente água tipo 1 (Milli Q) ou água deionizada.

⇒ Solução de reagente colorimétrico formado pela mistura de 4g de sulfanilamida com 0,100g de cloridrato de naftiletilenodiamina e 10ml de ácido fosfórico concentrado para 100ml de solução; Armazenar em frasco âmbar, imediatamente após o preparo. Pode ser armazenado em geladeira ($\pm$ uma semana) para ser usado posteriormente, contudo observar a solução deverá ser incolor. Se estiver rosa, descartar.

⇒ Solução padrão estoque (E_1) de nitrito de sódio ou potássio, contendo o equivalente a 200mgN/L. Preparar solução 0,986g/L de NaNO_2 ou 1,214g/L de KNO_2 . Acrescentar 2ml de clorofórmio depois de pronta. É melhor armazenar em geladeira.

⇒ Solução padrão estoque (E_2) de nitrito de sódio ou potássio contendo 20mgN/L preparada pela diluição de 10ml da solução estoque E_1 para o volume final de 100ml. Armazenar em geladeira.

⇒ Padrões de nitrito na faixa de 0,02 a 0,5mgN/L preparados por diluição da solução estoque E_2 . Estes padrões devem ser preparados no momento da análise e sobras devem ser descartadas.

D) Preparo dos padrões:

Preparar 100ml dos padrões, diluídos conforme as proporções da tabela abaixo. Depois de completado o volume, homogeneizar e transferir para frascos âmbar devidamente identificados:

Conc. padrão mgN/L	Alíquota solução E_2	Volume final (c/ água)
0 (água)	0	100ml
0,02	100ul	100ml
0,05	250ul	100ml
0,10	500ul	100ml
0,20	1000ul	100ml
0,40	2000ul	100ml
0,50	5000ul	100ml

E) Método de análise:

No momento da análise, as soluções do reagente, dos padrões e as amostras devem estar em temperatura ambiente.

Identificação Padrão (mgN/L)	Volume de Padrão (ml)	Volume de Reagente colorimétrico (ml)
0 (água)	4	2
0,02	4	2
0,05	4	2
0,10	4	2
0,20	4	2
0,40	4	2
0,50	4	2

E1 Para curva analítica:

Misturar e homogeneizar as proporções de padrão e reagente colorimétrico designados na tabela a seguir:

E2) Para análise das amostras

Misturar as seguintes proporções de amostra, reagente colorimétrico e água (é importante homogeneizar bem cada meio reacional).

Identificação	amostra (ml)	Reag color (ml)	água deionizada (ml)	Parâmetro determinado
Amostra A	4	2	0	Replicata 1 A
Amostra A	4	2	0	Replicata 2 A
Brc amost. A	4	0	2	Brc amost. A
Amostra B	4	2	0	Replicata 1 B
Amostra B	4	2	0	Replicata 2 B
Brc amost. B	4	0	2	Brc amost. B

Obs: Prepara um branco para cada amostra.

E3 Medida das absorvâncias:

Após 20 minutos, medir as absorvâncias em 540nm para todos os meios reacionais preparados (padrões, amostras e branco das amostras). Usar cubeta com caminho ótico de 1 cm (pode ser acrílico, vidro ou quartzo, pois absorve na região visível do espectro).

- Se a amostra A for > padrão 0,5mgN/L, a amostra precisa ser diluída.
- Diluir com água Tipo 1 ou deionizada, de modo que o valor de absorvância da amostra diluída esteja no meio da curva analítica.
- Anotar o fator de diluição utilizado.
- O branco desta amostra será realizado com o mesmo fator de diluição.

2. Determinação de Amônia em Amostras de Águas de Rios pelo Método do Fenolato

Princípio do Método

O mecanismo proposto para a reação de Berthelot consiste na reação da amônia com íon hipoclorito, formando um composto intermediário chamado de monocloroamina (reação I). Na sequência, a monocloroamina reage com o fenol formando o composto intermediário da reação II. O intermediário da reação II também reage com fenol, produzindo um composto de coloração azul chamado de indofenol (reação III), o qual absorve em 632 nm. Nitroprussiato de sódio é geralmente incorporado no meio reacional porque aumenta a velocidade da reação e a sensibilidade do método. Citrato de sódio em meio alcalino é utilizado como complexante para evitar a interferência de cálcio e magnésio.

Condicionamento das amostras.

As amostras coletadas podem ser mantidas sem aditivos se conservadas em geladeira e analisadas no máximo em 24 horas. Caso seja necessário armazená-las por período maior, as amostras devem ser acidificadas ainda em campo com 1mL de H_2SO_4 concentrado para cada litro de amostra e preservadas em geladeira. Neste caso, pode-se analisar dentro de um prazo máximo de 28 dias.

Reagentes e Soluções

Obs: Usar luvas descartáveis no preparo de todas as soluções e durante a realização do experimento; manter todas as soluções na geladeira em frasco

ambar; retirar da geladeira antes da utilização e deixar atingir a temperatura ambiente.

Análise de amostras naturais (conservadas apenas em geladeira)

⇒ solução de nitroprussiato 0,5%

⇒ solução alcalina de citrato de sódio 20% em NaOH 1%: Pesar 20 g de citrato de sódio di-hidratado e 1 g de NaOH. Misturar, dissolver e diluir em balão volumétrico para 100 mL.

⇒ hipoclorito de sódio 2,5%

solução oxidante: 100 mL da solução alcalina de citrato de sódio misturada com 50 mL de hipoclorito de sódio 2,5%

⇒ solução de fenol 0,126 mol/L: 11,1 mL de fenol liquefeito diluído para 100mL com etanol absoluto. Densidade do fenol = 1,071g/mL; mw=94,11g/mol

⇒ solução estoque E_1 contendo 3,819 g/L de NH_4Cl (1000mgN/L)

⇒ solução estoque E_2 100mgN/L preparada por diluição de E_1

⇒ padrões de NH_4Cl contendo 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1 mgN/L, preparados por diluição de E_2

concentração (mgN/L)	alíquota de $E_2 = 100 \text{ mg/L}$	Vol. final
0,05	50 μL	100 mL
0,1	100 μL	100 mL
0,2	200 μL	100 mL
0,5	500 μL	100 mL
1	1000 μL	100 mL

Análise de amostras acidificadas em campo com 1mL de H_2SO_4 concentrado por L de amostra :

Neste caso é importante para equiparar a acidez das amostras e padrões (tornar as matrizes similares)

⇒ 1 L de solução de H_2SO_4 0,018 mol/L

Usar esta solução como solvente para o preparo de todas as soluções do padrão (estoques e diluições);

Se o teor de amônia nas amostras for superior à faixa analítica de trabalho, diluir as amostras e seus respectivos brancos também com esta solução.

⇒ solução estoque E_1 contendo 3,819 g/L de NH_4Cl (1000mgN/L), preparada em H_2SO_4 0,018 mol/L

⇒ solução estoque E_2 100mgN/L preparada por diluição de E_1 , preparada em H_2SO_4 0,018 mol/L

⇒ padrões de NH_4Cl contendo 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1 mgN/L, preparados por diluição de E_2 , em H_2SO_4 0,018 mol/L

Concentração (mgN/L)	Alíquota de E_2 = 100 mg/L	Vol. Final diluído c/ H_2SO_4 0,018 mol/L
0,05	50 μL	100 mL
0,1	100 μL	100 mL
0,2	200 μL	100 mL
0,5	500 μL	100 mL
1	1000 μL	100 mL

⇒ 100 mL de solução tampão de carbonato de sódio 0,25 mol/L, pH ajustado em 10,2 com HCl (para adequar o pH do meio reacional) . Pesar 2,6497 g de Na_2CO_3 , dissolver em 50 mL de água. Ajustar o pH em 10,2 com solução de HCl 6 mol/L, transferir para balão volumétrico e completar o volume para 100 mL.

⇒ solução alcalina de citrato de sódio 20% em NaOH 1%:

⇒ hipoclorito de sódio 2,5%

⇒ solução oxidante: 100 mL da solução alcalina de citrato de sódio misturada com 50 mL de hipoclorito de sódio 2,5%

⇒ solução de fenol 0,126 mol/L: 11,1 mL de fenol liquefeito diluído para 100mL com etanol absoluto.

Procedimento

Ligar o espectrofotômetro e programá-lo para obtenção de espectros na região entre 400 –1100 nm, zerando o equipamento com água deionizada. Programar para serem listados os valores de absorbância em 632 nm. Usar cubeta de caminho ótico de 1 cm:

Para preparo dos meios reacionais de amostras e padrões, usar frascos âmbar de 10 mL para evitar a incidência de luz. É de extrema importância seguir a ordem de adição de reagentes recomendadas. Qualquer alteração no procedimento leva à formação de produtos diferentes do indofenol.

Análise de amostras e padrões não acidificados

a) Análise dos padrões:

Transferir alíquotas de 5 mL de cada um dos padrões na faixa de 0,05-0,1 mgN/L para vials distintos, acrescentando-se em cada um deles 250 μ L de solução do fenol, 250 μ L de nitroprussiato de sódio 0,5% e 500 μ L de solução oxidante. Homogeneizar o conteúdo dos vials após a adição de cada reagente. Guardar os frascos tampados e no escuro por 1 hora. Após este período medir os espectros destas soluções.

b) Análise das amostras

Distribuir alíquotas homogêneas de 5 mL de amostras em 3 diferentes vials com capacidade para 10 mL cada um. Nos dois primeiros vials, acrescentar 250 μ L de solução do fenol, 250 μ L de nitroprussiato de sódio 0,5% e 500 μ L de solução oxidante a determinação do teor de amônia em duplicata. No terceiro vial preparar o branco da amostra, acrescentando 1000 μ L de água Tipo 1. Homogeneizar o conteúdo dos vials após a adição de cada reagente. Guardar os frascos tampados e no escuro por 1 hora. Após este período, medir os espectros das amostras em duplicata e do branco das amostras.

Amostras e padrões acidificados:

Análise dos padrões:

Transferir alíquotas de 5 mL de cada um dos padrões na faixa de 0,05-0,1 mgN/L para vials distintos, acrescentando-se em cada um deles 250 μ L de solução do fenol e 250 μ L de nitroprussiato de sódio 0,5%. Homogeneizar o conteúdo dos vials após a adição de cada reagente. Na seqüência, acrescentar

500 μL de solução oxidante, homogeneizar e imediatamente acrescentar 1 mL de solução tampão carbonato. Guardar os frascos tampados e no escuro por 1 hora. Após este período medir os espectros destas soluções.

a) Análise das amostras

Distribuir alíquotas homogêneas de 5 mL de amostras em diferentes vials com capacidade para 10 mL cada um. Acrescentar 250 μL de solução do fenol e 250 μL de nitroprussiato de sódio 0,5%. Homogeneizar o conteúdo dos vials após a adição de cada reagente. Na seqüência, acrescentar 500 μL de solução oxidante, homogeneizar e imediatamente acrescentar 1 mL de solução tampão carbonato. Fazer este procedimento em duplicata para cada amostra. Guardar os frascos tampados e no escuro por 1 hora. Após este período, medir os espectros das amostras preparadas.

Preparar um branco para cada amostra, com 5 mL de amostra, 1 mL de H_2SO_4 0,018 mol/L e 1 mL de tampão. Homogeneizar o conteúdo dos vials após a adição de cada reagente. Medir os espectros dos brancos das amostras (não é necessário esperar 1 hora neste caso).

3. DETERMINAÇÃO DO ALUMÍNIO LÁBIL

PREPARO DO MEIO REACIONAL PARA O TANQUE (AQUÁRIO):

Encher o tanque com 130 L de água da torneira.

Determinar em duplicata a alcalinidade, dureza, fluoreto e fosfato total da água utilizada (300 mL são suficientes para essa finalidade).

Retirar com auxílio de um béquer, aproximadamente 500 mL da água do tanque. Dissolver nesta água 1,1428 g de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (esta massa de sal corresponde a 0,5 mg/L de Al) e 10g de NaHCO_3 . Medir o pH desta solução com eletrodo de vidro previamente calibrado. Acrescentando solução de HCl concentrado, ajustar o pH da solução em aproximadamente 5. Transferir esta solução para o tanque e homogeneizar. Medir o pH da água do tanque. Se o pH estiver acima do valor desejado, retirar com um béquer aproximadamente 500 mL de água do tanque e ajustar o pH para 5 novamente. Retornar a água do béquer para o tanque, homogeneizar e conferir o valor de pH do tanque. Repetir este procedimento até que o pH do tanque esteja em $5,5 \pm 0,2$.

NÃO JOGAR O ÁCIDO CONCENTRADO DIRETAMENTE NO TANQUE – RISCO DE DANO AOS PEIXES!

COLETA DE AMOSTRA PARA Al LÁBIL E ALCALINIDADE NO TEMPO $T=0$

No instante inicial ($t = 0$, antes de colocar os peixes), retirar uma alíquota de 150 mL do meio reacional. Desta alíquota, 125 mL destinam-se para determinação da alcalinidade após a adição do sal de alumínio na água. Os 25 mL restantes são destinados para a determinação de Al lábil no tempo $t=0$, conforme procedimento a ser descrito.

A partir do momento que os peixes forem colocados no tanque, marcar o dia e horário de início do experimento e número de indivíduos.

PROCEDIMENTO DIÁRIO:

AJUSTE DIÁRIO DO pH

Primeiramente medir o pH do tanque com eletrodo de vidro previamente calibrado. Se o pH estiver acima do valor desejado ($5,5 \pm 0,2$), retirar um volume de 500 mL de água do tanque com auxílio de um béquer. Usando solução de HCl concentrado e eletrodo de vidro, ajustar em 5 o pH da água do béquer. Retornar a água com pH ajustado para o tanque. Misturar a água do tanque para homogeneizar. Medir novamente o pH da água do tanque. Repetir este procedimento até que o pH da água do tanque esteja em $5,5 \pm 0,2$. Anotar data e horário, além do pH antes e depois do ajuste.

COLETA E CONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO TANQUE

PARA ANÁLISE QUÍMICA.

Depois do pH estar ajustado, coletar 250 mL de amostra de cada canto do tanque e da posição central. Misturar e homogeneizar as cinco amostras coletadas e desta composição, retirar 250 mL (o restante pode voltar ao tanque)

Destes 250 mL devem ser separados 25 mL para análise de Alumínio Lábil. Se a amostra estiver muito turva é necessário fazer (rapidamente) a filtração dos 25 mL em membrana de $0,45 \mu\text{m}$. Analisar rapidamente (assim que coletar e filtrar).

Cerca de 75 mL da amostra obtida por composição devem ser separados para determinação de Al total. Neste caso, esse volume de amostra deve ser acidificado com 75 μL de HNO_3 concentrado. Homogeneizar a mistura e guardar para posterior determinação de Alumínio Total. Guardar as amostras em frasco de plástico, previamente **limpos com solução de HNO_3 10%**, enxaguados com água deionizada e **secos**.

Retirar outra porção de 75 mL da amostra obtida por composição e separar para determinação de fósforo total, Este volume deve ser acidificado com 75 μ L de H_2SO_4 concentrado. Homogeneizar a mistura e guardar para posterior determinação de fósforo total.

Os 75 mL restantes de amostra composta devem ser guardados em geladeira, sem nenhum aditivo, para análise de nitrato, nitrito e amônia. O parâmetro nitrito deve ser analisado no mesmo dia da coleta. As amostras para nitrato, e amônia podem ser armazenados na geladeira, por até 1 semana.

Para cada amostra coletada identificar os frascos com as seguintes informações: data da coleta, horário, pH medido inicialmente, valor de pH ajustado e tipo de análise (AI lábil ou AI total, nitrato, nitrito, amônia, fósforo total).

SUGESTÃO DE INTERVALOS DE COLETA AO LONGO DO EXPERIMENTO:

Dia do experimento	Horário de início	Tempo de reação/h
1 ^o	9:00	0
1 ^o	9:30	0,5
1 ^o	10:00	1
1 ^o	11:00	2
1 ^o	13:00	4
1 ^o	17:00	8
1 ^o	21:00	12
2 ^o	9:00	24
2 ^o	21:00	36
3 ^o	9:00	48
4 ^o	9:00	72
5 ^o	9:00	96
7 ^o	9:00	144
9 ^o	9:00	192
11 ^o	9:00	240
13 ^o	19:00	296
ETC		
21 ^o		

- ✓ No primeiro dia é importante manter aproximadamente o perfil sugerido para coleta.
- ✓ Os demais dias podem ter variações nos horários sugeridos (± 1 hora).

SOLUÇÕES NECESSÁRIAS PARA O MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO:

Obs: No preparo das soluções usar preferencialmente água tipo 1 (Milli Q) ou água deionizada.

⇒ Ácido sulfúrico 0,01 mol/L: Pipetar 139 μ L de ácido sulfúrico concentrado (18 mol/L) e diluir previamente em um béquer contendo 200 mL de água. Depois de esfriar, transferir para balão volumétrico de 250 mL e completar o volume.

⇒ Ácido ascórbico 0,1%. Pesar 0,1 g do reagente, dissolver em aproximadamente 50 mL de água, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume.

⇒ Ácido acético 1 mol/L: Pipetar 2,78 mL de ácido acético glacial (18 mol/L) e diluir previamente em um béquer contendo 25 mL de água. Depois de esfriar, transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume. (Para preparar o tampão acetato)

⇒ Solução tampão preparada pela mistura de 136 g de acetato de sódio tri-hidratado (ou 82,03 g de acetato de sódio anidro) com 40 mL de ácido acético 1 mol/L. Depois de dissolver e homogeneizar, transferir para balcão volumétrico de 1 L e completar o volume.

⇒ Ácido acético 50%(v/v) (equivale a 9 mol/L): Misturar 10 mL de água com 10 mL de ácido acético glacial. (para acertar o pH do reagentes espectrofotométrico)

⇒ Solução Estoque 0,3% (m/v) de reagente espectrofotométrico Eriocromo Cianina R .(ECR₁) Dissolver 0,03 g do reagente em aproximadamente 5 mL de água. Ajustar o pH de 9 para 2, 9 com ácido acético 50%. Diluir para 10 mL completando o volume em balão volumétrico. Concentração final.

⇒ Solução de Trabalho 0,03% (m/v) de reagente espectrofotométrico (ECR₂): . Pipetar 1 mL da solução estoque ECR₁ e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Completar o volume com água.

⇒ Solução padrão estoque (E_1) de $AlK(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ contendo o equivalente a 0,5g Al/L. Pesar 0,2198 g do sal, diluir em aproximadamente 10 mL de água, transferir para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume.

⇒ Solução estoque (E_2) $AlK(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ contendo o equivalente a de $5 \cdot 10^{-3}$ g Al/L preparada pela diluição da solução estoque E_1 ; Pipetar 250 μ L da solução estoque E_1 , transferir para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com água.

⇒ Padrões de Al na faixa de 35 a 350 μ g Al/L, preparados por diluição da solução estoque. E_2 .

Obs.: Nenhuma das soluções dos padrões de Al pode ser armazenada para uma próxima análise, pois o Al sofre hidrólise em solução. Preparar os padrões necessários e imediatamente realizar a determinação da curva analítica

DILUIÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE $5 \cdot 10^{-3}$ g Al/L PARA O PREPARO DOS PADRÕES DA CURVA ANALÍTICA:

Preparar 25 mL dos padrões, diluídos conforme as proporções da Tabela abaixo. Depois de completado o volume homogeneizar e utilizar imediatamente.

Conc. final do Padrão μ g Al/L	Alíquota da solução estoque $5 \cdot 10^{-3}$ g Al/L	Volume Final (com H_2O deionizada)
0 (água)	0	25 mL
35	175 μ L	25 mL
70	350 μ L	25 mL
140	700 μ L	25 mL
210	1050 μ L	25 mL
280	1400 μ L	25 mL
350	1750 μ L	25 mL

MÉTODO DE ANÁLISE:

ANALISAR OS PADRÕES IMEDIATAMENTE APÓS O PREPARO. APÓS A COLETA DA AMOSTRA DO TANQUE, PIPETAR 5 ML DA AMOSTRA COLETADA E TRANSFERIR PARA BALÃO VOLUMÉTRICO DE 10 ML, COMPLETAR O VOLUME COM ÁGUA. ANALISAR IMEDIATAMENTE APÓS

ESTA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS IMEDIATAMENTE APÓS A COLETA FATOR DE DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS = 2

PARA CURVA ANALÍTICA:

Misturar e homogeneizar as proporções de padrão , ácido sulfúrico 1 mol/L, ácido ascórbico, tampão acetato e reagente colorimétrico designados na tabela a seguir: (adicionar na ordem mencionada, agitando após a adição de cada componente da mistura).

Identificação Padrão (µgAl/L)	Volume de Padrão	Volume de H ₂ SO ₄ 0,01 mol/L	Ácido ascórbico 0,1%	Tampão acetato	Volume de Reagente espectrofotométrico
0 (água)	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	500 µL
35	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	500 µL
70	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	500 µL
140	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	500 µL
210	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	500 µL
280	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	500 µL
350	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	500 µL

PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS:

Identificação	Volume de amostra diluída 1 para 2	Volume de H ₂ SO ₄ 0,01 mol/L	Ácido ascórbico 0,1%	Tampão acetato	Volume de Reagente colorimétrico	Volume de H ₂ O	Parâmetro determinado
Amostra X replicata 1	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	500 µL	0	A ₁
Amostra X replicata 2	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	500 µL	0	A ₂
branco amostra A	2,5 mL	100 µL	100 µL	1 mL	0	500 µL	A do branco da amostra

Observação importante: Preparar um branco para cada amostra

Medida das Absorbâncias

Após 10 minutos, medir as absorbâncias em 532 nm para todos os meios reacionais preparados (padrões, amostras e branco das amostras). Usar cubeta com caminho ótico de 1 cm (pode ser de acrílico, vidro ou quartzo, pois absorve na região visível do espectro).

DADOS OBTIDOS PARA CURVA ANALÍTICA

µgAl/L	A 532 nm
0,0	0,229
35,0	0,292
70,0	0,327
140,0	0,444
210,0	0,532
280,0	0,645
350,0	0,767

4 Mineralização (Digestão) de Amostra de água de Tanque para determinação de ALUMÍNIO TOTAL

⇒ limpeza dos frascos

⇒ manter os frascos previamente lavados com água deionizada (ou melhor, por ex Milli Q) ; durante a noite deixar em solução de ácido nítrico 10%

⇒ no dia seguinte, lavar com água deionizada (ou melhor)

DIGESTÃO

⇒ colocar 50 mL da amostra e 5 mL de ácido nítrico concentrado em um erlenmeyer de 250 mL, pérolas de vidro e manter em chapa de aquecimento. Não permitir entrar em ebulição tumultuosa (diminuir a taxa de aquecimento)

⇒ evaporar até um volume de 10 a 20 mL. Se a solução não estiver límpida, adicionar mais 5 mL de ácido nítrico concentrado e 5 mL de água deionizada (ou melhor). Se após a nova evaporação a solução não estiver límpida, adicionar alíquotas de 5 mL de ácido nítrico e manter o aquecimento brando até a solução ficar límpida.

⇒ Após a solução límpida esfriar, ajustar o pH com NaOH 12 mol/l (o pH deve ficar entre 4 e 7); transferir quantitativamente para um balão de 100 mL e completar o volume com água deionizada (ou melhor).

⇒ Realizar rapidamente o procedimento para determinação espectrofotométrica de alumínio da amostra.

⇒ Para realizar a comparação:

⇒ Padrão 1: Digerir 50 mL de padrão de Al 350 µg/L, de maneira similar ao procedimento realizado para a amostra (inclusive o acerto de pH). Diluir para volume final igual a 100 mL e analisar (C final padrão = 175 µg/L).

⇒ Padrão 2: Digerir 50 mL de padrão de Al 280 µg/L, de maneira similar ao procedimento realizado para a amostra (inclusive o acerto de pH). Diluir para volume final igual a 100 mL e analisar (C final padrão = 140 µg/L).

APÓS ESTES PROCEDIMENTOS, DEVE-SE SEGUIR OS PROTOCOLOS DE DOSAGEM DO ALUMÍNIO TOTAL.

ANEXO 3

PROTOCOLO DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Técnica de coloração em Hematoxilina e Eosina (H.E)

1. Desparafinizar as lâminas em: Xilol I, Xilol II, Álcool abs., Álcool 95%, Álcool 70%, (esses banhos têm 3 minutos cada).
2. Lavar em água corrente de torneira por 5 minutos
3. Corar com a Hematoxilina por 2 a 5 minutos
4. Lavar em água corrente por 5 minutos
5. Diferenciar com a solução de Álcool 70 % (250 ml)+Ácido clorídrico (1,25 ml) por até 30 segundos
6. Lavar em água destilada por 5 minutos
7. Contra-corar com Eosina por 1 a 2 minutos
8. Desidratar na bateria de: Álcool 95%, Álcool abs., Xilol+Álcool abs.(1:1), Xilol I, Xilol II, Xilol final; nesse último Xilol manter as lâminas dentro da cuba para montagem.
9. Na montagem, limpar as lâminas com cuidado em volta do corte, deixando o tecido úmido com Xilol, para melhor aderência do bálsamo na lamínula e no corte.
10. Colocar o bálsamo, montar, e deixar secar à temperatura ambiente ou estufa à 37°C