

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**MORFOLOGIA, MORFOMETRIA, DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS MUCOSAS E
DE CLORETO EM EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen*
(HEPTAPTERIDAE). EFEITO DO pH E CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO E
MAGNÉSIO NA ÁGUA**

Lenise Vargas Flôres da Silva

**SÃO CARLOS
2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**MORFOLOGIA, MORFOMETRIA, DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS MUCOSAS E
DE CLORETO EM EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen*
(HEPTAPTERIDAE). EFEITO DO pH E CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO E
MAGNÉSIO NA ÁGUA**

Lenise Vargas Flôres da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos (SP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Marisa Narciso Feranandes

**SÃO CARLOS
2006**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S586mm

Silva, Lenise Vargas Flôres da.

Morfologia, morfometria, distribuição de células mucosas e de cloreto em embriões e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). Efeito do pH e concentração de cálcio e magnésio da água / Lenise Vargas Flôres da Silva. - São Carlos : UFSCar, 2006.

101 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Teleosteos. 2. *Rhamdia quelen*. 3. Células - cloreto. 4. Células - mucosas. 5. Peixe – larva. I. Título.

CDD: 597.5 (20^a)

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese as pessoas mais importantes da minha vida:
meus pais Lídia e Dionélio
e meu marido Rodrigo
por todo apoio e compreensão nos momentos de ausência.*

é como aquela música:

*“quem vira mundo não para e nem tão pouco desanima....e o tempo que nos separa é o que
mais nos aproxima.*

*(Música tradicional gaúcha,
Álbum: Querência Tempo e Ausência- Luiz Marengo e Teddy)*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me auxiliaram ao longo destes quatro anos.

Primeiramente, aos meus “pais científicos” minha orientadora, Prof. Dra. Marisa Narciso Fernandes e ao Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto (orientador no mestrado e co-orientador deste trabalho) em que sempre me auxiliaram, orientaram, e acima de tudo pela amizade e compreensão nas dificuldades.

Ao pessoal do Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria-RS pelo auxílio nas reproduções, em especial ao Prof. Dr. João Radünz Neto responsável por este setor em que sempre me dedicou toda ajuda necessária para realização dos trabalhos.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade Federal de Santa Maria, em especial a atual Dra. Jaqueline Ineu Golombieki, pelo auxílio incansável nos experimentos, pois passamos muitas noites em claro.

A todos os funcionários da secretaria do curso de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, sob a coordenação do Prof. Dr. José Roberto Verani pelos esclarecimentos, auxílios e a CAPES pela bolsa de estudo.

Aos professores do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, Tadeu Rantin e Ana Kalinin em que sempre mostraram disponibilidade em tudo que precisei.

Aos colegas e amigos do LZBC pelo auxílio nas técnicas utilizadas e também pelos maravilhosos momentos de descontração: Fábio de Jesus Castro, Cleoni Carvalho, André Cruz, Marise Sakuragui, Fernanda Sampaio, Guilherme Pinheiro, Laila Romagueira, Eliane Oba, Diana Monteiro, Mônica Jones, Cléo Leite, Lyandra Neder, Jeane de Almeida, Cheila Boijink, Jane Melo. A aluna de iniciação e atualmente bióloga Alessandra Santos que auxiliou nos trabalhos de histologia e aos demais alunos do laboratório.

Á Aurélia Mazon pelo ensinamento das técnicas de imunohistoquímica e colaboração em geral .

Ao Sr. João Gilberto Bortolotti e Sra. Regina Bortolotti (Piscicultura Visconde) pela disposição de sua propriedade para realização de trabalhos.

A Deus..... e a todos, muito obrigada

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Espécie <i>Rhamdia quelen</i>	5
Objetivos.....	8
Referências Bibliográficas.....	9
CAPÍTULO 1.	
MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ, <i>Rhamdia quelen</i> (HEPTAPTERIDAE, TELEOSTEI). INTERAÇÃO DO pH E CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO E MAGNÉSIO NA ÁGUA.....	16
Resumo.....	16
Introdução.....	16
Materiais e métodos.....	19
Resultados.....	22
Discussão.....	38
Conclusão.....	44
Referências Bibliográficas.....	44
CAPÍTULO 2.	
DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS MUCOSAS EM EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ (<i>Rhamdia quelen</i>), (HEPTATERIDAE, TELEOSTEI). INTERAÇÃO DO pH E CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO E MAGNÉSIO DA ÁGUA.....	48
Resumo.....	48
Introdução.....	49

Materiais e métodos.....	51
Resultados.....	53
Discussão.....	60
Conclusão.....	65
Referências Bibliográficas.....	65
CAPÍTULO 3.	
DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS DE CLORETO EM EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ, <i>Rhamdia quelen</i> (HEPTAPTERIDAE, TELEOSTEI). INTERAÇÃO DO pH E CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO E MAGNÉSIO NA ÁGUA.....	
	69
Resumo.....	69
Introdução.....	70
Materiais e métodos.....	72
Resultados.....	77
Discussão.....	87
Conclusão.....	92
Referências Bibliográficas.....	93
CONCLUSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

- Figura 1.** Larva de jundiá (*Rhamdia quelen*) 6 hpe (controle-pH 8,0)..... 22
- Figura 2.** Esquema do desenvolvimento morfológico de embriões e larvas de Jundiá..... 24
- Figura 3.** Desenvolvimento morfológico de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*)..... 25
- Figura 4.** Área do saco vitelínico nos estágios de desenvolvimento embrionário..... 36
- Figura 5.** Parâmetros morfométricos básicos no desenvolvimento larval de jundiá..... 37
- Figura 6.** Altura da cabeça e diâmetro do olho ao longo do desenvolvimento larval..... 38

CAPÍTULO 2.

- Figura 1.** Regiões de contagem das células mucosas em larvas de jundiá..... 53
- Figura 2.** Padrão geral de distribuição das células mucosas em larvas após eclosão..... 55
- Figura 3.** Distribuição geral das células mucosas na superfície corporal..... 56
- Figura 4.** Coloração-PAS positiva para células mucosas em larva de jundiá..... 57
- Figura 5** Célula mucosa de *Rhamdia quelen* em microscopia eletrônica de varredura..... 58
- Figura 6.** Número total das células mucosas em larvas de jundiá..... 60

CAPÍTULO 3.

- Figura 1.** Identificação das regiões de contagem das células de cloreto 75
- Figura 2.** Células imunopositivas para a Na^+/K^+ -ATPase nas diferentes regiões... 78
- Figura 3.** Células imunopositivas para a Na^+/K^+ -ATPase nos rins e no intestino... 79
- Figura 4.** Células de cloreto de larvas de *R. quelen* em microscopia eletrônica de varredura..... 79
- Figura 5.** Padrão geral da distribuição das células de cloreto em larvas de jundiá. 80

Figura 6. Efeito dos pHs sobre o número total de células de cloreto em larvas	82
Figura 7. Interação entre a concentração de Ca^{2+} : Mg^{2+} e pH da água.....	86

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1.

Tabela 1. Percentagem de fertilização, eclosão, sobrevivência após eclosão e sobrevivência final de larvas de <i>Rhamdia quelen</i> em pH 7,0 e 8,0 e diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} na água.....	22
Tabela 2. Peso corporal e comprimento total de larvas de <i>Rhamdia quelen</i> após 48 e 216 h da eclosão cultivadas em pHs 7,0 e pH 8,0 em diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} na água.....	23
Tabela 3. Área total do ovo, área do saco vitelínico, diâmetro do ovo e altura da cabeça de embriões de jundiá, <i>Rhamdia quelen</i> 24 h após a fertilização em função do pH 7,0 e 8,0 e das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.....	28
Tabela 4. Área corporal total média de larvas após a eclosão de <i>Rhamdia quelen</i> em função do pH 7,0 e 8,0 e das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.....	29
Tabela 5. Área média do saco vitelínico de embriões e larvas após a eclosão de <i>Rhamdia quelen</i> em função do pH 7,0 e 8,0 e das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.....	30
Tabela 6. Comprimento total médio de larvas após a eclosão de <i>Rhamdia quelen</i> em função do pH 7,0 e 8,0 e das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.....	31
Tabela 7. Comprimento médio da cauda de larvas após a eclosão de <i>Rhamdia quelen</i> em função do pH 7,0 e 8,0 e das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.....	32
Tabela 8. Diâmetro médio do olho de larvas após a eclosão de <i>Rhamdia quelen</i> em função do pH 7,0 e 8,0 e das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.....	33
Tabela 9. Altura média da cabeça de larvas após a eclosão de <i>Rhamdia quelen</i> em função do pH 7,0 e 8,0 e das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.....	34
Tabela 10. Coeficiente de crescimento alométrico e correlação para as variáveis de área do saco vitelínico, comprimento da cauda, diâmetro do olho e altura da cabeça, nos pHs 7,0 e 8,0 nas fases de desenvolvimento embrionário e/ou larval de <i>Rhamdia quelen</i>	35

CAPÍTULO 2.

Tabela 1. Número total de células mucosas no estágio embrionário e larval após 6, 12 , 30, 48 e 216h da eclosão de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em pHs 7,0 e 8,0 com diferentes concentrações de cálcio e magnésio na água.....	59
--	----

CAPÍTULO 3.

Tabela 1. Número total de células imunopositivas para a Na^+/K^+ -ATPase (CC) no período embrionário e larval de 6, 12 , 30, 48 e 216h após eclosão de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em pHs 7,0 e 8,0 com diferentes concentrações de cálcio e magnésio na água.....	83
Tabela 2. Atividade específica da enzima Na^+/K^+ ATPase em diferentes fases de desenvolvimento de larvas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) cultivadas em pHs 7,0 e 8,0 com diferentes concentrações de cálcio e magnésio na água.....	84
Tabela 3. Íons corporais (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e Cl^-) em larvas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) após 48 e 216 h da eclosão cultivadas em pHs 7,0 e 8,0 em diferentes concentrações de cálcio e magnésio na água.....	85

RESUMO

Os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e o pH da água de cultivo podem influenciar nas características morfológicas e morfométricas assim como na regulação iônica em peixes. Os objetivos deste estudo foram descrever o padrão morfológico e morfométrico básico do desenvolvimento de embriões e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*; identificar e avaliar a distribuição das células mucosas e de cloreto e verificar o possível efeito do pH e da dureza da água em diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre essas variáveis. Após a fertilização os ovos foram mantidos em água com pH 7,0 e 8,0 com 3 diferentes concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} na água (mg L^{-1}): dureza 20 mg L^{-1} CaCO_3 (5,0 Ca^{2+} : 2,08 Mg^{2+} , controle) e dureza 70 mg L^{-1} CaCO_3 (20 Ca^{2+} :5,59 Mg^{2+} e 23 Ca^{2+} : 2,08 Mg^{2+}) a $24\pm 1^\circ\text{C}$. Os ovos (24 horas após fertilização) e larvas (a cada 6 horas) de 6 a 48 e 216 h após eclosão foram coletados tanto para observação quanto para avaliação da percentagem de eclosão, sobrevivência e crescimento das larvas; dos caracteres morfológicos e morfométricos associados à visão (presença do olho), alimentação (desenvolvimento e funcionalidade do trato digestivo) e habilidade natatória (presença das nadadeiras) e também para identificação das células mucosas e de cloreto, atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase e composição iônica corporal do homogeneizado de embriões e larvas. A percentagem de fertilização, eclosão, sobrevivência após eclosão, sobrevivência final, peso e comprimento (em 48 e 216h) foram maiores em pH 8,0 e não houve diferença significativa em relação às concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} , sugerindo ser esse pH o indicado para o cultivo de larvas de *Rhamdia quelen*. O aumento da dureza da água para 70 mg L^{-1} CaCO_3 , principalmente nas concentrações de 20 mg L^{-1} de Ca^{2+} e 5,59 mg L^{-1} de Mg^{2+} é recomendado por favorecer o aumento da área corporal total das larvas em ambos pHs. O aumento da dureza com a concentração de Ca^{2+} igual a 23 mg L^{-1} na água em ambos os pHs não parece ser o mais adequado para o cultivo das larvas de *Rhamdia quelen*, principalmente porque sugere um desequilíbrio ionoregulatório entre Na^+ e Cl^- nos pHs avaliados. Entretanto, a morfologia em função da seqüência de eventos temporais do desenvolvimento, não foi alterada pelos pHs 7,0 e 8,0 e nem pelas concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} na água utilizada. O estágio de desenvolvimento entre 6-216 h após eclosão foi considerado como período crítico, devido ao desenvolvimento das estruturas relacionadas à osmorregulação (brânquias, intestino e rins) e as modificações necessárias à alimentação exógena (abertura da boca, trato digestivo e poro urogenital). Portanto, estas informações são importantes para pesquisadores e/ou produtores na determinação de técnicas de manejo nas fases iniciais de vida de *Rhamdia quelen*, contribuindo para o estudo biológico desta espécie em ambiente de cultivo. A densidade de célula mucosa apresentou uma relação com o Ca^{2+} na água, sugerindo que, além de uma possível resposta adaptativa, aparentemente existe uma influência osmorregulatória entre as células mucosas das larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) e a dureza da água principalmente em função do Ca^{2+} , influenciada pelo pH da água nas fases larvais avaliadas. Às larvas cultivadas em pH 7,0 sugerem maior número de células mucosas e de cloreto do que em pH 8,0. A dureza da água de 70 mg L^{-1} CaCO_3 (independente das concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+}) influenciou na densidade total de células de cloreto nas primeiras fases após eclosão (6-12h), ocorrendo uma diminuição no número destas células em ambos os pHs. Portanto, há evidências de que o número de células mucosas e de cloreto é modulado nas larvas de jundiá de acordo com a concentração iônica do ambiente de cultivo nas primeiras fases após a eclosão. Esta tese foi organizada em forma de capítulos, contendo inicialmente uma introdução e objetivos do trabalho seguido pelo capítulo 1, referente à morfologia e morfometria de embriões e larvas, capítulo 2 referente à distribuição de células mucosas e o capítulo 3 a distribuição de células de cloreto em embriões e larvas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). Para uma síntese geral integrada do trabalho esta tese foi finalizada com uma tese foi finalizada com conclusões gerais e considerações finais.

ABSTRACT

The ions Ca^{2+} , Mg^{2+} and the water pH influence the morphological and morphometric characters and also in the ionic regulation of fish. The objective of this study was describe the morphological and morphometric development pattern of *Rhamdia quelen* embryo and larvae; and to identify and determine the distribution of mucous and chloride cells in order to evaluate the effect of water pH and hardness in different Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration. After fertilization the eggs were maintained at water pH 7.0 and 8.0 with three different Ca^{2+} : Mg^{2+} concentrations (mg L^{-1}): hardness 20 mg L^{-1} CaCO_3 (5.0 Ca^{2+} : 2.08 Mg^{2+} , control) and hardness 70 mg L^{-1} CaCO_3 (20 Ca^{2+} :5.59 Mg^{2+} and 23 Ca^{2+} : 2.08 Mg^{2+}) at $24\pm 1^\circ\text{C}$. The eggs (24 h post fertilization- hpf) and larvae (each 6 hours) 6 to 48 and 216 h post hatchery (hph) were collected to analyze the hatching rate, survival and larvae growth, morphological and morphometrics characters associates the vision (eye), feeding (development and functionality digestive tract) and swimming abilities (fins), the distribution of mucus and chloride cells, Na^+/K^+ -ATPase activity enzyme, and whole body ionic content in embryo and larvae homogenate. The fertilization, hatching rate, post-hatch survival, weight and length (48 and 216h) were higher in pH 8,0 and did not show significance difference related with Ca^{2+} : Mg^{2+} concentrations. These suggest that the pH 8.0 is indicated to *Rhamdia quelen* larvae culture. The increase of water hardness to 70 mg L^{-1} CaCO_3 , mainly 20 mg L^{-1} Ca^{2+} and 5,59 mg L^{-1} Mg^{2+} concentrations is recommended to both pH device improve the total body area larvae. The increase of hardness with 23 mg L^{-1} Ca^{2+} , is not adequate for *Rhamdia quelen* larvae, as this Ca^{2+} concentration occurs an ionic unbalance Na^+ and Cl^- in both pHs. However, the morphology did not change by pH and Ca^{2+} : Mg^{2+} concentrations used. The developmental stage between 6-216 hph was considered as critic period, device the development of osmoregulatory structures (gills, intestine and kidney) and the necessary changes to begin the exogenous feeding (open mouth, digestive tract, urogenital hole). Therefore, it is important information to researches and/or fisheries to improve the techniques and handlings for *Rhamdia quelen* early stages larvae culture to optimize the environmental conditions. The mucous cell density show a relation with water Ca^{2+} concentration, and it is suggest that beyond the possible adaptive responses, apparently the mucous cells number in silver catfish larvae (*Rhamdia quelen*) are influenced by hardness (Ca^{2+} increases) and water pH in the early phases. The larvae cultivated in pH 7.0 show high mucous cell and chloride cell number than in pH 8.0. The water hardness 70 mg L^{-1} CaCO_3 (independently Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration) changed the chloride cell density in the first hours post hatchery (6-12 h), and the number of these cells was lower in both pHs. Then, these results suggest that the mucous and chloride cell number can be modulated by ionic environmental condition in the early development of silver catfish larvae after hatchery. The thesis was organized in chapters, a general introduction and the objectives, and it was followed by chapter 1 about morphology and morphometry of embryo and larvae, chapter 2 about the distribution of mucous cells and chapter 3 about the distribution the chloride cells of silver catfish (*Rhamdia quelen*) embryo and it was with an integrated synthesis of study, the general conclusions and finish considerations.

INTRODUÇÃO GERAL

A morfologia fornece informações importantes sobre as fases do desenvolvimento embrionário e larval de peixes (BENGSTON, 1999). Os eventos ontogenéticos iniciais como o aparecimento e desenvolvimento das estruturas, o período de eclosão e o início da alimentação exógena são usados para identificar o desenvolvimento em peixes (OJANGUREN & BRAÑA, 2003). O estudo destes eventos além de proporcionar informações sobre a história de vida dos peixes, que ainda é pouco conhecida, também pode indicar parâmetros críticos para produção de espécies com potencial produtivo (MARTINEZ & BOLKER, 2003).

Nos estágios embrionários a regulação iônica é um processo importante para o desenvolvimento dos peixes. A regulação iônica envolve sucessivamente: a membrana plasmática, a blastoderme e as células de cloreto embora este plano básico pode não ser regra para todos os embriões de teleósteos. De acordo com este modelo, o desenvolvimento da regulação iônica ocorre, a partir da eclosão, com as atividades das células de cloreto na superfície do corpo e, posteriormente, com a atividade dessas células no epitélio branquial e o desenvolvimento dos órgãos que auxiliam na osmorregulação como o intestino e rim (ALDERDICE, 1988). Conseqüentemente, durante o desenvolvimento embrionário e larval (com o final da absorção do saco vitelino) ocorre uma mudança no número e distribuição destas células (ROMBOUGH, 1999).

As células de cloreto são os locais de absorção ativa de íons (Na^+ , Ca^{2+} e Cl^-) em teleósteos de água doce e estas células são encontradas no epitélio do saco vitelino dos embriões e estão distribuídas na superfície corpórea nas formas larvais e no epitélio branquial (base da lamela secundária no epitélio do filamento), tendo também sido descrita no epitélio opercular, cavidades bucal, faringiana e no tegumento de alguns peixes (HWANG, 1990; EVANS, 1993).

Um dos mecanismos de proteção dos epitélios da superfície corporal e das brânquias em peixes é a secreção de uma camada de glicoproteínas e glicolípídeos pelas células mucosas (BURKHARD-HOLM, 1997). SABOIAS-MORAES et al (1996) avaliando os tipos de células mucosas em brânquias de guarú (*Poecilia vivpara*) verificou um aumento do número de células mucosas com a presença de fluor na água, e sugeriu a existência de uma adaptação destas células ao meio ambiente, pois não ocorreu mortalidade mesmo em altas concentrações de fluor (5 ppm). Dessa forma, o epitélio branquial mostra-se altamente sensível a variações ambientais do meio aquático, atendendo a uma necessidade funcional pela modificação quantitativa e constitutiva de suas células (BRESEGHELO et al., 2004).

As células mucosas em peixes são encontradas em sua maioria na superfície corporal e nas brânquias e são caracterizadas por possuir um grande número de vesículas citoplasmáticas contendo muco, cuja a secreção protege o epitélio em que esta inserida (HENRIKSON & MATOLTSY, 1968), podendo participar indiretamente na osmorregulação em larvas de teleósteos (VARSAMOS et al., 2005).

Em geral, a morfologia interna branquial é similar entre os teleósteos entretanto, a distribuição e o número de células que constitui o epitélio branquial podem apresentar diferenças em função das condições ambientais (FERNANDES, 1996). Muitos estudos têm investigado o fluxo de água e íons através do epitélio branquial com ênfase às adaptações morfológicas em função do ambiente externo (BINDON et al., 1994; FERNANDES et al., 1998), porém são raros os estudos sobre a distribuição das células mucosas e de cloreto e nos primeiros estágios de desenvolvimento dos peixes. Deve-se ressaltar que o entendimento das interações entre as variáveis químicas na qualidade da água e a regulação iônica é de fundamental importância para o cultivo de peixes, principalmente nas primeiras fases do desenvolvimento animal uma vez que pode afetar a sobrevivência das larvas e alevinos, pois estas são fases críticas, em que os peixes são suscetíveis às variações do meio por não

possuírem estruturas bem desenvolvidas que auxiliam na adaptação às novas condições ambientais.

A qualidade da água nos tanques de piscicultura é afetada dentre outros componentes químicos pelo pH e a dureza (WEDEMEYER, 1997). O uso de calcáreo em sistemas de cultivo de organismos aquáticos para aumentar a dureza e/ou pH da água pode ser constituído de concentrações diferentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} , nesses sistemas as concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} e o pH são fatores que podem aumentar a sobrevivência e o crescimento larval (SILVA et al., 2005).

O pH da água afeta profundamente a manutenção da homeostase (EVANS, 1993). A resistência de ovos e larvas de peixes de água doce em diferentes pHs apresenta interesse básico e aplicado. Alta ou baixa concentração de H^+ pode produzir alterações morfofisiológicas nas brânquias e na superfície corporal dos peixes (MCDONALD et al., 1991). Por exemplo, pHs ácidos resultam em alta taxa de mortalidade em peixes, pois afetam as junções paracelulares das células branquiais facilitando a perda de íons, além de estimular uma produção excessiva de muco, podendo prejudicar as trocas gasosas (WOOD et al., 1998). A abundância de células mucosas e de cloreto pode estar relacionada à concentração de íons do ambiente (LAURENT, 1984). O aumento do nível iônico da água (com sais de Ca^{2+} e Mg^{2+}) melhora a sobrevivência de peixes expostos a pHs ácidos (MCDONALD et al., 1980).

A dureza da água é determinada pelo conteúdo de sais de cálcio e de magnésio, estreitamente ligados aos íons carbonato (CO_3^-) e bicarbonato (HCO_3^-) (dureza temporária), e aos íons sulfato, cloretos e outros ânions de acidez mineral (dureza permanente) (ARANA, 1997). De acordo com BOYD (1998) as águas podem ser classificadas pelo grau de dureza: água mole- concentrações entre 0 – 75 mg L^{-1} CaCO_3 ; moderadamente dura- 75 – 150 mg L^{-1} CaCO_3 ; dura- 150 – 300 mg L^{-1} CaCO_3 ; 300 mg L^{-1} CaCO_3 ou mais, como água

extremamente dura. Este mesmo autor recomenda que o nível de dureza para a piscicultura seja acima de 20 mg L⁻¹ e MCDONALD & MILLIGAN (1997) sugerem uma dureza de 30 mg L⁻¹ CaCO₃.

Os peixes de água doce (hiperosmóticos em relação ao meio) podem absorver diretamente o Ca²⁺ e o Mg²⁺ da água pelas brânquias, ou via intestino através da alimentação (WURTS & DURBOROW, 1992; BALDISSEROTTO & MIMURA, 1995). O Ca²⁺ exerce um papel fundamental na regulação iônica porque influi na permeabilidade das membranas biológicas, evitando o fluxo difusivo e as altas perdas iônicas para a água (GONZAL et al., 1987; WURTS & DURBOROW, 1992; GONZALEZ, 1996). Estudos fisiológicos têm demonstrado que as células de cloreto são responsáveis pela absorção do Ca²⁺ nas brânquias dos peixes de água doce (HWANG et al., 1994). Contudo, o Mg²⁺ também pode influenciar no movimento iônico através da membrana celular atuando sobre a permeabilidade da membrana e sua principal via de absorção é o intestino, sendo as brânquias uma rota secundária de absorção, entretanto, não está ainda totalmente esclarecido esse mecanismo de absorção (BIJEVELDS et al., 1998).

Aparentemente, os efeitos da dureza da água sobre o crescimento em peixes variam de acordo com a espécie e a qualidade da água. Para espécies que são encontradas em ambiente natural de águas dura (ou moderadamente dura) essa característica é necessária para um bom desenvolvimento, enquanto que para espécies que naturalmente são encontradas em águas mole, a água dura pode ocasionar efeitos deletérios ou condições não adequadas ao cultivo (PARRA & BALDISSEROTTO, no prelo). Portanto, a avaliação da dureza e concentrações de Ca²⁺ e Mg²⁺ adequada ao desenvolvimento de cada espécie tornam-se necessárias (NADDY et al., 2002).

O estudo das células mucosas e de cloreto nos estágios embrionários (HWANG & HIRANO, 1985; VARSAMOS et al., 2005) e larvais em brânquias de teleósteos e seu papel

na sobrevivência animal em diferentes condições de pH e dureza do meio aquático é um campo de estudo em aberto (ROMBOUGH, 1999) e de grande importância no processo de adaptação e sobrevivência de embriões e larvas em ambiente natural e, conseqüentemente, em condições de cultivo.

Espécie *Rhamdia quelen*

O jundiá, *Rhamdia quelen* QUOY & GAIMARD, 1824 (Siluriformes, Teleostei) é uma espécie nativa das Américas Central e Sul e ocorre do sudeste do México ao centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Atualmente esta espécie é considerada da família Heptapteridae (FISH BASE, 2006). *Rhamdia quelen* possui coloração variando de marrom avermelhado a cinza escuro, três pares de barbilhões sendo um par no maxilar que é maior do que os dois pares mandibulares, e não apresentam dimorfismo sexual aparente, somente na época da reprodução (GOMES et al., 2000). O jundiá é considerado euritérmico, sendo os alevinos mais tolerantes que as larvas às variações de temperatura (CHIPPARI-GOMES et al., 1999, 2000) e estenoalino, pois os alevinos sobrevivem dentro de um estreito limite de concentração de sais na água (MARCHIORO & BALDISSEROTTO, 1999). Segundo LOPES et al (2001) a faixa de pH entre 8,0 e 8,5 é a que proporciona melhor sobrevivência e crescimento para as larvas de jundiá. FERREIRA et al (2000) mencionam que o jundiá possui uma ampla faixa de tolerância de pH (6,0 a 9,0) na fase de ovo e larva sendo que o pH 4,0 é letal para os ovos e o pH 5,0 é letal para as larvas. ZAIONS & BALDISSEROTTO (2000) indicam que a faixa de pH para um bom crescimento dos alevinos desta espécie está entre 5,0 a 9,0 na qual a diminuição do Na⁺ corporal é menor.

De acordo com SILVA et al (2003) a dureza da água de incubação e larvicultura do jundiá não deve ultrapassar 70 mg L⁻¹ CaCO₃, nas proporções de 80% de Ca²⁺ e 20% de Mg²⁺

(respectivamente em mg L^{-1} , $20,26 \text{ Ca}^{2+} : 2,89 \text{ Mg}^{2+}$). A faixa de dureza ideal para sobrevivência e crescimento de larvas desta espécie é de 20 a 70 mg L^{-1} de CaCO_3 apesar de não ocorrer mortalidade em 96 h de exposição dos alevinos de jundiá em pHs 4,0, 7,0 e 9,5 nas durezas de 30, 70, 150, 300 e 600 mg L^{-1} de CaCO_3 (TOWNSEND et al., 2001), indicando que o aumento da dureza melhora a sobrevivência dos alevinos em pHs extremos 3,75, 10,0 e 10,5. A dureza da água do ambiente natural em que se encontra esta espécie (Rio Vacacaí-Mirim na região de Santa Maria-RS) pode apresentar variações de 32 a 180 mg L^{-1} de CaCO_3 em pH neutro (MARTINS, 1994), sugerindo uma ampla variação no habitat natural, podendo prejudicar a sobrevivência em fases iniciais de larva.

Este peixe possui manejo relativamente fácil, apresentando boa aceitação no mercado consumidor, entretanto existe a necessidade de estudos sobre características biológicas desta espécie para aprimorar a sua produção (GOMES et al., 2000). Na tentativa de otimizar o cultivo de *Rhamdia quelen*, existem vários estudos sobre reprodução e aspectos de fisiologia reprodutiva (BOSSEMEYER, et al., 1980; NARAHARA et al., 1989; BARCELLOS et al., 2002), incubação (SILVA et al., 2003), larvicultura (LOPES et al., 2001; TOWNSEND et al., 2003; SILVA et al., 2003, 2005), alimentação (COLDEBELLA & RADÜNZ-NETO, 2002), crescimento de alevinos (TOWNSEND & BALDISSEROTTO, 2001; PIEDRAS et al., 2004), respostas ao estresse (BARCELLOS et al., 2001; BARCELLOS et al., 2006), bioquímicas e metabólicas (VIEIRA et al., 2004; LERMEN et al., 2004), parâmetros eritrocíticos (CAMARGO et al., 2005), toxicidade de herbicidas e metais (CRESTANI et al., 2006; LEAL et al., 2006), doenças e fisiologia (SHAMA et al., 2000; BRANDÃO & BOIJINK, 2001; BOIJINK & BRANDÃO, 2001; BELLO et al., 2000, MIRON et al., 2003), aspectos fisiológicos no transporte (GOLOMBIESKI et al., 2003), alternativa em policultivo (SILVA et al., no prelo) estudos sobre confinamento em tanque rede (BARCELLOS et al., 2004) dentre outros. Entretanto, não se tem acesso a estudos sobre morfologia, morfometria básica e

distribuição de células mucosas e de cloreto em fases iniciais de vida de *Rhamdia quelen* e a interação dos parâmetros ambientais sobre seu desenvolvimento.

A investigação morfológica e morfométrica, bem como o desenvolvimento e distribuição das células mucosas e de cloreto na faixa de pH neutro (pH 7,0, situação comumente encontrada em sistemas de cultivos e ambiente natural) e alcalino (pH 8,0, valor indicado como ideal para larvicultura desta espécie), são parâmetros morfofisiológicos importantes, pois, constituem um indicativo biológico de adaptação a determinados ambientes. As concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} , nas proporções de 100% Ca^{2+} :0 % Mg^{2+} e 80 % Ca^{2+} :20 Mg^{2+} para obtenção da dureza total de 70 mg L^{-1} de CaCO_3 , foram escolhidas por já terem sido determinado como as melhores proporções destes íons para o cultivo desta espécie durante a incubação, sobrevivência de larvas (100:0) e crescimento (80:20). SILVA et al., 2003 e 2005 verificaram várias proporções de Ca^{2+} : Mg^{2+} (100:0, 50:50, 80:20, 0:100) e sugerem alguns efeitos deletérios em larvas de jundiá somente com o aumento do Ca^{2+} e não do Mg^{2+} na água e que as larvas desta espécie toleram no máximo 20 mg L^{-1} Ca^{2+} na água, em dureza 70 mg L^{-1} CaCO_3 .

O desconhecimento da biologia e das exigências requeridas das espécies cultivadas, fundamentalmente das respostas morfofisiológicas relacionadas à qualidade da água, pode prejudicar a produção em aquicultura. Assim, este tipo de avaliação pode caracterizar um padrão de desenvolvimento morfofisiológico inclusive em relação a osmorregulação em ambientes diferenciados de cultivo.

Neste contexto, há necessidade da investigação da ontogenia inicial das respostas morfológicas e fisiológicas de peixes em ambientes próximos à neutralidade e alcalinos, em concentrações diferenciadas de Ca^{2+} e Mg^{2+} , para o melhor conhecimento da biologia de *Rhamdia quelen*, e com isto subsidiar estudos para o aprimoramento da produção desta espécie nativa.

Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- 1) descrever o padrão morfológico e morfométrico básico de desenvolvimento de embriões e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*;
- 2) identificar e avaliar a distribuição das células mucosas e de cloreto em embriões e larvas desta espécie;
- 3) avaliar o possível efeito do pH e da dureza da água em diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre a morfologia, morfometria e distribuição das células mucosas e de cloreto em embriões e larvas de jundiá;

Esta tese foi organizada em forma de capítulos, contendo uma introdução e objetivos gerais seguidos pelo Capítulo 1, referente à morfologia e morfometria de embriões e larvas, Capítulo 2, referente à distribuição de células mucosas em embriões e larvas, e o Capítulo 3 referente à distribuição de células de cloreto. Para uma síntese geral integrada do trabalho esta tese foi finalizada com conclusões gerais e considerações finais.

Referências Bibliográficas

ALDERDICE, D. F. Osmotic and ion regulation in teleost eggs and larvae. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish Physiology XI the physiology of developing fish**. Part-A eggs and larvae. ed. San Diego: Academic Press, 1988. p. 163-251.

ARANA, L. V. **Princípios Químicos de Qualidade da Água em Aquicultura uma Revisão para Peixes e Camarões**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1997. 166p.

BALDISSEROTTO, B.; MIMURA, O. M. Ion and water transport in the gut of the freshwater teleost *Prochilodus scrofa*. **Ciência e Cultura** (J. of the Braz. Assoc. for the Adv. of Sci.), v.47, p.83 – 85, 1995.

BARCELLOS, L. J. G.; WOHL, V. M.; WASSERMANN, G. F.; KRIEGER, M. H.; QUEVEDO, R. M.; LUTHIER, F. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture

and tank transference *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard), a south american catfish. **Aquaculture Research**, v.32 n.3, p.123-125, 2001.

BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOEHL, V. M.; LUTHIER, F.; QUEVEDO, R. M.; ITTZÉS, I.; KRIEGER, M. H. Plasma steroids concentrations in relation to reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen* . **Journal of Fish Biology**, v. 61, n.3, p. 751-763, 2002.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; FIOREZE, I.; CERICATO, L.; SOSO, A. B., FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; BALDISSERA, R. K.; BRUSCHI, A.; RITTER, F. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture** v.232, p. 383-394, 2004.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, v.253, n. 1-4, p. 317-321, 2006.

BELLO, A. R.; Fortes, E.; Bello-Klein, A.; Bello, A. A.; Llesuy, S. F.; Robaldo, R. B.; Bianchini, A. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Dis. Aquat. Org.** v.42 n.3, p.233-236, 2000.

BENGSTON, D. A. Aquaculture of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): status of knowledge, current research and future research priorities. **Aquaculture**, v.176, p. 39-49, 1999.

BIJEVELDS, M. J. C.; VAN DER VELDEN, J. A.; KOLAR, Z., FLIK, G. Magnesium transport in freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v.201, p.1981 – 1998, 1998.

BINDON, S. D.; FENWIK, J. C.; PERRY, S. F. Branquial chloride cell proliferation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* implications of gas transfer. **Canadian Journal of Zoology**, v.72, p.1395-1402, 1994.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de Jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.31, n. 3; p.503- 507, 2001.

BOSSEMEYER, I. M. K.; HALL, G. A. B. Determinação da época de desova e maturação do jundiá, *Rhamdia sapo*, baseado no IGS e em estudos morfofocitológicos das gônadas. **Ciência e Natura**, v.2, p.133- 135, 1980.

BOYD, C. E. **Water Quality for Pond Aquaculture**. Research and Development. n.43, August, 1998. 36 p.

BRANDÃO, D. A.; BOIJINK, C. L. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v.31, n. 4; p.687- 690, 2001.

BRESEGHELO, L.; CARDOSO, M. P.; BORGES-DEOLIVEIRA, R.; COSTA, M. F.; BARRETO, J. C. B.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; YAMADA, Á. T. Effects of sodium fluoride in gill epithelium of Guppy fish (*Poecilia vivipara*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p.274-280, 2004.

BURKHARD-HOLM, P. Lectin histochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill and skin. **Histochemistry Journal**, v.29, p. 893-899, 1997.

CAMARGO, S. O. POUHEY, J. L.; MARTINS, C.. Parâmetros eritrocitários do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido à dieta com diferentes níveis de proteína. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1406-1411, 2005.

CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperatures for silver catfish, *Rhamdia quelen*, *fingerlings*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 4, p.11-21, 1999.

CHIPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperature for *Rhamdia quelen* larvae (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, p.1069-1071, 2000.

COLDEBELLA, I. J.; RADÜNZ NETO, J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v.32, n.3, p.499-503, 2002.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L. MIRON, D. S.; LAZZARI, R.; DUARTE, M. F.; MORSCH, V. M.; PIPPI, A. L.; VIEIRA, V. P. Effects of Clomazone Herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicological and environmental safety**, no prelo, 2006.

EVANS, D. H. Osmotic and ionic regulation. In: **The physiology of fishes**. CRC Press: 1993, p.315-341.

FERNANDES, M. N. Morpho-functional adaptations of gills in tropical fish. In: VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V.; RANDALL, D. J. **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Manaus: Instituto Nacional pesquisas da Amazônia, 1996. p. 181-190.

FERNANDES, M.N.; PERNA, S.A.; MORON, S.E. Chloride cell apical surface changes in gill epithelia of the armoured catfish *Hypostomus plecostomus* during exposure to distilled water. **Journal of Fish Biology**, v.52, p.844-849, 1998.

FERREIRA, A. A.; NUNER, A. P. O.; ESQUIVEL, J. R. Influência do pH e da temperatura sobre os ovos e as larvas do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae). Florianópolis, **Anais Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**, Sociedade Brasileira de Aqüicultura. Florianópolis, 2000.

FISH BASE. (<http://www.fishbase.org>), 2006.

GOLOMBIESKI, J. I.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B.; DA SILVA, J. H. S. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. **Aquaculture**, v. 216, n.1-4, p.95-102, 2003.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; CHIPPARI GOMES, A. R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE). Uma revisão. **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.179-185, 2000.

GONZAL, A. C.; ARALAR, E. V.; PAVICO, J. M. The effects of water hardness on the hatching and viability of silver carps (*Hypophthalmichthys molitrix*) eggs. **Aquaculture**, v.64, p.111-118, 1987.

GONZALEZ, R. J. Ion regulation in ion poor waters of low pH. In: VAL, A. L.; ALMEIDA – VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1996. 420 p.

HENRIKSON, R. C.; MATOLTSY, A. G. The fine structure of teleost epidermis: Mucus cell. **Journal Ultrastructure Research**, v.21, p.213-221, 1968.

HWANG, P. P.; HIRANO, R. Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages of teleost development. **Journal of Experimental Zoology**, v.236, p.115-126, 1985.

HWANG, P. P., Salinity effects on development of chloride cells in the larvae of ayu (*Plecoglossus altivelis*). **Marine Biology**, v.107, p.1-7, 1990.

HWANG, P. P.; TSAI, Y. N.; TUNG, Y. C. Calcium balance in embryos and larvae of the freshwater adapted teleost, *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.13, p.325-353, 1994.

LAURENT, P. Gill international morphology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Gills, Fish Physiology**. eds.v. 10. London: Academic Press.1984.

LEAL, R. B.; RIBEIRO, S. J.; POSSER, T. F.; CORDOVA, M.; RIGON, A. P.; ZANIBONI FILHO, E.; BAINY, A. C. D. Modulation of ERK1/2 and p38^{MAPK} by lead in the cerebellum of Brazilian catfish *Rhamdia quelen*. **Aquatic Toxicology**, v.77, n.1, p. 98-104, 2006.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, C. M. R.; BALDISSEROTTO, B.; MORAES, G.; MORSCH, V. M. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.239, p. 497-507, 2004.

LOPES, J. M.; SILVA, L. V. F.; BALSISSEOTTO, B. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. **Aquaculture International**, v.9, n.1, p. 73-80, 2001.

MARCHIORO, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural** (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science), v. 29, p. 315-318, 1999.

MARTINEZ, G. M.; BOLKER, J. A. Embryonic and staging of summer flounder (*Paralichthys dentatus*). **Journal of Morphology**, v.255, p.162-176, 2003.

MARTINS, E.L.A. **A degradação ambiental de um trecho do Rio Vacacaí – Mirim**. 1994. 116f. Monografia (Curso de Licenciatura em Geografia). Universidade Federal de Santa Maria, 1994.

MCDONALD, D. G.; HOBE, H.; WOOD, C. M. The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. **Journal of Fish Biology**, v.88, p.109-131, 1980.

MCDONALD, D. G.; FREDA, J.; CAVDEK, V.; GONZALEZ, R.; ZIA, S. Interspecific differences in gill morphology of freshwater fish in relation to tolerance of low-pH environments. **Physiological Zoology**, v.102, p.124-144, 1991.

MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. **Fish Stress and Health in Aquaculture**. Cambridge, 1997. 278p.

MIRON, D., SILVA, L. V. F., GOLOMBIESKI, J. I., BALDISSEROTTO, B. Efficacy of different salt (NaCl) concentration in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* infected silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal Applied Aquaculture**, v.14, n.1/2, p.155-161, 2003.

NADDY, R. B.; STUBBLEFIELD, W. A.; MAY, J. R.; TUCKER S. A.; RUSSELL. H. The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.2, p.347-352, 2002.

NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Tipo de desova e fecundidade do bagre, *Rhamdia hilarii* (VALENCIENNES, 1840) (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) **Boletim Instituto de Pesca**, v.16, n. 1; p.37- 45, 1989.

OJANGUREN, A. F.; BRAÑA, F. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. **Journal of Fish Biology**, v.62, p.580-590, 2003.

PARRA, J. E. G.; BALDISSEROTTO, B. Effect of water hardness on survival and growth of freshwater teleost. In: BALDISSEROTTO, B.; MANCERA, J. M.; KAPOOR, B. G. **Fish Osmoregulation**. Eds.Enfield, USA: Science publisher, no prelo.

PIEDRAS, S. R. N.; MORAES, P. R. R.; POUHEY, J. L.O. F. Crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), de acordo com a temperatura da água. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.3, n.2, p.177 - 182, 2004.

ROUMBOUGH, P. J. The gill of fish larvae. Is it primarily a respiratory or an ionoregulatory structure?. **Journal of Fish Biology**, v.55, p.186-204, 1999.

SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; HERNANDEZ BLASQUEZ, F. J.; MOTA, D. L.; BITTENCOURT, A. M. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryaline fish *Poecilia vivipara*. **Journal of Fish Biology**, v.49, p. 545-548, 1996.

SHAMA, S.; BRANDÃO, D. A.; VARGAS, A. C. Ocorrência de bactérias com potencial patogênico em jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistemas semi-intensivo. **Ciência Rural**, v.30, n. 2; p.293- 298, 2000.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia***. Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, 1996. Swedish Museum of Natural History. Stockholm. 156p.

SILVA, L. B.; BARCELLOS, L. J.; QUEVEDO, R. M.; SOUZA, S. M. G.; KREUTZ, L. C.; RITTER, F.; FINCO, J. A.; BEDIN, A. C. Alternative species for traditional carp polyculture in southern South America: Initial growing period. **Aquaculture**, no prelo (2006).

SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I.; BALDISSEROTTO, B. Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. **Aquaculture**, v. 228, p. 279-287, 2003.

SILVA, L. V. F., GOLOMBIESKI, J. I., BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of silver catfish, *Rhamdia quelen*, (Pimelodidae) larvae at different calcium and magnesium concentrations. **Neotropical Ichthyology**, v.3, n.2, p. 299-304, 2005.

TOWNSEND, C. R., BALDISSEROTTO, B. Survival of silver catfish fingerlings exposed to acute changes of water pH and hardness. **Aquaculture International**, v.9, p.413-419, 2001.

TOWNSEND, C. R.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* exposed to different levels of water hardness. **Aquaculture**, v.215, p.103-108, 2003.

VARSAMOS, S.; NEBEL, C.; CHARMANTIER, G. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.141A, p.401-429, 2005.

VIEIRA, V. P.; MORSCH, V. M.; LERMEN, C. L.; CISMOSKI, A. S.; TABALDI, L. A.; SCHETINGER, C. M. R. ATP and ADP hydrolysis in the kidney and liver of fish, chickens and rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.139 B, p.713-720, 2004.

WEDEMEYER, G. A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge 1997. 278p.

WOOD, C. M.; WILSON, R. W.; GONZALEZ, R. J.; PATRICK, M. L.; BERGMAN, H. L.; NARAHARA, A.; VAL, A. L. Response of an Amazonian Teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water. **Physiological Zoology**, v. 71, n. 6, p.658-670, 1998.

WURTS, W. A.; DURBOROW, R. M. Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds. **Aquaculture Program- SRAC publication**, 1992. 464 ed. 4 p.

ZAIONS, M. I; BALDISSEROTTO, B. Níveis corporais de Na⁺ e K⁺ e sobrevivência de alevinos de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) submetidos a variações agudas do pH da água. **Ciência Rural**, v. 30, p. 1041-1045, 2000.

CAPÍTULO 1

MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen* (HEPTAPTERIDAE, TELEOSTEI). INTERAÇÃO DO pH E CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO E MAGNÉSIO NA ÁGUA

Resumo

O ambiente de cultivo pode influenciar nas características morfológicas e morfométricas dos estágios iniciais de desenvolvimento em peixes. O objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia e morfometria de embriões e larvas de jundiá e avaliar a interação com o ambiente de cultivo, em pH neutro e alcalino com a alteração da dureza da água (em diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+}). Após a fertilização os ovos foram mantidos em água com pH 7,0 e 8,0 com 3 diferentes concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} da água (mg L^{-1}): dureza 20 mg L^{-1} CaCO_3 (5,0 Ca^{2+} : 2,08 Mg^{2+} , controle) e dureza 70 mg L^{-1} CaCO_3 (20 Ca^{2+} :5,59 Mg^{2+} e 23 Ca^{2+} : 2,08 Mg^{2+}) a $24\pm 1^\circ\text{C}$. Foram observados os parâmetros de produção referente à percentagem de fertilização, eclosão, sobrevivência após eclosão, sobrevivência final, peso e comprimento. Os ovos (24 horas após fertilização-hpf) e larvas de 6-48 h (a cada 6 horas) e 216 h após eclosão (hpe) foram coletadas para avaliação quanto a caracteres de morfológicos e morfométricos associados à visão (presença do olho), alimentação (desenvolvimento e funcionalidade do trato digestivo) e habilidade natatória (presença das nadadeiras). Em pH 8,0 a percentagem de fertilização, eclosão, sobrevivência após eclosão, sobrevivência final, peso e comprimento (em 48 e 216 hpe) foram maiores que em pH 7,0 e não houve diferença significativa em relação às concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} . Os resultados sugerem que o pH 8,0 é indicado para o cultivo de larvas de *Rhamdia quelen*, e o aumento da dureza da água para 70 mg L^{-1} CaCO_3 , principalmente nas concentrações de 20 mg L^{-1} de Ca^{2+} e 5,59 mg L^{-1} de Mg^{2+} , que favorece o aumento da área corporal total das larvas em ambos pHs. O desenvolvimento morfológico ao longo do tempo de 6-216 hpe é considerado como período crítico, ressaltando o início da alimentação exógena (48 hpe). Estas informações são importantes para pesquisadores e/ou produtores, no aprimoramento de técnicas de manejo nas fases iniciais de vida de *Rhamdia quelen* contribuindo para o estudo biológico desta espécie em ambiente de cultivo.

Introdução

O estudo da ontogenia inicial e desenvolvimento em peixes permite uma ampla base de dados para estudos comparativos como processos de formação citológica seguindo a

fertilização, desenvolvimento dos órgãos e organização morfológica (BALON, 1990). A morfogênese e diferenciação são processos rápidos e complexos durante a ontogenia, pois quando as larvas eclodem ocorrem mudanças na forma do corpo, morfologia, metabolismo, habilidade natatória e no comportamento, relacionada à transformação das fases larvais, juvenis para a fase adulta (GISBERT et al., 2002). Geralmente os estágios de descrição morfológica são baseados no aparecimento e desenvolvimento de caracteres morfológicos específicos como: mandíbula, notocorda, tubo digestivo e filamentos branquiais, porque estes refletem diretamente o grau de desenvolvimento (MARTINEZ & BOLKER, 2003).

Estudos sobre desenvolvimento morfológico e padrões de crescimento para fases iniciais de vida dos peixes são importantes para o manejo das espécies em aquicultura (BENGSTON, 1999). A investigação da morfologia e de taxas de sobrevivência de ovos e embriões pode estimar a proporção de embriões anormais e com isto identificar a viabilidade do cultivo (SHIELDS et al., 1997; KJORSVIK et al., 2003). O reconhecimento do padrão normal de desenvolvimento e a detecção de defeitos durante a formação podem melhorar as técnicas no cultivo de larvas através da modificação de parâmetros ambientais e práticas de alimentação (GISBERT et al., 2002).

O pH e dureza da água (Ca^{2+} e Mg^{2+}) são variáveis ambientais que podem influenciar no cultivo de peixes. Vários estudos têm demonstrado que o aumento da dureza e do pH da água melhoram a sobrevivência de algumas espécies de peixes (MCDONALD et al., 1980, LOPES et al., 2001) principalmente durante os primeiros estágios de desenvolvimento (GONZAL et al., 1987; KETOLA et al., 1988; TUCKER & STEEBY, 1993; MOLOKWU & OKPOKWASILI, 2002). O Ca^{2+} e Mg^{2+} são os principais constituintes da dureza da água e possuem papel fundamental na regulação iônica reduzindo a permeabilidade das membranas biológicas e, conseqüentemente, o fluxo difusivo de íons para o meio aquático (GONZAL et al., 1987, WURTS & DURBOROW, 1992, GONZALEZ, 1996, VAN DER VELDEN et al.,

1990). Portanto, mudanças no pH e/ou concentração de íons podem proporcionar alterações fisiológicas nos estágios iniciais de desenvolvimento (ALDERDICE, 1988).

Muitos estudos na aqüicultura estão relacionados estritamente ao comprimento e peso dos animais, mas não mostram relações com o desenvolvimento. A morfologia pode ser um indicador extremamente útil para melhoria das técnicas, principalmente em função de características morfométricas associada com habilidade natatória, visão e alimentação (GISBERT et al, 2002).

O jundiá, *Rhamdia quelen* é uma espécie economicamente importante no Brasil, ocorre do Sul do México à Argentina Central. A produção desta espécie pode ser uma alternativa para regiões com clima temperado e subtropical (GOMES et al., 2000; BARCELLOS et al., 2001). Este peixe é onívoro, com maturidade sexual no primeiro ano de vida, são ovulíparos, e em ambiente natural a desova ocorre em águas calmas, limpas e com fundo pedregoso. Não possui cuidado parental. Esta espécie mostra dois picos reprodutivos por ano (primavera e verão) com múltiplas desovas. O desenvolvimento embrionário é rápido e o desenvolvimento larval ocorre em 3-5 dias (GOMES et al., 2000). Existem alguns estudos sobre fisiologia reprodutiva (BARCELLOS et al., 2001), incubação (SILVA et al., 2003) e larvicultura em diferentes pHs e durezas de água (LOPES et al., 2001, TOWNSEND et al., 2003, SILVA et al., 2003, 2005) dentre outros. Entretanto, não há estudos sobre a morfologia e a morfometria de fases iniciais de vida de *Rhamdia quelen* e a influência de parâmetros ambientais sobre o desenvolvimento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia e morfometria de embriões e larvas de jundiá e avaliar a possível interação com o ambiente de cultivo, em pH neutro e alcalino com a alteração da dureza da água (em diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+}).

Materiais e métodos

Os ovos de jundiá foram obtidos de desovas induzidas com uma injeção única de extrato hipofisário de carpa (fêmeas = 5 mg.kg⁻¹ e machos = 3 mg.kg⁻¹, de acordo com LEGENDRE et al (1996) em fevereiro-2002 e março-2003 no setor de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria-RS. As análises posteriores ao cultivo foram feitas no laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da Universidade Federal de São Carlos-SP.

Após a fecundação artificial os ovos foram submetidos a dois experimentos: I) pH neutro (7,0) e II) alcalino (8,0) a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, temperatura adequada para da espécie (CHIPARI-GOMES et al., 2000). Em cada experimento os ovos e larvas foram expostos a 3 tratamentos (mg L⁻¹): 20 Ca²⁺ e 5,59 Mg²⁺ e 23 Ca²⁺ e 2,08 Mg²⁺, com dureza 70 mg L⁻¹ CaCO₃ e 5,0 Ca²⁺ e 2,08 Mg²⁺ (controle), sendo a água de abastecimento do laboratório, com dureza 20 mg L⁻¹ CaCO₃.

Cada tratamento possuiu três unidades experimentais/tratamento, totalizando nove incubadoras (4 L) e nove caixas de cultivo para larvas (40 L), mantidas com aeração artificial constante e sistema de cultivo fechado.

A água de abastecimento das incubadoras e caixas foi previamente preparada em tanques com a adição de CaCl₂ e/ou MgCl₂ para manutenção da dureza e proporção de Ca²⁺ e Mg²⁺ desejadas e o pH foi ajustado com fosfato de sódio monobásico (0,05M). O monitoramento do pH da água foi feito três vezes ao dia (Quimis, Q-400 A). A concentração de oxigênio dissolvido foi medida diariamente com oxímetro (YSI- modelo Y5512), a concentração de amônia total foi determinada utilizando o método de nesslerização e a amônia não ionizada foi calculada de acordo com PIPER et al (1982), a alcalinidade foi determinada por titulometria (precisão 4,0 mg L⁻¹ CaCO₃) (GREENBERG et al., 1976). A

concentração de Na^+ e K^+ em cada tratamento foram medidas em um fotômetro de chama (Digimed modelo DM-61).

A densidade de estocagem de ovos e larvas foi de 600 ± 200 ovos l^{-1} e 10 larvas l^{-1} , respectivamente. A percentagem de fertilização foi calculada por volumetria e as percentagens de eclosão (E) e sobrevivência larval após a eclosão (SAE) foram calculadas como descrito por GEERTZ HANSEN & RASMUSSEN (1994) e SILVA et al (2003). O peso corporal e comprimento total médio das larvas foram medidos em 48 e 216 hpe e a sobrevivência final das larvas (%) em 216 h após eclosão. Durante o período experimental de 7 dias, e após absorção do saco vitelínico as larvas receberam alimentação artificial com ração para larvas de jundiá descrita por SILVA et al (2005).

Os ovos e larvas foram anestesiados com benzocaína (0,1%) e coletados 24 h pós-fertilização (hpf) (fase de embrião) e as larvas a cada 6 h após a eclosão (hpe) (durante a absorção do saco vitelínico) até a fase da primeira alimentação exógena (48 hpe) e 216 hpe (9 dias após eclosão ou 7 dias de larvicultura).

Após a coleta dos ovos e larvas (5 amostras/3 repetição/tratamento), foram fixados em 2,5% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, a 4 °C por 24h. Após a fixação, as amostras foram armazenadas em glutaraldeído 0,5% para posterior análise em estereomicroscópio (Zeiss -Stemi SV6) e aquisição de imagens da morfologia com câmera digital Samsung (Scc-131A). As amostras foram analisadas quanto a caracteres morfológicos e morfométricos associados à visão (presença do olho), à alimentação (desenvolvimento e funcionalidade pela observação da passagem do alimento no trato digestivo) e à habilidade natatória (presença das nadadeiras) como sugerido por GISBERT et al (2002), e também quanto à presença dos barbilhões e aparecimento de estruturas relacionadas à osmorregulação como: brânquias, rim e intestino. Cortes histológicos (3 μm , perfil sagital de 5 cortes/animal

incluídos em historesina, corados com azul de toluidina e fucsina básica) foram efetuados para confirmar a presença das brânquias, rim e intestino e abertura do poro urogenital.

Os caracteres morfométricos básicos como: área corporal total, área do saco vitelínico, comprimento total, comprimento da cauda, altura da cabeça e diâmetro do olho (Figura 1) foram medidos digitalmente (por “digital pad”, pelo Programa Image Pro-Plus) utilizando um estereomicroscópio (Leica- CLS 150) com câmera digital acoplada (SONY- CCD-Iris). Todos os caracteres morfométricos analisados foram relacionados às fases de desenvolvimento (24 hpf, 6-216 hpe) por funções lineares ($y=a+bx$, y = variável morfométrica e x = fase de desenvolvimento) e funções potenciais ($y= aT^b$, a = coeficiente, T = fase de desenvolvimento, b = coeficiente de crescimento). As relações dos caracteres alométricos com a variável do comprimento total foram ajustadas pela expressão potencial $y= aCT^b$, onde CT = comprimento total, y = comprimento da cauda, altura da cabeça ou diâmetro do olho) e os dados de área do saco vitelínico foi analisado em função da área corporal total ($y= aAT^b$, quando y = saco vitelínico). Todas as medidas de comprimento foram feitas sob linhas perpendiculares ou paralelas ao eixo horizontal do corpo. As medidas de estimativa de área foram feitas através de perímetro percorrido (área total e área do saco vitelínico).

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). O delineamento estatístico utilizado para as comparações foi inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 3x2 (tratamentos e pHs) com três repetições utilizando a análise de variância (ANOVA “Two way”). Sempre que diferenças foram detectadas foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância $p < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o “software” ESTAT (v.2.0). As relações morfométricas em função do tempo para as comparações de “b” entre os pHs foram feitas através de teste t ($p < 0,05$).

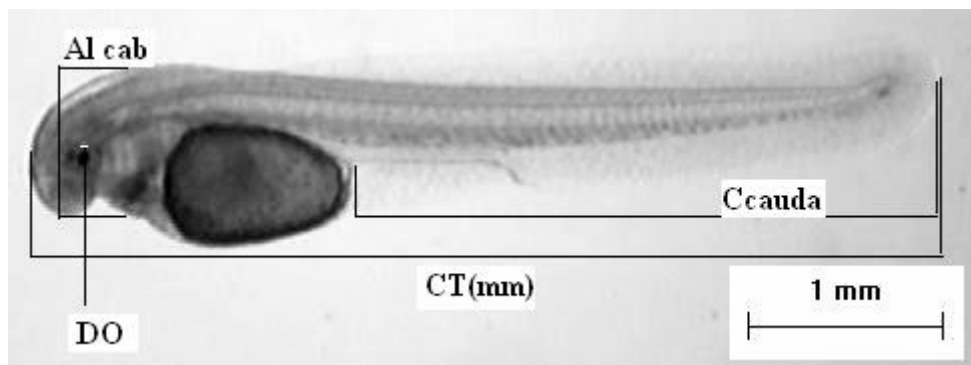


Figura 1- Larva de jundiá (*Rhamdia quelen*) 6 hpe (controle-pH 8,0). Variáveis morfométricas: comprimento total (CT): comprimento da cauda (Ccauda), altura da cabeça (Alt cab), diâmetro do olho (DO).

Resultados

Durante todo o período experimental a temperatura (23-24°C), alcalinidade total (20-30 mg l⁻¹ CaCO₃) e as concentrações de oxigênio dissolvido (6,7-7,2 mg L⁻¹), amônia total (0,2-0,8 mg L⁻¹), potássio (1,5-1,6 mg L⁻¹) e sódio (27,4-28,1 mg L⁻¹) da água não apresentaram diferença significativa entre os pHs e concentrações Ca²⁺: Mg²⁺ analisados.

As percentagens de fertilização, eclosão, sobrevivência após eclosão, sobrevivência final (Tabela 1) e os valores de peso e comprimento total das larvas nos períodos de 48 e 216 hpe (Tabela 2) foram maiores em pH 8,0 e não houve diferença significativa em relação às concentrações de Ca²⁺ e Mg²⁺ utilizadas em ambos pHs.

Tabela 1- Percentagem de fertilização (Fe), eclosão (E), sobrevivência após eclosão (SAE) e sobrevivência final (SF) de larvas de *Rhamdia quelen* em pH 7,0 e 8,0 e diferentes concentrações de Ca²⁺ e Mg²⁺ da água. média ± EPM.

pH	Ca ²⁺ :Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)	Fe	E	SAE	SF
	7,0	5,0:2,08 ¹	97,50±0,30	19,53±4,99	14,60±4,74
20,0:5,59 ²		98,60±0,25	19,93±2,23	19,30±4,81	33,87±5,40
23,0 :2,08 ²		95,71±1,80	17,57±0,74	12,50±1,25	37,43±4,53
pH	Ca ²⁺ :Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)	Fe	E	SAE	SF
	8,0	5,0:2,08 ¹	98,1±0,01*	60,70±7,76*	53,03±9,85*
20,0:5,59 ²		98,7±0,01*	60,73±2,57*	58,80±2,43*	89,00±2,72*
23,0 :2,08 ²		98,1±0,01*	56,47±2,48*	51,20±3,64*	92,40±2,07*

Dureza da água- ¹ 20 mg L⁻¹ CaCO₃ (controle), ² 70 mg L⁻¹ CaCO₃ (com variação da concentração de Ca²⁺:Mg²⁺ (mg L⁻¹)). * indica diferença significativa em relação ao pH 7,0 (p<0,05).

Tabela 2- Peso corporal e comprimento total de larvas de *Rhamdia quelen* 48 e 216 h após eclosão cultivadas em pH 7,0 e pH 8,0 e diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} da água. média \pm EPM.

	$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L ⁻¹)	Peso (mg)	Comprimento (mm)
pH 7,0		48 h após eclosão	
	5,0:2,08 ¹	1,56 \pm 0,09	5,23 \pm 0,03
	20,0:5,59 ²	1,37 \pm 0,23	5,31 \pm 0,09
	23,0 :2,08 ²	1,57 \pm 0,11	5,34 \pm 0,13
		216 h após eclosão	
	5,0:2,08 ¹	3,30 \pm 0,06	5,20 \pm 0,09
20,0:5,59 ²	3,90 \pm 0,02	5,30 \pm 0,00	
23,0 :2,08 ²	3,20 \pm 0,02	5,50 \pm 0,26	
pH 8,0		48h após eclosão	
	5,0:2,08 ¹	1,76 \pm 0,13*	5,06 \pm 0,14*
	20,0:5,59 ²	2,32 \pm 0,09*	5,18 \pm 0,13*
	23,0 :2,08 ²	1,84 \pm 0,22*	5,25 \pm 0,09*
		216 h após eclosão	
	5,0:2,08 ¹	4,13 \pm 0,28*	6,60 \pm 0,20*
20,0:5,59 ²	5,61 \pm 0,73*	6,51 \pm 0,04*	
23,0 :2,08 ²	6,18 \pm 1,17*	6,27 \pm 0,12*	

Dureza da água-¹ 20 mg L⁻¹ CaCO₃ (controle), ² 70 mg L⁻¹ CaCO₃ (com variação da concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L⁻¹). * indica diferença significativa em relação ao pH 7,0 (p<0,05).

O desenvolvimento morfológico mostrou um padrão durante os experimentos independentemente do pH e dureza (Figuras 2 e 3). Embriões de jundiá (24 hpf) apresentaram definição da cabeça, saco vitelínico e somitos. Com 27-36 hpf (24°C) as larvas eclodiram, e com 6 hpe verificou-se a presença de várias estruturas importantes para o desenvolvimento como: boca e cavidade branquial abertas, brânquias rudimentares, olho pigmentado, rim, intestino rudimentar, esboço dos barbilhões, membrana da cauda que auxilia na natação. Em 12-18 hpe as estruturas tornaram-se cada vez mais desenvolvidas. Em 24 hpe, observaram-se os barbilhões mandibulares (2 pares) e maxilares (1 par). 30 hpe o tubo digestivo mostrou-se mais definido (sugerindo o aparecimento do estômago) e com poro urogenital aberto. Em 36 hpe evidenciou-se maior pigmentação do tegumento. Entre 6-48 hpe ocorreu a absorção do saco vitelínico.

Em 48 hpe observou-se maior desenvolvimento de todas estruturas, principalmente trato digestivo. A redução do saco vitelínico foi praticamente total, e com isto foi oferecida a primeira alimentação exógena. Em 216 hpe, todas as características observadas estavam mais

desenvolvidas, exceto para o saco vitelínico ausente. Dentre as características mais desenvolvidas acima, destacou-se as brânquias (com a presença das lamelas), trato digestivo funcional e as nadadeiras peitorais, indicando que as larvas com 216 hpe possuem as principais estruturas para um bom desenvolvimento e que as mantém mais viáveis e portanto, favorecendo o cultivo em tanques.

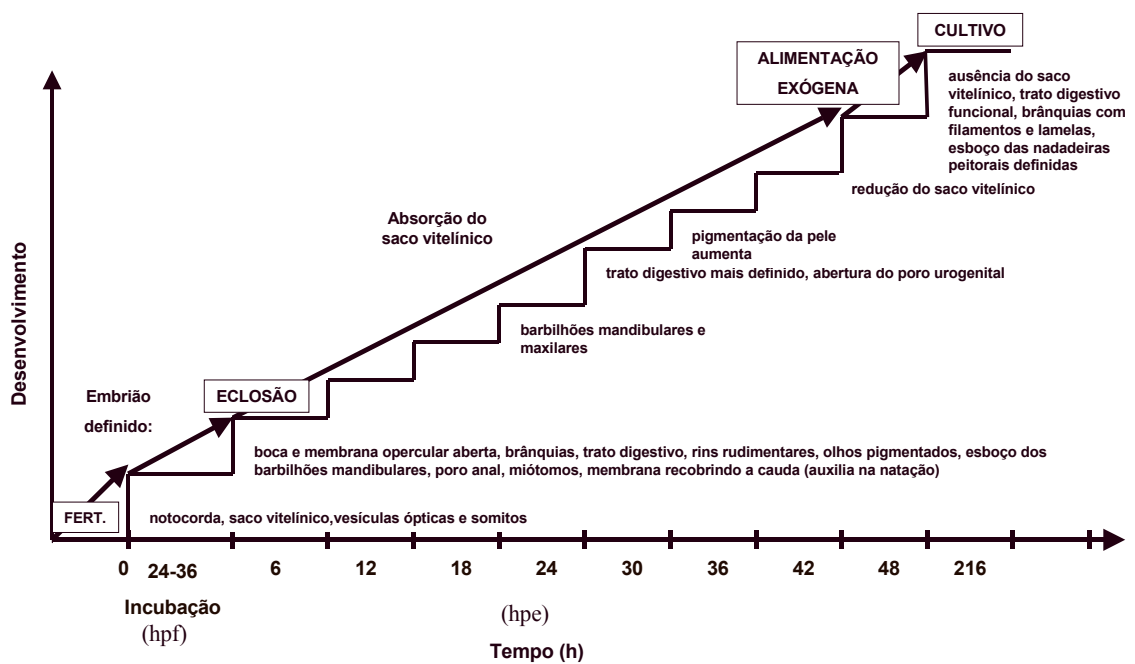


Figura 2- Esquema do desenvolvimento morfológico de embriões e larvas de Jundiá (*Rhamdia quelen*) em função do tempo: 24-36 h após fertilização (hpf) e 6-216 h após eclosão (hpe).

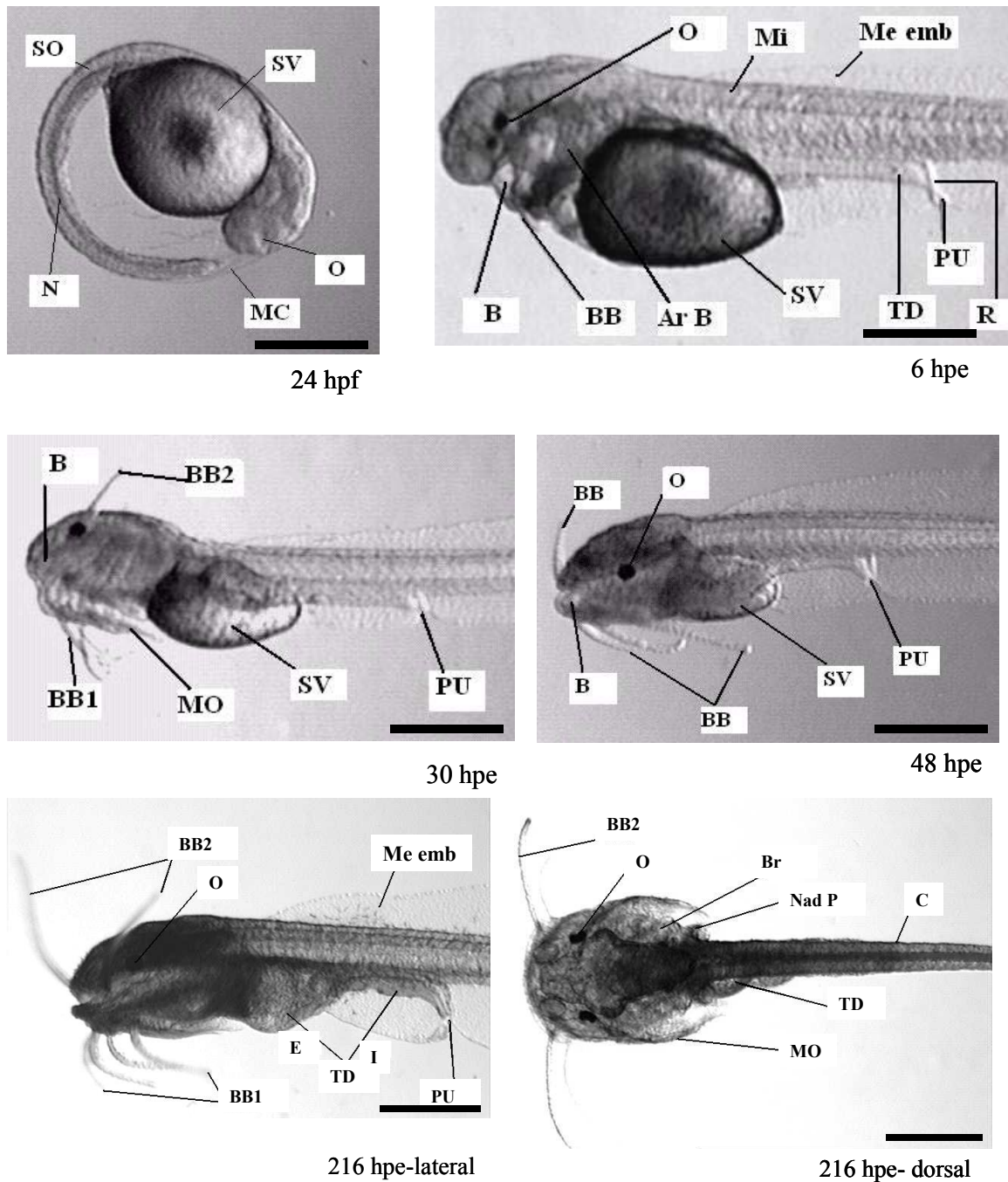


Figura 3- Desenvolvimento morfológico de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*): embrião- 24 h após fertilização (hpf); larvas 6, 30, 48 e 216 h após eclosão (hpe). MC, membrana coriônica; N- notocorda, SV-saco vitelínico, O- olho, SO- somitos, B-boca, BB- barbilhão (BB1- mandibular, BB2- Maxilar), Ar B- arco branquial, Me emb- membrana embrionária, MO- membrana do opérculo, Mi- miótomo, TD- trato digestivo, E- estômago, I- intestino, R- rim, PU-poro urogenital, Nad P- nadadeira peitoral. Escala= 1mm.

Morfometria básica no desenvolvimento embrionário e larval em função do ambiente de cultivo:

A área total do ovo, área do saco vitelínico, diâmetro do ovo e altura da cabeça de embriões *Rhamdia quelen* 24 hpf não foram significativamente diferentes em relação aos pHs e as concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (Tabela 3).

Em larvas após eclosão também não foi observada diferença significativa das variáveis morfométricas até 30 hpe em função das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ na água. Entretanto, quando se considera o pH da água, a área corporal total das larvas foi maior em pH 8,0 em 30, 36 e 216 hpe.

Contudo, em 48 hpe, as larvas cultivadas com o aumento do Ca^{2+} e Mg^{2+} (20 $\text{Ca}^{2+}:$ 5,59 Mg^{2+} , mg L^{-1}) (dureza 70 mg L^{-1} CaCO_3) apresentaram área corporal maior que o controle. Em 216 hpe as larvas cultivadas com o aumento da dureza da água (70 mg L^{-1} CaCO_3) foram maiores do que o controle, independente das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$. Todavia a área corporal das larvas cultivadas em pH 8,0 foi maior que em pH 7,0 (Tabela 4).

A área do saco vitelínico foi significativamente menor em pH 8,0, entre 6-48 hpe, independente das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$. Este fato indicado também pelo coeficiente linear (“b”) mais negativo, sugerindo maior consumo de vitelo ao longo do tempo quando comparado ao pH 7,0. Em 48 hpe ocorreu interação entre o pH 7,0 e as concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$, e o aumento da dureza resultou em uma diminuição da área do saco vitelínico, possivelmente indicando maior consumo (Figura 4A). O saco vitelínico não foi observado em 216 hpe em ambos pHs (Tabela 5, Figura 4B).

O comprimento total das larvas foi maior em pH 8,0 nas fases de 12-18 hpe e 48-216 hpe, independente das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água (Tabela 6). As larvas cultivadas em pH 8,0 apresentaram maior comprimento da cauda em 6- 24 hpe e em 36 hpe, sendo que

em 36 hpe o aumento do Ca^{2+} proporcionou o aumento deste parâmetro em ambos pHs. Em 216 hpe o crescimento da cauda foi favorecido pelo aumento da dureza ($70 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) quando comparado ao controle e foi maior em pH 7,0 (Tabela 7).

O diâmetro do olho das larvas de jundiá foi significativamente diferente somente nas fases iniciais de desenvolvimento (12-24 hpe) e maior no pH 8,0 (Tabela 8). A altura da cabeça também apresentou diferença somente nas fases iniciais de desenvolvimento, sendo a altura da cabeça das larvas cultivadas em pH 8,0 foram maiores em 12 e 36 hpe, entretanto foi menor em 18 hpe. O aumento da concentração do Ca^{2+} em 36 hpe influenciou positivamente o crescimento da cabeça em relação ao controle nesta fase em ambos pHs (Tabela 9).

O valor de “b” nas relações alométricas com o comprimento total indicou que o aumento do diâmetro do olho, da altura da cabeça e o comprimento da cauda mostraram alometria positiva ($b > 1$), e a área do saco vitelínico apresentou alometria negativa ($b < 1$) em ambos pHs, exceto para o comprimento da cauda e altura da cabeça em pH 8,0 que indicou uma tendência isométrica ($b = 1$) para estes parâmetros (Tabela 10). O diâmetro do olho mostrou correlação baixa ($r^2 = 0,65$) em pH 8,0. Nas Figuras 4B, 5 e 6 estão indicadas as relações de crescimento que mais se adequaram ao desenvolvimento em função do tempo nos pHs. Em geral observou-se um crescimento potencial (alométrico) das características morfométricas em função do tempo em ambos pHs, exceto para a área do saco vitelínico, independente das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$. Principalmente, quando se considera o crescimento da área corporal total, comprimento total, comprimento da cauda e altura da cabeça em função das correlações significativas. O coeficiente de crescimento para os parâmetros em que se estabeleceu a relação potencial em função do tempo foi $0 < b < 1$, o que indica a tendência de redução da taxa de crescimento das estruturas ao longo do tempo. Contudo, o coeficiente de crescimento (“b”) em função do tempo mostrou diferença

significativa entre os pHs somente para o comprimento total que foi maior em pH 8,0 e para o comprimento da cauda que foi maior em pH 7,0 do que em pH 8,0.

A observação do diâmetro do olho em função do tempo não foi significativa, entretanto quando se relacionou esta variável ao crescimento da cabeça (em altura) ao longo do desenvolvimento através de curvas potenciais ($y=aAltCab^b$, onde y = diâmetro do olho, a = intercepto, $AltCab$ = altura da cabeça ao longo do desenvolvimento, b = coeficiente de crescimento) esta relação foi significativa ($p<0,05$) (pH 7,0: $y = 0,1134AltCab^{1,7104}$ ($r^2= 0,72$), pH 8,0: $y = 0,1691AltCab^{1,7700}$ ($r^2=0,87$), e indicou um crescimento positivo ($b>1$) do diâmetro do olho em função do crescimento da cabeça, e não foi observado diferença significativa dos “b” entre os pHs para esta variável.

Tabela 3- Área total do ovo (A.ovo), área to saco vitelínico (A.s.vit.), diâmetro do ovo (Di) e altura da cabeça (Alt.cab) de embriões de jundiá, *Rhamdia quelen* 24 h após a fertilização (hpf) em função do pH 7,0 e 8,0 e concentrações de $Ca^{2+}:Mg^{2+}$ da água. média (\pm E.P.M).

Estágio de desenvolvimento	pHs	$Ca^{2+}:Mg^{2+}$ (mg L ⁻¹)	A. ovo (mm ²)	A. s.vit (mm ²)	Di (mm)	Alt. cab (mm)
Embrião (24 hpf)	pH 7,0	5,0:2,08 ¹	2,41 \pm 0,42	0,50 \pm 0,03	1,50 \pm 0,04	0,29 \pm 0,01
		20,0:5,59 ²	1,81 \pm 0,08	0,54 \pm 0,01	1,50 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01
		23,0 :2,08 ²	1,88 \pm 0,11	0,53 \pm 0,01	1,58 \pm 0,03	0,32 \pm 0,02
	pH 8,0	5,0:2,08 ¹	2,51 \pm 0,13	0,52 \pm 0,02	1,83 \pm 0,04	0,32 \pm 0,01
		20,0:5,59 ²	2,31 \pm 0,06	0,48 \pm 0,01	1,78 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01
		23,0 :2,08 ²	2,34 \pm 0,05	0,50 \pm 0,01	1,81 \pm 0,03	0,30 \pm 0,01

Dureza da água- ¹ 20 mg L⁻¹ CaCO₃- controle. ² 70 mg L⁻¹ CaCO₃- com variação da concentração de $Ca^{2+}:Mg^{2+}$ (mg L⁻¹).

Tabela 4- Área corporal total média (\pm E.P.M) de larvas após a eclosão de *Rhamdia quelen* em pH 7,0 e 8,0 e as concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.

Estágio de desenvolvimento		Área corporal total (mm^2)					
	Tempo (hpe)	pH 7,0			pH 8,0		
		$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})			$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})		
		5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
Larval Após eclosão	6	2,98 \pm 0,11	2,77 \pm 0,11	2,40 \pm 0,04	2,42 \pm 0,11	2,89 \pm 0,09	2,85 \pm 0,02
	12	3,01 \pm 0,11	2,91 \pm 0,08	2,76 \pm 0,11	3,04 \pm 0,13	3,13 \pm 0,07	2,90 \pm 0,04
	18	3,09 \pm 0,04	2,98 \pm 0,08	3,01 \pm 0,01	3,10 \pm 0,12	3,25 \pm 0,07	3,09 \pm 0,07
	24	3,28 \pm 0,29	3,25 \pm 0,07	3,45 \pm 0,10	3,22 \pm 0,19	3,50 \pm 0,21	3,50 \pm 0,06
	30	3,54 \pm 0,14	3,52 \pm 0,19	3,22 \pm 0,09	3,79 \pm 0,11*	3,66 \pm 0,09*	4,02 \pm 0,08*
	36	3,14 \pm 0,12	3,61 \pm 0,22	3,75 \pm 0,08	3,77 \pm 0,22*	3,99 \pm 0,40*	4,46 \pm 0,05*
	42	4,20 \pm 0,14	4,11 \pm 0,48	4,50 \pm 0,08	4,45 \pm 0,01	4,42 \pm 0,36	4,67 \pm 0,05
	48	4,36 \pm 0,14 ^a	5,31 \pm 0,09 ^b	4,86 \pm 0,24 ^{ab}	4,40 \pm 0,11 ^a	5,02 \pm 0,40 ^b	4,93 \pm 0,05 ^{ab}
Alimentação Exógena	216	5,70 \pm 0,39 ^a	6,53 \pm 0,19 ^b	6,66 \pm 0,27 ^b	6,67 \pm 0,30 ^{a*}	8,59 \pm 0,80 ^{b*}	7,50 \pm 0,60 ^{b*}

Dureza da água- ¹ 20 mg L^{-1} CaCO_3 - controle. ² 70 mg L^{-1} CaCO_3 - com variação da concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1}). Letras diferentes no indicam diferença significativa em relação às concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ para o mesmo tempo. * indica diferença significativa em relação ao pH 7,0. hpf- horas após fertilização. hpe- horas após eclosão.

Tabela 5- Área média do saco vitelínico (\pm E.P.M) de embriões e larvas após a eclosão de *Rhamdia quelen* em pH 7,0 e 8,0 e as concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.

Estágio de desenvolvimento		Área do saco vitelínico (mm^2)					
	Tempo (hpe)	pH 7,0			pH 8,0		
		$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})			$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})		
		5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
Larval							
Após eclosão	6	0,51 \pm 0,03	0,52 \pm 0,02	0,55 \pm 0,01	0,40 \pm 0,02*	0,38 \pm 0,01*	0,39 \pm 0,01*
	12	0,49 \pm 0,01	0,45 \pm 0,02	0,48 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01*	0,35 \pm 0,01*	0,36 \pm 0,01*
	18	0,48 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	0,45 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01*	0,35 \pm 0,01*	0,33 \pm 0,01*
	24	0,46 \pm 0,03	0,45 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01	0,34 \pm 0,02*	0,29 \pm 0,01*	0,31 \pm 0,01*
	30	0,41 \pm 0,00	0,44 \pm 0,01	0,39 \pm 0,03	0,26 \pm 0,02*	0,27 \pm 0,02*	0,25 \pm 0,01*
	36	0,39 \pm 0,03	0,42 \pm 0,02	0,39 \pm 0,02	0,25 \pm 0,01*	0,24 \pm 0,01*	0,20 \pm 0,01*
	42	0,34 \pm 0,01	0,34 \pm 0,02	0,26 \pm 0,02	0,16 \pm 0,00*	0,17 \pm 0,02*	0,17 \pm 0,01*
Alimentação	48	0,35 \pm 0,02 ^{a#}	0,27 \pm 0,01 ^{b#}	0,28 \pm 0,01 ^{b#}	0,16 \pm 0,01*	0,15 \pm 0,01*	0,16 \pm 0,01*
Exógena	216	-	-	-	-	-	-

Dureza da água- ¹ 20 mg L^{-1} CaCO_3 - controle. ² 70 mg L^{-1} CaCO_3 - com variação da concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1}). Letras diferentes no indicam diferença significativa em relação às concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ para o mesmo tempo. * indica diferença significativa em relação ao pH 7,0. # interação entre pH e $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$. hpf- horas após fertilização. hpe- horas após eclosão. - indica ausência da estrutura.

Tabela 6- Comprimento total médio (\pm E.P.M.) de larvas após a eclosão de *Rhamdia quelen* em pH 7,0 e 8,0 e as concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.

Estágio de desenvolvimento		Comprimento total (mm)					
Larval	Tempo (hpe)	pH 7,0			pH 8,0		
		$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})			$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})		
		5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
Após eclosão	6	4,09 \pm 0,30	4,31 \pm 0,12	3,97 \pm 0,02	4,05 \pm 0,15	4,36 \pm 0,04	4,40 \pm 0,07
	12	4,38 \pm 0,11	4,35 \pm 0,06	4,16 \pm 0,13	4,57 \pm 0,04*	4,64 \pm 0,06*	4,60 \pm 0,04*
	18	4,45 \pm 0,05	4,39 \pm 0,06	4,31 \pm 0,01	4,67 \pm 0,01*	4,64 \pm 0,08*	4,69 \pm 0,04*
	24	4,28 \pm 0,41	4,50 \pm 0,05	4,66 \pm 0,06	4,63 \pm 0,07	4,79 \pm 0,11	4,87 \pm 0,06
	30	4,89 \pm 0,14	4,96 \pm 0,08	4,94 \pm 0,16	4,82 \pm 0,08	4,93 \pm 0,11	4,84 \pm 0,05
	36	4,71 \pm 0,09	4,70 \pm 0,09	4,62 \pm 0,24	4,79 \pm 0,06	5,01 \pm 0,08	5,09 \pm 0,02
	42	5,15 \pm 0,04	5,34 \pm 0,07	5,20 \pm 0,06	5,07 \pm 0,04*	5,17 \pm 0,11*	5,05 \pm 0,04*
Alimentação	48	5,06 \pm 0,04	5,18 \pm 0,10	5,25 \pm 0,17	5,23 \pm 0,11*	5,31 \pm 0,09*	5,34 \pm 0,06*
Exógena	216	5,20 \pm 0,09	5,30 \pm 0,05	5,50 \pm 0,26	6,60 \pm 0,20*	6,51 \pm 0,04*	6,27 \pm 0,12*

Dureza da água- ¹ 20 mg L^{-1} CaCO_3 - controle. ² 70 mg L^{-1} CaCO_3 - com variação da concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1}). Letras diferentes no indicam diferença significativa em relação às concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ para o mesmo tempo. * indica diferença significativa em relação ao pH 7,0. hpe- horas após eclosão.

Tabela 7- Comprimento médio da cauda (\pm E.P.M) de larvas após a eclosão de *Rhamdia quelen* em pH 7,0 e 8,0 e as concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.

Estágio de desenvolvimento		Comprimento da cauda (mm)					
Larval	Tempo (hpe)	pH 7,0			pH 8,0		
		$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})			$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})		
		5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
Após eclosão	6	1,89 \pm 0,07	1,96 \pm 0,06	1,79 \pm 0,05	1,99 \pm 0,09*	2,14 \pm 0,03*	2,18 \pm 0,04*
	12	2,09 \pm 0,07	2,07 \pm 0,01	1,96 \pm 0,07	2,31 \pm 0,01*	2,34 \pm 0,03*	2,31 \pm 0,04*
	18	2,17 \pm 0,03	2,15 \pm 0,04	2,10 \pm 0,01	2,42 \pm 0,02*	2,39 \pm 0,06*	2,42 \pm 0,01*
	24	2,03 \pm 0,30	2,22 \pm 0,02	2,38 \pm 0,03	2,33 \pm 0,12*	2,52 \pm 0,07*	2,56 \pm 0,05*
	30	2,45 \pm 0,08	2,27 \pm 0,22	2,54 \pm 0,12	2,53 \pm 0,05	2,59 \pm 0,09	2,56 \pm 0,02
	36	2,40 \pm 0,06 ^a	2,47 \pm 0,09 ^{ab}	2,83 \pm 0,22 ^b	2,53 \pm 0,03 ^{a*}	2,63 \pm 0,06 ^{ab*}	2,75 \pm 0,02 ^{b*}
	42	2,70 \pm 0,04	2,90 \pm 0,05	2,76 \pm 0,04	2,71 \pm 0,03	2,66 \pm 0,06	2,76 \pm 0,05
Alimentação	48	2,85 \pm 0,03	2,90 \pm 0,02	2,94 \pm 0,03	2,64 \pm 0,02	2,64 \pm 0,11	2,80 \pm 0,04
Exógena	216	3,41 \pm 0,08 ^a	3,99 \pm 0,03 ^b	3,47 \pm 0,06 ^{ab}	3,09 \pm 0,04 ^{a*}	3,45 \pm 0,24 ^{b*}	3,37 \pm 0,22 ^{ab*}

Dureza da água- ¹ 20 mg L^{-1} CaCO_3 - controle. ² 70 mg L^{-1} CaCO_3 - com variação da concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1}). Letras diferentes no indicam diferença significativa em relação às concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ para o mesmo tempo. * indica diferença significativa em relação ao pH 7,0. hpe- horas após eclosão.

Tabela 8- Diâmetro médio do olho (\pm E.P.M) de larvas após a eclosão de *Rhamdia quelen* em pH 7,0 e 8,0 e as concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.

Estágio de desenvolvimento		Diâmetro do olho (mm)					
Larval	Tempo (hpe)	pH 7,0			pH 8,0		
		$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})			$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})		
		5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
Após eclosão	6	0,04 \pm 0,007	0,03 \pm 0,002	0,03 \pm 0,001	0,04 \pm 0,006	0,04 \pm 0,001	0,04 \pm 0,004
	12	0,04 \pm 0,001	0,05 \pm 0,003	0,04 \pm 0,006	0,06 \pm 0,006*	0,07 \pm 0,003*	0,07 \pm 0,004*
	18	0,06 \pm 0,002	0,06 \pm 0,006	0,05 \pm 0,003	0,09 \pm 0,002*	0,09 \pm 0,002*	0,08 \pm 0,003*
	24	0,07 \pm 0,005	0,08 \pm 0,002	0,08 \pm 0,002	0,09 \pm 0,001*	0,11 \pm 0,004*	0,11 \pm 0,003*
	30	0,10 \pm 0,005	0,11 \pm 0,008	0,11 \pm 0,005	0,12 \pm 0,004	0,11 \pm 0,001	0,11 \pm 0,002
	36	0,09 \pm 0,006	0,10 \pm 0,009	0,10 \pm 0,002	0,09 \pm 0,020	0,11 \pm 0,000	0,12 \pm 0,010
	42	0,12 \pm 0,004	0,11 \pm 0,005	0,12 \pm 0,010	0,12 \pm 0,003	0,11 \pm 0,007	0,12 \pm 0,004
Alimentação	48	0,12 \pm 0,004	0,14 \pm 0,000	0,13 \pm 0,004	0,12 \pm 0,002	0,12 \pm 0,002	0,12 \pm 0,040
Exógena	216	0,14 \pm 0,002	0,15 \pm 0,003	0,14 \pm 0,010	0,13 \pm 0,010	0,12 \pm 0,010	0,11 \pm 0,010

Dureza da água-¹ 20 mg L^{-1} CaCO_3 - controle. ² 70 mg L^{-1} CaCO_3 - com variação da concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1}). Letras diferentes no indicam diferença significativa em relação às concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ para o mesmo tempo. * indica diferença significativa em relação ao pH 7,0. hpf- horas após fertilização. hpe- horas após eclosão.

Tabela 9- Altura média da cabeça (\pm E.P.M) de larvas após a eclosão de *Rhamdia quelen* em pH 7,0 e 8,0 e as concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água.

Estágio de desenvolvimento		Altura da cabeça (mm)					
	Tempo (hpe)	pH 7,0			pH 8,0		
		$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})			$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})		
		5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
Larval							
Após eclosão	6	0,57 \pm 0,02	0,59 \pm 0,02	0,52 \pm 0,02	0,53 \pm 0,03	0,62 \pm 0,01	0,62 \pm 0,01
	12	0,65 \pm 0,01	0,64 \pm 0,02	0,63 \pm 0,01	0,67 \pm 0,01*	0,68 \pm 0,01*	0,70 \pm 0,01*
	18	0,74 \pm 0,01	0,72 \pm 0,01	0,72 \pm 0,01	0,67 \pm 0,02*	0,66 \pm 0,00*	0,65 \pm 0,02*
	24	0,70 \pm 0,03	0,70 \pm 0,01	0,74 \pm 0,01	0,72 \pm 0,01	0,75 \pm 0,02	0,74 \pm 0,01
	30	0,75 \pm 0,01	0,70 \pm 0,04	0,76 \pm 0,01	0,76 \pm 0,02	0,76 \pm 0,02	0,81 \pm 0,02
	36	0,73 \pm 0,01 ^a	0,76 \pm 0,00 ^{ab}	0,75 \pm 0,00 ^b	0,76 \pm 0,02 ^{a*}	0,81 \pm 0,02 ^{ab*}	0,85 \pm 0,02 ^{b*}
	42	0,86 \pm 0,01	0,83 \pm 0,02	0,86 \pm 0,02	0,82 \pm 0,01	0,83 \pm 0,03	0,82 \pm 0,02
Alimentação	48	0,88 \pm 0,02	0,88 \pm 0,01	0,87 \pm 0,03	0,84 \pm 0,01	0,86 \pm 0,02	0,82 \pm 0,04
Exógena	216	0,96 \pm 0,02	1,31 \pm 0,07	1,03 \pm 0,01	0,87 \pm 0,02	0,85 \pm 0,01	1,13 \pm 0,22

Dureza da água- ¹ 20 mg L⁻¹ CaCO₃- controle. ² 70 mg L⁻¹ CaCO₃- com variação da concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1}). Letras diferentes no indicam diferença significativa em relação às concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ para mesmo tempo. * indica diferença significativa em relação ao pH 7,0. hpf- horas após fertilização. hpe- horas após eclosão.

Tabela 10- Coeficiente de crescimento alométrico (b) e correlação (r^2) para as variáveis área do saco vitelínico (A. s.vit), comprimento da cauda (C.cauda), diâmetro do olho (D. olho) e altura da cabeça (Alt cab) em função dos pHs (7,0 e 8,0) nas fases de desenvolvimento embrionário e/ou larval de *Rhamdia quelen*.

pHs	Á. s.vit (mm ²)	C. cauda (mm)	D. olho (mm)	Alt cab (mm)
pH 7,0	$y = 2,55AT^{-1,52}$ $r^2=0,82$	$y = 0,09CT^{2,13}$ $r^2=0,84$	$y = 0,001CT^{4,43}$ $r^2=0,92$	$y = 0,027CT^{1,94}$ $r^2=0,80$
pH 8,0	$y = 2,19AT^{-1,67}$ $r^2=0,95$	$y = 0,51CT^{1,01}$ $r^2=0,97$	$y = 0,008CT^{1,55}$ $r^2=0,65$	$y = 0,15CT^{1,02}$ $r^2=0,84$

determinação de b através de $y = aCT^b$ ou $y = aAT^b$, y = variável, AT = área corporal total, CT = comprimento total.

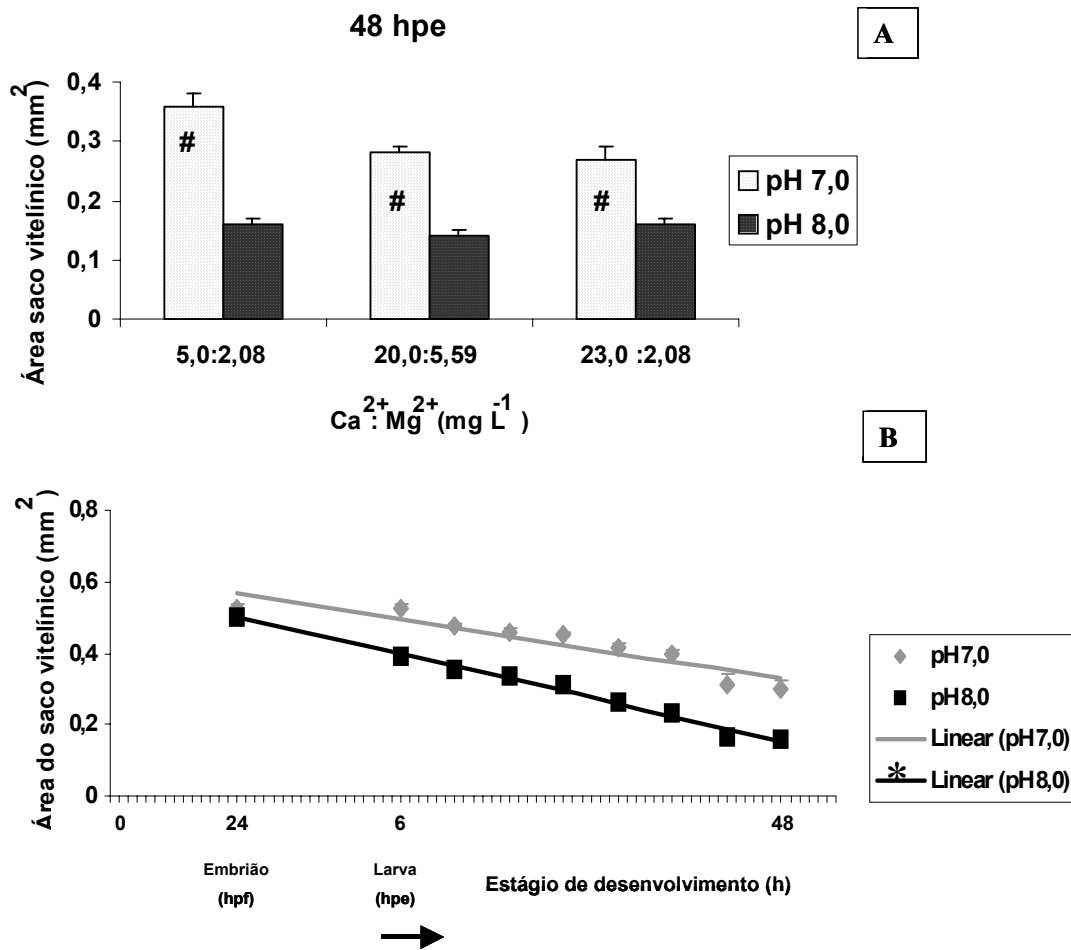


Figura 4 – Área do saco vitelínico nos estágios de desenvolvimento embrionário e larval de jundiá (*Rhamdia quelen*) sob efeito do pH 7,0 e 8,0. A) Interação entre pH e $\text{Ca}^{2+} : \text{Mg}^{2+}$ da água em 48 hpe; # interação. B) Relação linear da área do saco vitelínico em função do tempo em embriões: 24 hpf e larva: 6-48 hpe (a cada 6h). Regressões $[y=a+b(\pm\text{epm})x]$ (onde y = área do saco vitelínico, a = intercepto, x = tempo, b = coeficiente de crescimento ($\pm\text{epm}$ de “ b ”) e correlações: pH7,0: $y = 0,6643 - 0,004(\pm 0,0023)x$ ($r^2=0,872$)($p<0,05$); pH8,0: $y = 0,641 - 0,0058(\pm 0,00016)x$ ($r^2=0,989$). * sobre a reta na legenda indica diferença significativa de “ b ” em relação ao pH 7,0. hpf- horas após fertilização. hpe- horas após eclosão. Equações: para calcular y após eclosão, considerar x como fase de embrião (36hpf) + fase larval (como 36 + 48 hpe= 84, utilizar $x=84$).

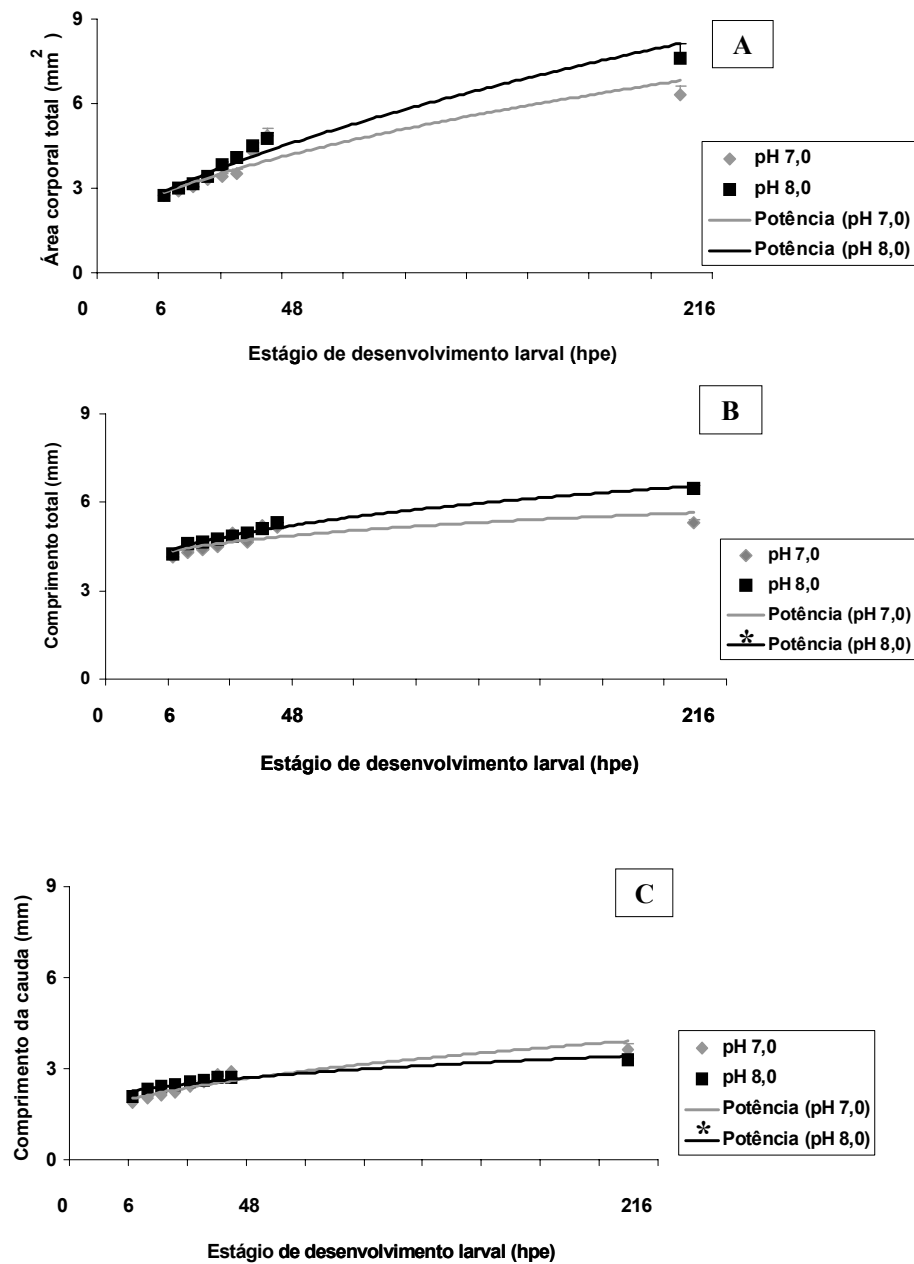


Figura 5 – Parâmetros morfométricos do desenvolvimento larval de jundiá (*Rhamdia quelen*) de 6-48 hpe (a cada 6 h) e após 216 hpe em função do pH 7,0 e 8,0. Curvas potenciais ($y=aT^b$, onde y = parâmetro medido, a = intercepto, T = tempo, b = coeficiente de crescimento)^(±epm) e correlações: A) Área corporal total- pH 7,0: $y = 0,5546T^{0,4449(\pm 0,0353)}$ ($r^2=0,88$) ($p<0,05$), pH 8,0: $y = 0,5324T^{0,4373(\pm 0,0364)}$ ($r^2=0,96$) ($p<0,05$); B) Comprimento total- pH 7,0: $y = 2,6970T^{0,1310(\pm 0,0137)}$ ($r^2=0,62$) ($p<0,05$), pH 8,0: $y = 1,9700T^{0,2159(\pm 0,0155)}$ ($r^2=0,98$) ($p<0,05$); C) Comprimento da cauda- pH 7,0: $y = 0,5975T^{0,3322(\pm 0,0264)}$ ($r^2=0,89$) ($p<0,05$), pH 8,0: $y = 1,0118T^{0,2174(\pm 0,0134)}$ ($r^2=0,94$) ($p<0,05$). * sobre a reta na legenda indica diferença significativa de “b” em relação ao pH 7,0.

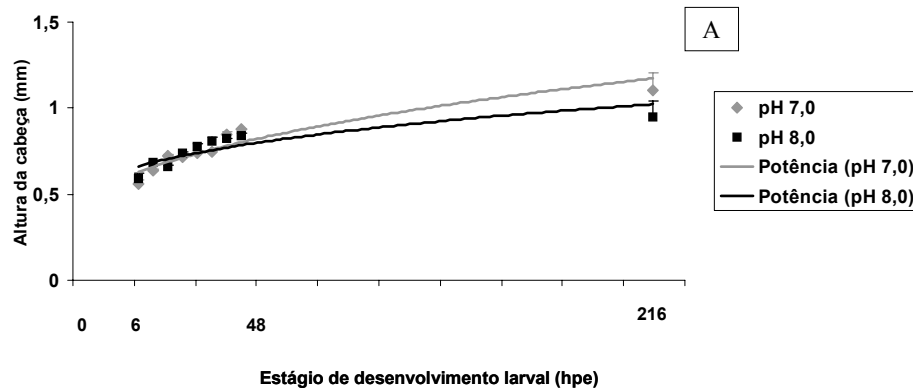


Figura 6 – Altura da cabeça ao longo do desenvolvimento larval de jundiá (*Rhamdia quelen*) de 6-48 hpe (a cada 6 h) e após 216 hpe em função do pH 7,0 e 8,0. Curvas potenciais ($y=aT^b$, onde y = altura da cabeça, a = intercepto, T = tempo, b = coeficiente de crescimento) ^(\pm epm) e correlações: A) altura da cabeça- pH 7,0: $y = 0,19T^{0,32(\pm 0,0591)}$ ($r^2= 0,89$) ($p<0,05$), pH 8,0: $y = 0,30T^{0,21(\pm 0,0487)}$ ($r^2= 0,77$) ($p<0,05$).

Discussão

As variáveis de produção, porcentagem de fertilização, eclosão, sobrevivência após eclosão, sobrevivência final, peso e comprimento total (48 e 216 hpe) corroboram com os resultados obtidos por LOPES et al (2001), que demonstraram que o pH 8,0 é o mais adequado para o cultivo dos ovos e larvas de *Rhamdia quelen* e TOWNSEND et al (2003) e SILVA et al (2003, 2005), obtiveram um maior crescimento das larvas em durezas entre 30-70 mg L⁻¹ CaCO₃. Como no presente estudo, TOWNSEND et al (2003) e SILVA et al (2003, 2005) obtiveram ótima taxa de eclosão em ovos incubados em água com dureza 70 mg L⁻¹ CaCO₃ (independente das concentrações de Ca²⁺ e Mg²⁺) em pH 8,0 e também satisfatória taxa de sobrevivência e crescimento após eclosão nessa dureza e pH.

O desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen* a 24 °C, mostrou similaridade com a morfologia externa e seqüência temporal dos eventos de crescimento com outras espécies de Siluriforme, como *R. hiliarii* (GODINHO et al., 1978) e *R. sapo* (CUSSAC et al., 1985) ambos cultivados em pH 6,8-7,0 a 22-24 °C, que apresentam o início da eclosão em 27

h após a fertilização (hpf) e a absorção do saco vitelínico em 48-72 h após eclosão (hpe), iniciando a alimentação exógena.

As larvas de jundiá cultivadas a 24°C também mostraram semelhança no desenvolvimento com o tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes), principalmente em relação às brânquias, trato digestivo e saco vitelínico (com absorção completa 2-3 dias após a eclosão). As larvas de tambaqui, peixe comercialmente importante principalmente na região Amazônica, também necessitam completar o desenvolvimento após a eclosão, quando ocorre formação dos olhos, mandíbulas e nadadeiras peitorais, somatogênese e pigmentação. A diferenciação e crescimento larval são extremamente rápidos (6 dias a 28 °C) e o desenvolvimento dos somitos ocorre em 12 hpf. Os arcos e filamentos branquiais, trato digestivo tornam-se mais desenvolvido a 62 hpe e o saco vitelínico é completamente absorvido em 78 h após eclosão (3 dias) (VIEIRA & JOHNSTON, 1996). Para as larvas de jundiá o período para absorção total do saco vitelínico a 24°C, em pH 7,0 e 8,0 pode ser estimado pelas regressões deste estudo, sugerindo um consumo mais rápido de vitelo em pH 8,0 que ocorre em 74 hpe (3 dias) em pH 8,0 e 128 hpe (5 dias) em pH 7,0.

A temperatura de cultivo das espécies é um fator importante a ser considerado na comparação do desenvolvimento morfológico (OJANGUREN & BRÃNA, 2003). A absorção do saco vitelínico de larvas de *Pagrus pagrus* (Perciformes) cultivadas a 12-18 °C ocorre em 4 dias após a eclosão (96 hpe) (MIHELAKAKIS et al., 2001), o que mostra que a temperatura da água influencia o processo de absorção do vitelo para o crescimento. Estudos morfológicos de *Paralichthys dentatus* (Pleuronectiformes, Linguado, “summer flounder”), peixe economicamente importante do Atlântico Norte, mostram um desenvolvimento mais lento do que o jundiá e tambaqui, possivelmente em função da temperatura de cultivo (14°C): boca aberta e trato digestivo desenvolvido em 78 hpf (1-3 dias após fertilização), nadadeiras peitorais visíveis - 12 dias após eclosão, e a metamorfose completa ocorreu em 40-50 dias

após eclosão (MARTINEZ & BOLKER, 2003). Para carpa comum (*Cyprinus carpio*) o desenvolvimento embrionário-larval foi em 90 h (4 dias, em que apresentou 6 mm de comprimento) a 25°C, e em temperaturas mais altas ocorre aumento do número de indivíduos com defeito após a eclosão (LINHART et al., 1995). De acordo com CHIPARI-GOMES et al (2000) que construíram o polígono de tolerância térmica de larvas de jundiá em 144 hpe (6 dias após eclosão), a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ é indicada para sobrevivência de larvas desta espécie. Portanto, neste estudo acredita-se que a temperatura de cultivo foi adequada para o desenvolvimento morfológico dos embriões e larvas de jundiá, não evidenciando crescimento lento ou problemas ao longo do desenvolvimento como para *Pagrus pagrus*, *Paralichthys dentatus*, *Cyprinus carpio*.

BOLKER & HILL (2000) afirmam que a pigmentação é uma importante característica a ser analisada durante o desenvolvimento, pois pode mudar rapidamente em função do ambiente. Estes autores indicam que a pigmentação em embriões e larvas de “flatfish” (*Paralichthys olivaceus*, Pleuronectiformes) seguiu dois momentos: o primeiro momento de estágio embrionário, seguiu o modelo simétrico e um segundo momento, em função da metamorfose quando ocorreram mudanças em muitas estruturas e tecidos (olhos, linha lateral, tegumento, etc.) As larvas de jundiá tem uma pigmentação mais intensa a partir de 36-216 hpe (segundo momento), e esta não foi alterada em função das características experimentais de cultivo.

O desenvolvimento das características morfológicas de embriões e larvas de *R. quelen* não foi modificado em função dos pHs (7,0 e 8,0) e das concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} da água, ocorrendo um mesmo padrão morfológico de desenvolvimento embrionário-larval e evidenciando que o período mais sensível para o desenvolvimento das larvas desta espécie (6-216 hpe), esta relacionada ao desenvolvimento das estruturas respiratórias e osmorregulatórias (brânquias, rim e trato digestivo). O início da alimentação exógena representou outro ponto

crítico para as larvas (48 hpe), seguido das modificações e adaptações necessárias para captura e capacidade de digestão do alimento externo (216 hpe) devido ao desenvolvimento e funcionalidade da boca e trato digestivo. A fragilidade das fases iniciais até a primeira alimentação contribui para alta mortalidade de larvas de jundiá (40-50%), observada em fazendas de aquicultura que produzem esta espécie (BARCELLOS et al., 2004). SILVA et al (2003) identificaram que a sobrevivência após eclosão reduz (54-69%) quando comparado com a percentagem de eclosão (63-72%) em pH 8,0. Entretanto, SILVA et al (2005) verificaram alta sobrevivência após 21 dias de larvicultura (92-94%) também em pH 8,0, corroborando com a análise de nosso estudo em que o período mais sensível para esta espécie possivelmente ocorre nos primeiros dias após eclosão (6-216 hpe).

O padrão de crescimento morfométrico do jundiá em função do comprimento total das larvas parece ser mais dependente dos pHs do que da dureza da água. O pH 8,0 indicou os maiores valores relacionados à maioria das características morfométricas avaliadas, exceto para o saco vitelínico, pois o consumo de vitelo foi maior neste pH. De acordo com os resultados o diâmetro do olho não segue um crescimento potencial em função do tempo para ambos pHs, mas indicou uma relação potencial positiva com o crescimento da cabeça.

O aumento da dureza da água ($70 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) proporcionou maior área corporal total em larvas de jundiá (216 hpe) nos dois pHs. O comprimento total não foi alterado pela dureza da água até 216 hpe. SILVA et al (2005) também não encontraram diferenças no crescimento desta espécie no mesmo período, nesta dureza em pH 8,0, contudo estes autores mencionam uma diminuição do crescimento com o aumento do Ca^{2+} acima de 20 mg L^{-1} , em 21 dias após eclosão. TOWNSEND et al (2003) e SILVA et al (2003) sugerem que o aumento da dureza da água de 20 a $70 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, em pH 8,0, elevou a sobrevivência e o crescimento das larvas de jundiá logo após a eclosão e em 21 dias de cultivo. Os mesmos autores sugerem que tanto as concentrações de Ca^{2+} acima de 25 mg L^{-1} e de Mg^{2+} a $7,11 \text{ mg}$

L^{-1} podem diminuir o crescimento das larvas de jundiá. Em nosso estudo as concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} utilizadas foram abaixo destes valores. Entretanto, a área corporal total das larvas em pH 8,0, apesar de não significativo (48 e 216 hpe), indicou uma tendência de que larvas cultivadas com o aumento somente do Ca^{2+} na água (23 mg L^{-1}) parece ter menor crescimento do que as larvas cultivadas com o aumento do Ca^{2+} e Mg^{2+} ($20 \text{ Ca}^{2+} : 5,59 \text{ Mg}^{2+}, \text{ mg L}^{-1}$) na mesma dureza ($70 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$).

LOPES et al (2001) enfatizam que as maiores taxas de sobrevivência e crescimento para larvas de jundiá foram obtidas em pH 8,0 em relação ao pH 7,0. Corroborando com estes autores, nosso trabalho também indicou que o comprimento total mostrou melhor correlação e maior coeficiente do crescimento em função do tempo em pH 8,0, que pode sugerir que as larvas crescem menos em pH 7,0 ao longo do tempo. LOPES et al (2001), TOWNSEND et al (2003) e SILVA et al (2003) analisaram o crescimento das larvas de jundiá em comprimento total e peso, portanto dificultando a comparação com as outras características avaliadas neste estudo.

GISBERT et al (2002) avaliando o desenvolvimento morfológico e morfométrico em um Linguado da Califórnia (*Paralichthys californicus*, Pleuronectiformes) a 20°C , sugerem que morfologia e os modelos de crescimento alométrico das regiões do corpo indicam a mudança dos fenótipos para alevino-adulto em que ocorrem mudanças na pigmentação dos olhos, flexão da notocorda e aparecimento das nadadeiras. Estes autores mencionam que a metamorfose para esta espécie não foi completada em larvas até 10 mm. Contudo, sugerem que o crescimento alométrico positivo (em função do comprimento total), para as regiões da cabeça está associado ao desenvolvimento dos sistemas nervoso (cérebro), sensorial (visão, olfato e linha lateral), respiratório (arcos e filamentos branquiais) e alimentar após a eclosão. Conseqüentemente, com a diferenciação neural e estruturas sensoriais (crescimento alométrico positivo dos olhos, desenvolvimento olfatório e neuromastos), tornam as larvas

mais hábeis para reagir a estímulos de luz, detectar a presa e começar a se alimentar exógenamente quando reduzem as reservas do saco vitelínico. O desenvolvimento dos arcos e filamentos branquiais permite melhor absorção do oxigênio pela superfície branquial, resultando num maior suporte de oxigênio para aumentar atividade natatória. Estes fatores em conjunto com o desenvolvimento das mandíbulas melhoram a capacidade de alimentação, aumentando o crescimento e as chances de sobrevivência das larvas (HUNT VON HERBING, 2001).

No presente estudo os resultados morfológicos e morfométricos indicam que o crescimento alométrico positivo de larvas de jundiá em geral sugere a proximidade do fenótipo de alevino (semelhante ao adulto). Entretanto, o desenvolvimento larval não foi completado em 216 hpe (em torno de 6 mm), devido à ausência das nadadeiras dorsais e caudais (apresentando somente as peitorais). Contudo, o coeficiente alométrico (em função do comprimento total) para todos os parâmetros foi positivo para ambos pHs, exceto para a área do saco vitelínico que possuiu coeficiente alométrico negativo, como o esperado pois esta estrutura reduz à medida que as larvas crescem em função do consumo do vitelo utilizado para o desenvolvimento inicial até o início da alimentação exógena.

FAUSTINO & POWER (2001) relatam que tanto o Ca^{2+} como o Mg^{2+} da água, são essenciais para o desenvolvimento da coluna vertebral, nadadeiras e crânio (estruturas mineralizadas) no desenvolvimento de larvas de peixes. Neste contexto, a maior disponibilidade de íons na água de cultivo, desde que em concentrações adequadas a espécie, favoreceu o crescimento do comprimento da cauda e altura da cabeça, seguida principalmente pelo aumento da área corporal total em fase inicial de desenvolvimento das larvas de jundiá otimizando o cultivo.

Conclusão

Os resultados sugerem que as melhores sobrevivências e crescimento foram obtidos em pH 8,0 e este é indicado para o cultivo de larvas de *Rhamdia quelen*.

O aumento da dureza da água para 70 mg L⁻¹ CaCO₃, principalmente nas concentrações de 20mg L⁻¹ de Ca²⁺ e 5,59 mg L⁻¹ de Mg²⁺ tende a favorecer o aumento da área corporal total das larvas em ambos pHs.

A morfologia em função da seqüência de eventos temporais do desenvolvimento desta espécie, não é alterada pelo pH e as concentrações de Ca²⁺:Mg²⁺ da água utilizada.

O estágio de desenvolvimento de 6-216 h após eclosão é considerado como período crítico, ressaltando o início da alimentação exógena (48 h após eclosão). E estas são informações importantes para pesquisadores e/ou produtores, no aprimoramento de técnicas de manejo nas fases iniciais de vida de *Rhamdia quelen* contribuindo para o estudo biológico desta espécie em ambiente de cultivo.

Referências Bibliográficas

ALDERDICE, D. F. Osmotic and ion regulation in teleost eggs and larvae. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish Physiology XI the physiology of developing fish**. Part-A eggs and larvae. ed. San Diego: Academic Press, 1988. p. 163-251.

BALON, K. Epigenesis of an epigenecist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. **Guelph Ichthyological Review**, v.4, p. 1-48, 1990.

BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOHL, V. M.; KRIEGER, M. H.; QUEVEDO, R. M.; LUTHIER, F. Steroid profiles of cultured female jundiá, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces, Teleostei) during the first reproductive cycle. **General Comparative Endocrinology**, v.121, p.325-332, 2001.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; FIOREZE, I.; CERICATO, L.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; BALDISSERA, R. K.; BRUSCHI, A.; RITTER, F. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture** v.232, p. 383-394, 2004.

BENGSTON, D. A. Aquaculture of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): status of knowledge, current research and future research priorities. **Aquaculture**, v.176, p. 39-49, 1999.

BOLKER, J. A.; HILL, C. R. Review paper: Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. **Journal of Fish Biology**, v.56, p.1029-1052, 2000.

CHIPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperature for *Rhamdia quelen* larvae (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, p.1069-1071, 2000.

CUSSAC, V. E.; MATKOVIC, M.; MAGGESE, M. C. Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eigenmann, 1988 (Pisces, Pimelodidae) II. Organogénesis media, organogénesis tardía y eclosión. *Revista Brasileira de Biologia*, v.45, n. ½, p.149-160, 1985.

FAUSTINO, M.; POWER, D. M. Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish. **Journal of fish Biology**, v.58, p. 537-572, 2001.

GEERTZ HANSEN, P.; RASMUSSEN, G. Influence of ochre and acidification on the survival and hatching of brown trout eggs (*Salmo trutta*). In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. (ed), **Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish**. Cambridge: FAO-Fishing new Books, 1994. 337p.

GISBERT, E.; MERINO, G.; MUGUET, J. B.; BUSH, D.; PIEDRAHITA, R. H.; CONKLIN, D. E. Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 1217-1229, 2002.

GODINHO, H.; FENERICH, N. A.; NARAHARA, M. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (VALENCIENNES, 1840) (SILURIFORMES, PIMELODIDAE). **Revista Brasileira de Biologia**, v.38, n.1, p. 151-156, 1978.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; CHIPARI GOMES, A. R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE). Uma revisão. *Ciência Rural*, v.30, n.1, p.179-185, 2000.

GONZAL, A. C.; ARALAR, E. V.; PAVICO, J. M. The effects of water hardness on the hatching and viability of silver carps (*Hypophthalmichthys molitrix*) eggs. **Aquaculture**, v.64, p.111-118, 1987.

GONZALEZ, R. J. Ion regulation in ion poor waters of low pH. In: VAL, A. L.; ALMEIDA – VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1996. 420 p.

GREENBERG A.E.; TARAS, M. J.; RAND, M.C. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 14th ed. Illinois: Springfield Bru-El Graphic, 1976. 310 p.

HUNT VON HERBING, I. H. Development of feeding structures in larval fish with different life histories: winter flounder and Atlantic cod. **Journal of fish Biology**, v.59, p. 767-782, 2001.

KETOLA, H. G.; LONGAGRE, D.; GREULICH, A.; PHETTERPLACE, L.; LASHOMB, R. High calcium concentration in water increases mortality of Salmon and Trout eggs. **The Progressive Fish Culturist**, v.50, p.129-135, 1988.

KJORSVIK, E.; HOEHNE-REITAN, K.; REITAN, K. I. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 227, p. 9-20, 2003.

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Living Resource**, v.9, p.59-80, 1996.

LINHART, O.; KUDO, S.; BILLARD, R.; SLECHTA, V.; MIKODINA, V. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. **Aquaculture**, v.129, p.75-93, 1995.

LOPES, J. M.; SILVA, L. V. F.; BALSISSEOTTO, B. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. **Aquaculture International**, v.9, n.1, p. 73-80, 2001.

MARTINEZ, G. M.; BOLKER, J. A. Embryonic and staging of summer flounder (*Paralichthys dentatus*). **Journal of morphology**, v.255, p.162-176, 2003.

MCDONALD, D. G.; HOBE, H.; WOOD, C.M. The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. **Journal of Fish Biology**, v.88, p.109-131, 1980.

MIHELAKAKIS, A.; YOSHIMATSU, T.; TSOLKAS, C. Spawning in captivity and early history of cultured Red porgy, *Pagrus pagrus*. **Aquaculture**, v.199, p. 333-352. 2001.

MOLOKWU, C. N.; OKPOKWASILI, G. C. Effect of water hardness on egg hatchability and larval viability of *Clarias gariepinus*. **Aquaculture International**, v.10, p.57-64, 2002.

OJANGUREN, A. F.; BRAÑA, F. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. **Journal of Fish Biology**, v.62, p.580-590, 2003.

PIPER, R. G.; MCELWAIN, I. B.; ORME, L. E.; MCCRAREN, J. P.; FOWLER, L. G.; LEONARD, J.R. **Fish hatchery management**. Washington: United States Department of the Interior Fish and Wildlife Service, 1982. 517p.

SHIELDS, R. J.; BROWN, N. P.; BROMAGE, N. R. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. **Aquaculture**, v. 155, p. 1-12, 1997.

SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I.; BALDISSEROTTO, B. Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. **Aquaculture**, v. 228, p. 279-287, 2003.

SILVA, L. V. F., GOLOMBIESKI, J. I., BALDISSEROTTO, B. submitted. Growth and survival of silver catfish, *Rhamdia quelen*, (Pimelodidae) larvae at different calcium and magnesium concentrations. **Neotropical Ichthyology**, v.3, n.2, p. 299-304, 2005.

TOWNSEND, C. R.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* exposed to different levels of water hardness. **Aquaculture**, v.215, p.103-108, 2003.

TUCKER, C. S.; STEEBY, J. A. A practical calcium hardness criterion for channel catfish hatchery water supplies. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 24, p.396-401, 1993.

VAN DER VELDEN, J. A.; GROOT, J. A.; FLIK, G.; POLAK, P.; KOLAR, Z. I. Magnesium transport in fish intestine. **Journal of Fish Biology**, v.152, p.587-592, 1990.

VIEIRA, V. L. A., JOHNSTON, I. A. Muscle development in the tambaqui, an important Amazonian food fish. **Journal of fish biology**, v.49, p. 842-853, 1996.

WURTS, W. A.; DURBOROW, R. M. Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds. **Aquaculture Program- SRAC publication**, 1992. 464 ed. 4 p.

CAPÍTULO 2

DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS MUCOSAS EM EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*), (HEPTATERIDAE, TELEOSTEI). INTERAÇÃO DO pH E CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO E MAGNÉSIO DA ÁGUA.

Resumo

A densidade das células mucosas pode ser influenciada pelas condições ambientais. O objetivo deste estudo foi verificar a distribuição das células mucosas em embriões e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*, e avaliar a possível influência do pH 7,0 (neutro) e 8,0 (alcalino) do ambiente de cultivo com diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} da água. Os ovos após fertilização (hpf) e as larvas após eclosão (hpe) foram cultivados em pH 7,0 e 8,0 com 3 diferentes concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} da água (mg L^{-1}): dureza 20 mg L^{-1} CaCO_3 (5,0 Ca^{2+} : 2,08 Mg^{2+} , controle) e dureza 70 mg L^{-1} CaCO_3 (20 Ca^{2+} :5,59 Mg^{2+} e 23 Ca^{2+} : 2,08 Mg^{2+}) a $24\pm 1^\circ\text{C}$. Ovos e larvas foram coletados para análise da distribuição das células mucosas (CM) na superfície corporal e brânquias. Nos embriões 24 hpf não foi observado CM na superfície do corpo. Entretanto, larvas 6-30 hpe as CM foram localizadas na região da superfície corporal (72-76%) e saco vitelínico (28-25%). A medida que a larva cresceu, o número de CM diminuiu no saco vitelínico até a completa ausência destas células nesta região em 48 hpe. De 48-216 hpe ocorreu um aumento no número das CM na região brânquial (3- 6%). Quando se considerou o padrão geral para a distribuição das CM somente para superfície corporal (cabeça e tronco+cauda) verificou-se que a região do tronco+cauda (54-62%) possuiu maior número de células do que a região da cabeça (38-44 %) em 6-30 hpe. Já em 48-216 hpe este padrão se modificou e a percentagem das CM foi semelhante nas duas regiões (cabeça: 48-49% e tronco+cauda: 52 e 51%). O número total de CM foi menor em pH 8,0 e o aumento da dureza da água diminuiu o número total de CM neste pH, contudo aumentou em pH 7,0. Portanto, os resultados sugerem que as células mucosas de larvas de *Rhamdia quelen* tendem a indicar uma distribuição uniforme na superfície do corpo (cabeça e tronco+cauda), principalmente após 48 hpe, sendo que ocorre um aumento do número de CM nas brânquias a partir de 48 hpe. As larvas desta espécie modulam o número de células mucosas de acordo com o ambiente de cultivo sugerindo uma adaptação a diferentes ambientes nas primeiras fases após eclosão, evidenciado pela interação com a dureza (principalmente com o aumento do Ca^{2+}) e também com o pH da água. Conseqüentemente, isto influencia indiretamente na osmorregulação.

Introdução

A compreensão das interações entre as variáveis químicas na qualidade da água e a condição biológica dos animais é de fundamental importância para o cultivo de peixes, principalmente nas primeiras fases do desenvolvimento animal uma vez que pode afetar a sobrevivência das larvas. Estas fases são críticas porque as estruturas e órgãos das larvas não estão completamente desenvolvidos e funcionais de forma a auxiliar na adaptação às novas condições ambientais (EVANS, 1993) tornando-as muito suscetíveis às variações do meio. A qualidade da água nos tanques de piscicultura é afetada dentre outros componentes químicos pelo pH e a dureza (WEDEMEYER, 1997). O pH atua diretamente na permeabilidade da membrana celular dos organismos interferindo no transporte iônico intra e extracelular (ARANA, 1997) e, portanto, o pH da água afeta profundamente a manutenção da homeostase (EVANS, 1993). Altas e baixas concentrações de H^+ podem produzir alterações histológicas e fisiológicas nas brânquias dos peixes (MCDONALD et al., 1991). Por exemplo, pHs ácidos (2,5-4,0) resultam em altas taxas de mortalidade em peixes e envolvem a estrutura branquial e também a uma produção excessiva de muco (WOOD et al., 1998). Entretanto, o aumento do nível iônico da água com sais de Ca^{2+} e Mg^{2+} melhora a sobrevivência de peixes expostos à pHs ácidos (MCDONALD et al., 1980) e também o aumento da salinidade da água estimula a produção de muco (SHEFARD, 1994; ROBERTS & POWEL, 2003).

A avaliação da ontogenia inicial de peixes fornece uma ampla base de dados para estudos comparativos do desenvolvimento morfológico em geral (BALON, 1990) que são de extremo interesse para a aqüicultura (BENGSTON, 1999).

As larvas de peixes possuem células na superfície do corpo que têm grande importância do ponto de vista osmorregulatório na fase inicial do desenvolvimento, **são**

elas, as células mucosas (CM) e células de cloreto (CC). As células mucosas possuem vesículas contendo glicoproteínas intracelulares neutras que são facilmente identificadas através de reação PAS (Periodic Acid Schiff, pH 2,5)-positiva, que é específica para mucinas presentes nessas células. Devido à delicada estrutura do epitélio de revestimento corporal, dos peixes a presença do muco sobre a superfície representa um importante mecanismo para prevenir injúrias e infecções, e, assim como nas brânquias possui propriedades multifuncionais de proteção, barreira física, química e imunológica (SHEFARD, 1994). Além disto, existem propostas que sugerem um possível potencial osmorregulatório para as CM nas larvas de peixes teleósteos (VARSAMOS et al., 2005).

O jundiá, *Rhamdia quelen*, tem ampla distribuição geográfica na América do Sul sendo encontrado desde o Sudeste do México a Argentina Central, é um peixe com alto potencial produtivo e economicamente importante no Brasil (GOMES et al., 2000; BALDISSEROTTO & RADUNZ NETO, 2004). Estudos recentes mostraram que as larvas desta espécie têm maior sobrevivência quando cultivadas em pH 8,0 do que em pH 7,0 (LOPES et al., 2001) e melhor sobrevivência e crescimento em dureza entre 20-70 mg L⁻¹ CaCO₃, em pH 8,0, do que em níveis de dureza mais altos (150 mg L⁻¹ CaCO₃) nesse pH (TOWNSEND et al., 2003; SILVA et al., 2003, 2005).

Considerando que a ontogenia de peixes teleósteos tem sido intensivamente estudada (BOND, 1996), poucos dados sobre a distribuição de células mucosas são disponíveis nos estágios iniciais de desenvolvimento em peixes. Este trabalho teve como objetivo verificar a distribuição das células mucosas em embriões e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*, e avaliar a possível influência do pH 7,0 (neutro) e 8,0 (alcalino) do ambiente de cultivo, com diferentes concentrações de Ca²⁺ e Mg²⁺ da água.

Materiais e métodos

Os ovos de jundiá foram obtidos de desovas induzidas com uma injeção única de extrato hipofisário de carpa (fêmeas = 5 mg.kg⁻¹ e machos = 3 mg.kg⁻¹, de acordo com LEGENDRE et al., (1996) em fevereiro-2002 e março-2003 no setor de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria-RS. As análises posteriores ao cultivo foram feitas no laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da Universidade Federal de São Carlos-SP.

Após a fecundação artificial os ovos foram submetidos a dois experimentos: I) pH neutro (7,0) e II) alcalino (8,0) a 24 ± 1°C, temperatura adequada para sobrevivência da espécie (CHIPARI - GOMES et al., 2000). Em cada experimento os ovos e larvas foram expostos a 3 tratamentos (mg L⁻¹): 20 Ca²⁺ e 5,59 Mg²⁺ e 23 Ca²⁺ e 2,08 Mg²⁺, com dureza 70 mg L⁻¹ CaCO₃ e 5,0 Ca²⁺ e 2,08 Mg²⁺ (controle), sendo a água de abastecimento do laboratório, com dureza 20 mg L⁻¹ CaCO₃. A água de abastecimento das incubadoras e caixas foi previamente preparada em tanques com a adição de CaCl₂ e/ou MgCl₂ para alteração da dureza e o pH foi ajustado com fosfato de sódio monobásico (0,05M). O monitoramento do pH da água foi feito três vezes ao dia (Quimis, Q-400 A). A concentração de oxigênio dissolvido foi medida diariamente com oxímetro (YSI- modelo Y5512), a concentração de amônia total foi determinada utilizando o método de nesslerização e a amônia não ionizada foi calculada de acordo com PIPER et al (1982), a alcalinidade foi determinada por titulometria (precisão 4.0 mg L⁻¹ CaCO₃) (GREENBERG et al., 1976). A concentração de Na⁺ e K⁺ em cada tratamento foram medidas utilizando-se fotômetro de chama (Digimed modelo DM-61).

A densidade de estocagem de ovos e larvas foi de 600 ± 200 ovos L⁻¹ e 10 larvas L⁻¹, respectivamente. Cada tratamento continha três unidades experimentais, totalizando nove

incubadoras (4 L) e nove caixas de cultivo para larvas (40 L), mantidas com aeração artificial constante e sistema de cultivo fechado. Durante o período experimental de 7 dias após absorção do saco vitelínico as larvas receberam alimentação artificial com ração para larvas de jundiá descrita por SILVA et al (2005).

Os ovos foram coletados 24 h após fertilização (embrião-hpf) e as larvas em 6, 12, 30 e 48 e 216 h após eclosão (9 dias após a eclosão-hpe ou 7 dias de larvicultura) para análise da distribuição das CM. Os ovos e larvas foram fixados imediatamente após a coleta em glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2%. Após a fixação foram incluídos em historesina e posteriormente seccionados (3 μ m). As CM foram identificadas como as células do epitélio corporal em que se observou a coloração PAS-positiva (Periodic Acid Schiff). A localização das CM e análise quantitativa foi feita em perfil de 5 cortes sagitais/animal (4 animais/tratamento) e os dados foram expressos em mm de espessura/embrião ou larva (considerando a espessura dos cortes sagitais no total do perfil). As CM dos embriões e larvas foram quantificadas nas regiões da superfície corporal (onde considerou-se como corpo as regiões da cabeça, tronco + cauda), as regiões do saco vitelínico e brânquias foram quantificadas separadamente como indicado na Figura 1, utilizando um microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmara de vídeo e um computador através do programa C.A.S.T. System (Olympus, Denmark).

Para uma análise qualitativa e de identificação da superfície das células mucosas dos embriões e larvas foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM 940 A). As amostras foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura em série de álcool (50, 70, 80, 90, 95, 100% por 10 min) e diafanizadas em HMDS, e coladas ao suporte do microscópio com cola de prata e posteriormente cobertas com ouro.

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 3x2 (tratamentos

e pHs) com três repetições utilizando a análise de variância (ANOVA “Two way”). Sempre que diferenças foram detectadas foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância $p < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o “software” ESTAT (v.2.0).

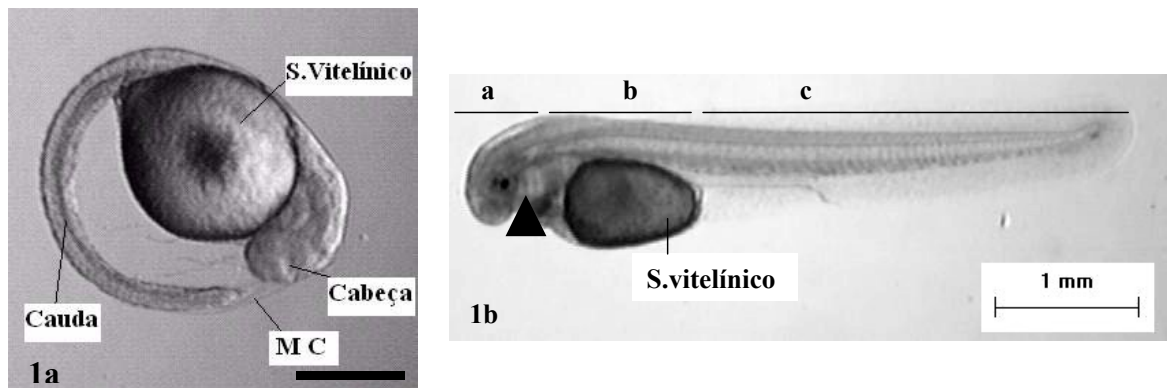


Figura 1- Regiões de contagem das células mucosas em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). 1a) Embrião (24 h após fertilização): cabeça, saco vitelínico e cauda. MC- membrana coriônica. 1b) Larva (6 h após eclosão, controle: pH 8,0): superfície corporal ou corpo- indicado por letras a (cabeça), b (tronco) e c (cauda). Região branquial (seta preta) e saco vitelínico (S. vitelínico). Escala = 1 mm

Resultados

Nos embriões 24 hpf não foi observado CM na superfície do corpo. Entretanto, nas larvas de jundiá as CM estavam presentes em 6-216 hpe e foi observado um mesmo padrão de distribuição das CM nas diferentes regiões do corpo e fase de desenvolvimento independente do pH e concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} (Figura 2). Em 6-30 hpe as CM foram localizadas na região da superfície corporal (72-76%) e saco vitelínico (28-25%). A medida que a larva cresceu, entre 6-30 hpe, o número de CM tende a diminuir no saco vitelínico até a completa ausência destas células nesta região em 48 hpe. A partir de 48 hpe foi observado CM na região brânquial (3-6%, respectivamente), entretanto foi verificado que o maior número destas

células encontrava-se na superfície corporal. Entre 48-216 hpe o número de CM na superfície corporal diminuiu enquanto que nas brânquias o número destas células aumentou.

Quando se considerou o padrão geral para a distribuição das CM somente para superfície corporal (cabeça e tronco+cauda) verificou-se que a região do tronco+cauda (54-62%) possuiu mais células do que a região da cabeça (38-44 %) em 6-30 hpe. Já em 48-216 hpe este padrão se modificou e a percentagem das CM foi semelhante nas duas regiões (cabeça: 48-51% e tronco+cauda: 52 e 49%) (Figura 3).

A Figura 4 mostra as células PAS-positiva para as CM em larvas de jundiá. CM também foram identificadas na região do esôfago em larvas de 48-216 hpe (Figura 4e), fase em que se iniciou a alimentação exógena. Através da microscopia eletrônica de varredura observaram-se as CM na superfície do corpo das larvas, bem como sua diferença com as células de cloreto (Figura 5).

Em pH 8,0, nas fases de 6, 30 e 48 hpe observou-se interação entre o pH e a concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ na água em relação ao número total de CM. O aumento da dureza da água resultou em uma diminuição no número total de CM em 6 hpe, já em 30 e 48 hpe somente o aumento do Ca^{2+} na água resultou em um menor número de CM totais em relação ao controle. Contudo, em pH 7,0 também ocorreu interação nestas fases, exceto em 30 hpe e ao contrário do pH 8,0, ocorreu um aumento do número de CM totais em relação ao aumento do Ca^{2+} na água. O número total de CM foi maior em pH 7,0 do que em pH 8,0 nas fases de 12 e 216 hpe. (Tabela 1). A Figura 6 mostra o número total de CM em função das fases após a eclosão em pH 7,0 e 8,0 evidenciando um padrão semelhante do número de CM totais ao longo do desenvolvimento, exceto em 12 hpe.

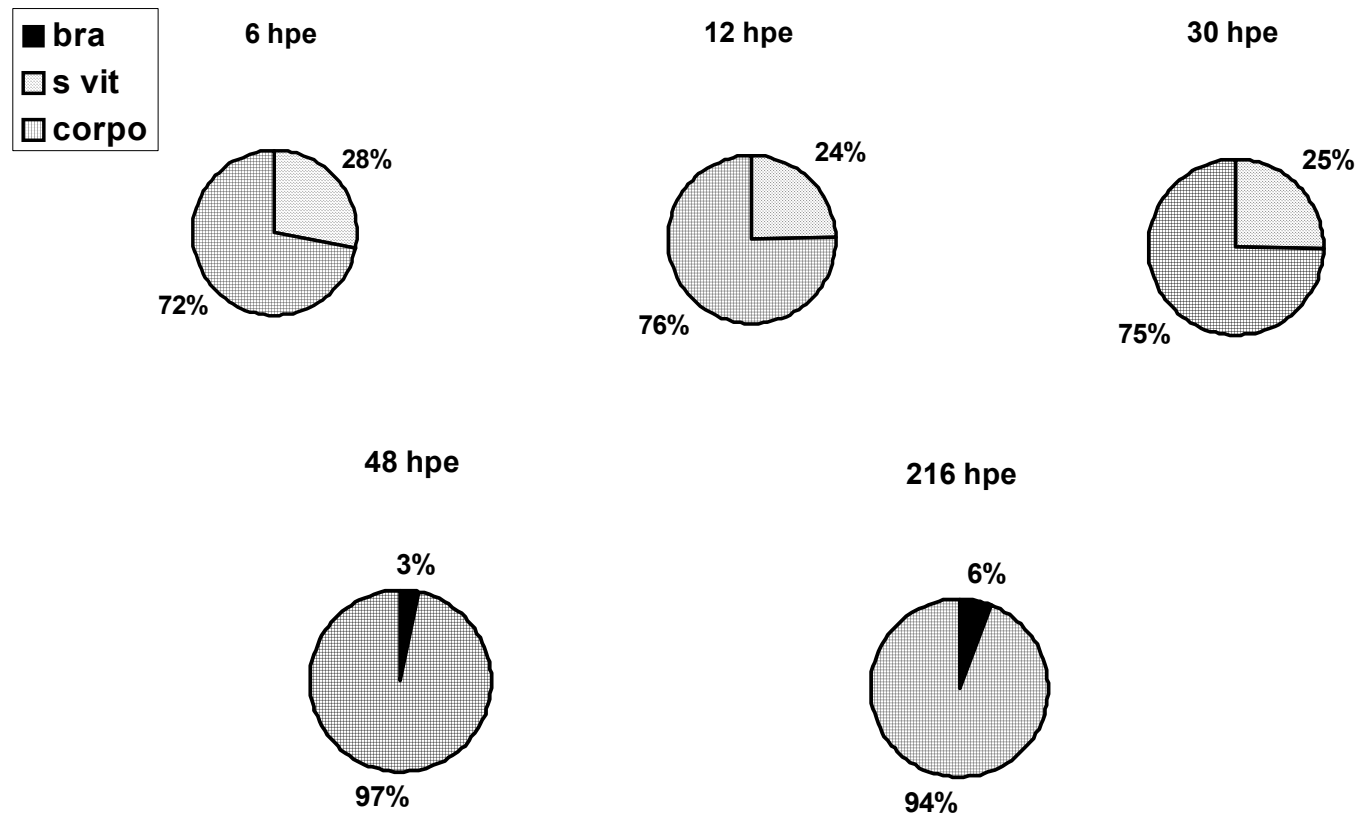


Figura 2- Padrão geral de distribuição das células mucosas em larvas após eclosão (6, 12, 30, 48 e 216 hpe) de jundiá (*Rhamdia quelen*). bra= brânquias; s vit= saco vitelínico; corpo= superfície corporal.

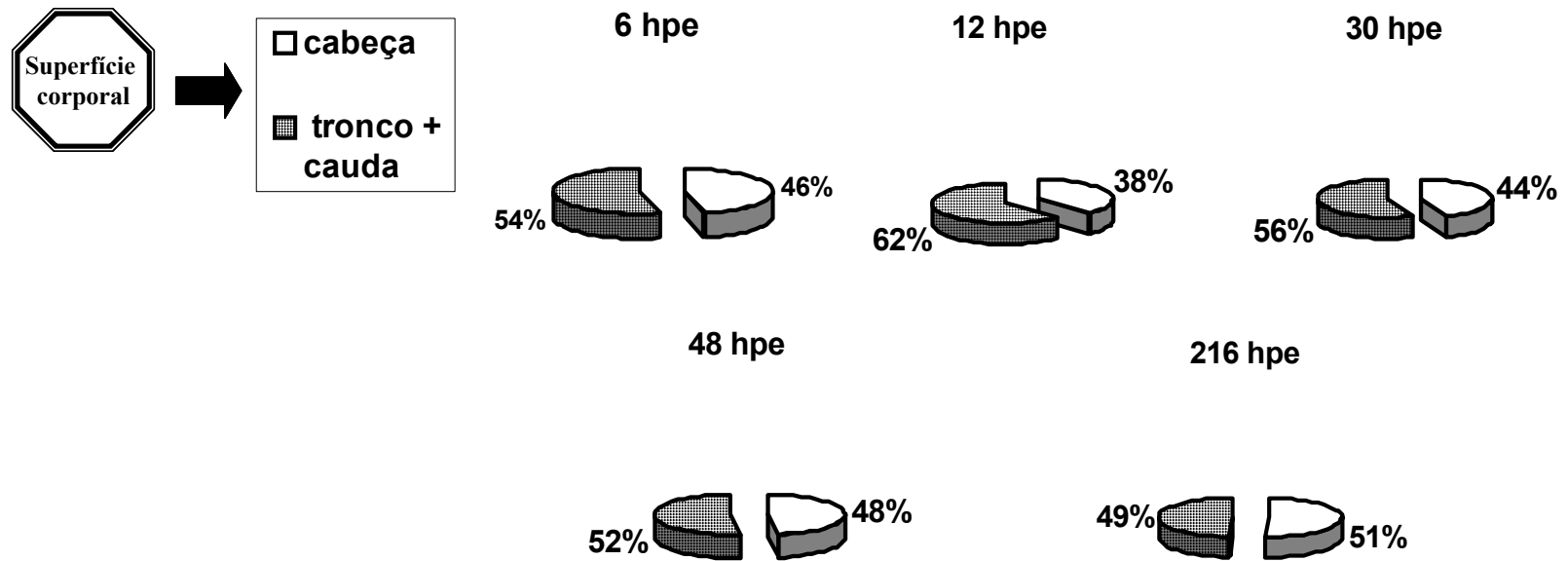


Figura 3- Distribuição geral das células mucosas na superfície corporal (cabeça, tronco+cauda) em larvas após eclosão (6, 12, 30, 48 e 216 hpe) de jundiá (*Rhamdia quelen*).

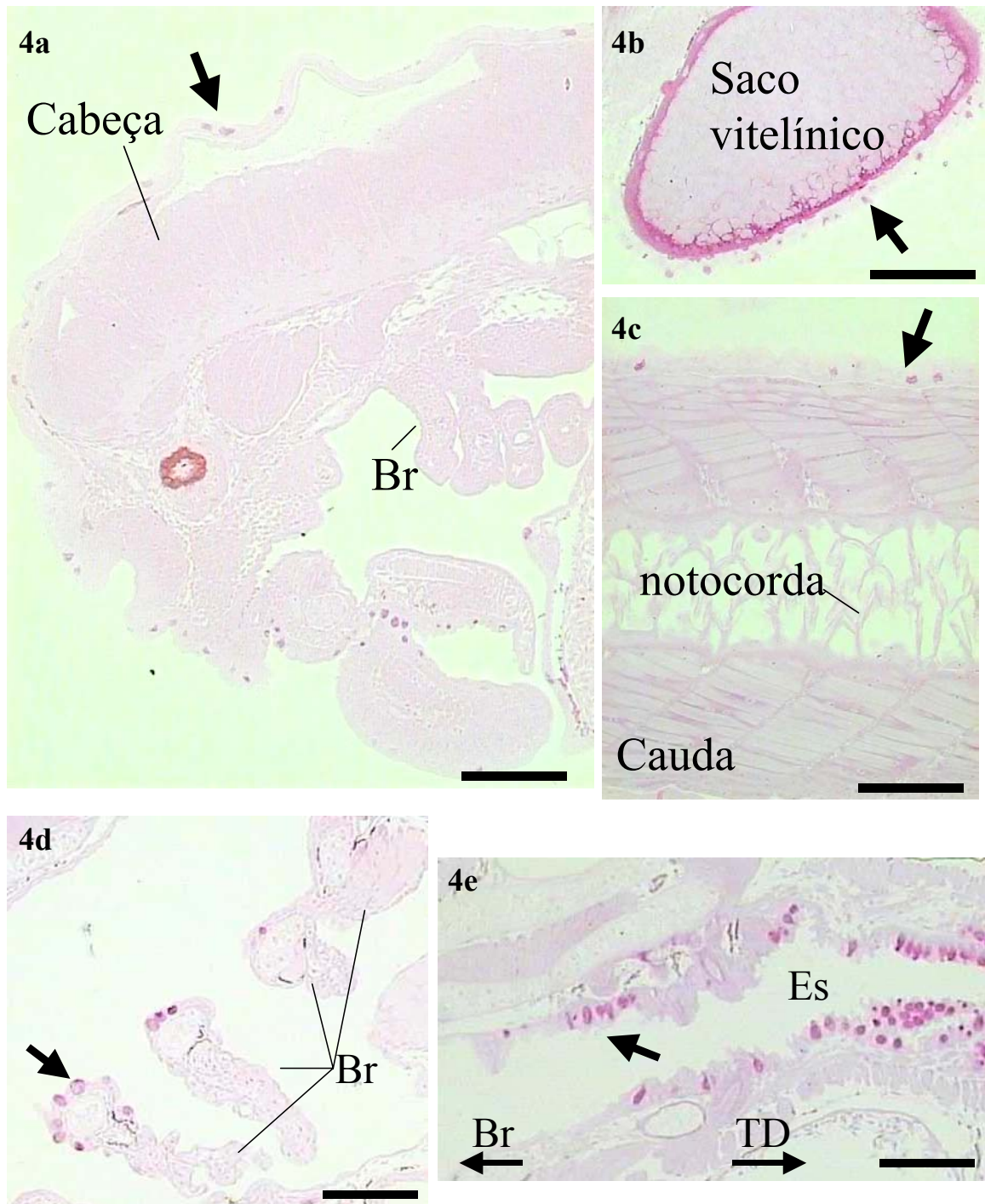


Figura 4- Coloração-PAS positiva para células mucosas em larva de jundiá (*Rhamdia quelen*). 4a-c) Larva 6 h após eclosão: 4a) Cabeça. Notar ausência destas células nas brânquias (Br); 4b) Saco vitelínico; 4c) Cauda. 4d-e). Larva 216 h após eclosão: 4d) Brânquias; 4e) Esôfago (Es). Setas inclinadas em todas as figuras indicam célula mucosa. Setas horizontais na base da figura 4e indicam a posição deste órgão em relação às brânquias (Br) e trato digestivo (TD). Escala= 1mm.

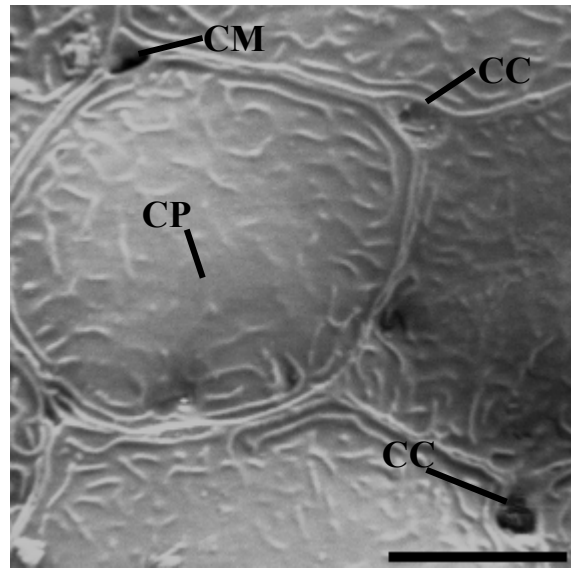


Figura 5- Célula mucosa de *Rhamdia quelen* em microscopia eletrônica de varredura. Imagem da região da cabeça em larvas 6h após a eclosão em água controle com pH 8,0 (25 KV, 2500x). Note a diferença da célula mucosa (CM, orifício) e das células de cloreto (CC, orifícios com pequenas vilosidades). CP = célula pavimentosa. Escala = 6 μ m.

Tabela 1 - Número total de células mucosas (CM) no estágio embrionário e larval 6, 12, 30, 48 e 216h após eclosão de jundiá (*Rhamdia quelen*) em pH 7,0 e 8,0 com diferentes concentrações de cálcio e magnésio da água. n=4 animais/tratamento. hpf- horas após fertilização. hpe- horas após a eclosão.

Estágio de desenvolvimento		Células mucosas totais (mm ⁻¹)					
	Tempo (h)	pH 7,0			pH 8,0		
		Ca ²⁺ : Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)			Ca ²⁺ : Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)		
		5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
Embrionário	(hpf) 24	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00
Após eclosão	(hpe)						
	6	15049 ± 900 ^{a#}	18288±1423 ^{a#}	27843±2178 ^{b#}	26421±889 ^{a#}	12577±289 ^{b#}	17021±858 ^{b#}
	12	23754±5962	45310±6569	48866±3414	20133±481 [*]	15954±5378 [*]	22221±6101 [*]
	30	31710±2909	37109±701	33666±290	38199±2748 ^{a#}	32733±1674 ^{a#}	16754±1698 ^{b#}
Alimentação	48	23242±1756 ^{a#}	24731±2295 ^{a#}	34287±2284 ^{b#}	20176±924 ^{a#}	26065±1293 ^{ab#}	18865±1584 ^{b#}
Exógena	216	18488±2711	22287±1311	20554±3072	16265±1999 [*]	13287±2098 [*]	13665±1266 [*]

Dureza da água- ¹ 20 mg L⁻¹ CaCO₃- controle. ² 70 mg L⁻¹ CaCO₃- com variação da concentração de Ca²⁺:Mg²⁺ (mg L⁻¹)- Letras diferentes no tempo indicam diferença significativa das média±erro padrão entre as concentração de Ca²⁺:Mg²⁺ em cada pH (p<0,05). * diferença significativa entre média±erro padrão do pH 8,0 em relação ao pH 7,0 (p<0,05). # interação entre pH e Ca²⁺:Mg²⁺ -mg L⁻¹.

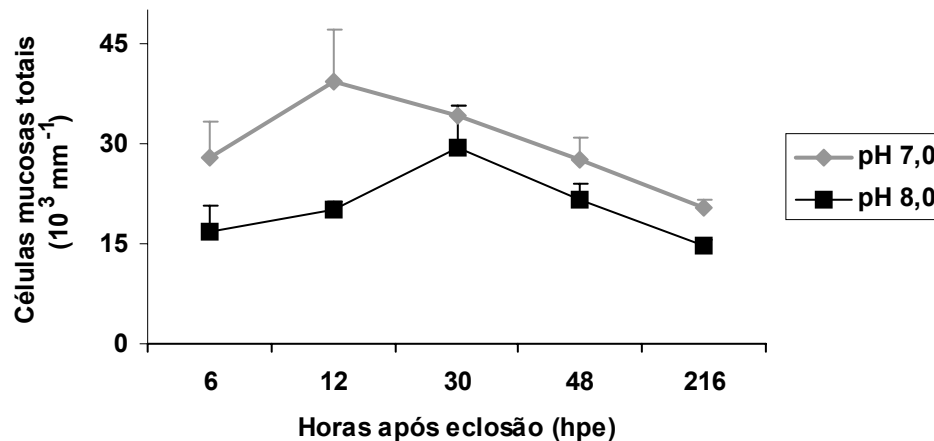


Figura 6- Número total das células mucosas em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) 6, 12, 30, 48 e 216 h após a eclosão em pH 7,0 e 8,0. Pontos indicam média (\pm EPM) das concentrações de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ em ambos pHs 7,0 e 8,0. Linhas indicam a tendência.

Discussão

Neste estudo a distribuição das CM não foi influenciada pelo pH ou concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ da água. Entretanto, o número total de CM das larvas de jundiá foi alterado pelo ambiente de cultivo.

HENRIKSON & MATOLTSY (1968) indicaram que as células mucosas em teleosteos variam de acordo com a espécie, bem como a densidade e distribuição destas células também podem variar nas diferentes regiões do corpo. HENRIKSON & MATOLTSY (1968) e KAWEEWAT & HOFER (1997) mencionam que em geral o maior número de células mucosas são encontrados no epitélio da superfície corporal, e que isto está relacionado com camada de muco necessária para a proteção da epiderme do corpo em ambiente aquático devido aos peixes não possuírem a camada de células queratinizadas (característica de vertebrados). A superfície corporal (principalmente a região do tronco+cauda) parece ser o principal local envolvido com a produção de muco na fase inicial de vida do jundiá, e tendem

a uma distribuição uniforme ao longo do desenvolvimento. Os dados do presente estudo corroboram com KAWEEWAT & HOFER (1997) que estudaram as células mucosas na epiderme corporal de larvas de dois ciprinídeos (*Phoxinus phoxinus* e *Chalcalburnus chalcoides*) enfatizaram que o número de células mucosas na superfície corporal destas larvas (comprimento inicial de 4 mm) diminui ao longo do desenvolvimento e permaneceram praticamente constante com o crescimento das larvas (13-18 mm). Além disto o número de células mucosas no saco vitelínico foi reduzindo ao longo do tempo em larvas de jundiá, assim como em *Phoxinus phoxinus* e *Chalcalburnus chalcoides*.

Entretanto, as células mucosas na região branquial surgiram a partir de 48 hpe, o que possivelmente indica que as brânquias se tornam mais desenvolvidas, e que a produção de muco também auxilia na proteção do epitélio branquial. Nesta mesma fase foram identificadas CM no esôfago, o que sugere a funcionalidade do trato digestivo em função do desenvolvimento e adaptação a alimentação exógena em que o muco favorece o movimento do alimento e proteção do epitélio. FERRARIS et al (1987) analisando o desenvolvimento e histologia do trato digestivo de larvas de “milkfish” (*Chanos chanos*, Gonorynchiformes) verificou a presença de células mucosas no esôfago a partir de 72 horas após a eclosão, e sugeriu que mudanças morfológicas e histoquímicas deste órgão estão relacionadas ao desenvolvimento. FLORES QUINTANA et al (2004) observaram as características histológicas da parte anterior do tubo digestivo de juvenis de *R. quelen* e mencionaram que as células mucosas do esôfago desta espécie são do tipo secretoras de mucosubstâncias neutras, viscosas e adesivas que atraem partículas e água, e este órgão também pode participar na retenção de alimentos maiores devido a sua elasticidade.

Estudos anteriores verificaram que quanto mais ácido o pH maior é a produção de muco em peixes, conseqüentemente devido ao aumento do número de células mucosas (WOOD et al., 1998). As condições ambientais adversas incluindo chuva ácida, tóxicos dissolvidos,

mudança da salinidade, temperatura, manejo e muitas doenças podem resultar no aumento da camada de muco (BUCHER & HOFER, 1993). LEONARDO et al (2001) e BRESEGHELO et al (2004) sugerem que o aumento de células mucosas também pode ser considerado como uma resposta adaptativa a determinados ambientes com a presença de possíveis estressores (metais, etc) ou também pela deficiência de vitamina C na ração, quando em ambas situações não se detecta mortalidade ou mudança de comportamento dos indivíduos. TAKASHIMA & HIBIYA, (1995) indicam que a alteração na produção de muco em peixes é um indicativo para respostas defensivas relacionadas ao meio ambiente. Portanto, podemos inferir que o aumento da produção de células mucosas em pH neutro pode ser um indicativo de que as larvas de Jundiá possivelmente estão em condições menos favoráveis do que em pH alcalino da água de cultivo.

O menor número de CM em pH 8,0 parece ser uma condição adequada para as larvas de jundiá pois, autores trabalhando com a mesma espécie demonstraram que o pH 8,0 é o indicado para o cultivo intensivo desta espécie (LOPES et al., 2001), e TOWNSEND et al (2003) e SILVA et al (2003, 2005) obtiveram melhor crescimento das larvas em durezas entre 20-70 mg L⁻¹ CaCO₃. Entretanto, SILVA et al (2003, 2005) sugeriram que alguns efeitos deletérios observados em larvas de jundiá estão relacionados principalmente ao aumento do Ca²⁺ e não do Mg²⁺ na água e que larvas de jundiá toleram no máximo 20 mg L⁻¹ de Ca²⁺ na água inclusive em dureza da água 70 mg L⁻¹ CaCO₃. Neste estudo, o aumento do Ca²⁺ também sugere maior influência do que o Mg²⁺ da água com relação a densidade total de CM nas larvas de *R. quelen*.

Considerando as interações com a dureza da água, o pH 8,0 evidencia uma relação clara de que o aumento da concentração de Ca²⁺ diminui o número de CM em larvas de jundiá, ao contrário do pH 7,0 que indica que o aumento do Ca²⁺ na água proporcionou aumento do número total de CM, sugerindo a influencia da disponibilidade de íons na água

sobre estas células nas fases iniciais após a eclosão (principalmente 6 hpe). Contudo, destaca-se o efeito do pH da água, pois ocorreu uma proliferação diferenciada das CM em ambos pHs em relação ao aumento da dureza, principalmente com o aumento do Ca^{2+} , isto possivelmente retrata que a densidade total de CM é influenciada pelo meio de cultivo logo nas primeiras horas após a eclosão em larvas de jundiá.

BONGA & VAN DER MEIJ (1981) mencionaram que a abundância de CM na superfície corporal de peixes pode estar relacionada à baixa concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} ambiental. Contudo, O'BYRNE-RING et al (2003) mostraram que o número de CM diminui na epiderme de salmão do Atlântico (*Salmo salar*, Salmoniformes) antes da fase de transição para a migração para água salgada, sugerindo uma adaptação à água com maior concentração iônica. De acordo com VARSAMOS et al (2005) possivelmente existe uma influência indireta das células mucosas na osmorregulação, em função da disponibilidade iônica do ambiente. Uma razão que possibilita a inferência de que o muco pode auxiliar na regulação iônica é que a maioria das glicoproteínas possuem pH ácido ou próximo ao neutro e conseqüentemente o muco pode proporcionar trocas iônicas (POWELL et al., 1994). SHEPHARD (1982) sugere que em geral o muco não é uma barreira significativa para impedir a difusão de água, e indica que o muco participa da osmorregulação, devido a possível influência sobre o gradiente iônico na superfície dos epitélios.

ROBERTS & POWEL (2003) avaliando o fluxo iônico branquial e a mudança histoquímica das CM em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) sob os efeitos da salinidade e a presença de doenças (amebíase) na água de cultivo indicam que ocorreu um aumento do número de CM quando os peixes foram aclimatados a água do mar e expostos a doença. Estes autores verificaram uma mudança bioquímica do muco das CM, de mucinas neutras em água doce para mucinas neutras e ácidas em água salgada, e propõem que o muco além da proteção também atua na ionoregulação. Neste contexto, sugere-se a participação indireta das CM na

osmorregulação das larvas de jundiá nas primeiras fases após aclosão em função da interação com o ambiente, entretanto não foi avaliado, a composição bioquímica do muco das CM neste estudo. Portanto, parece que as células mucosas (em função do muco) podem participar da osmorregulação com as células de cloreto no desenvolvimento ontogenético inicial das larvas de peixes (VARSAMOS et al., 2005).

Outro fator importante a ser considerado é a relação neuroendócrina não totalmente funcional na fase inicial de vida das larvas, e isto pode influenciar na adaptação a diferentes ambientes, devido à participação dos hormônios que auxiliam na osmorregulação (BONGA, 1997). Segundo MARSHALL (1976), a prolactina que atua na osmorregulação em peixes tem sido associada à regulação iônica epitelial, pois influencia na proliferação de CM, em que baixas concentrações deste hormônio induzem a um maior número de CM em peixes. FLIK et al (1984) demonstraram que a calmodulina presente no muco de peixes, é uma proteína que aumenta a ligação do Ca^{2+} presente na água com o muco e que isto pode estar indiretamente envolvido com a absorção deste íon, aumentando o gradiente iônico e favorecendo a absorção.

Conclusão

Os resultados sugerem que as células mucosas de larvas de *Rhamdia quelen* tendem a uma distribuição uniforme na superfície do corpo (cabeça e tronco+cauda), principalmente após 48 h após eclosão. Na superfície branquial o número de células mucosas aumenta a partir de 48 hpe.

As larvas desta espécie modulam o número de células mucosas de acordo com o ambiente de cultivo sugerindo uma adaptação a diferentes ambientes nas primeiras fases após eclosão, evidenciado pela interação com a dureza (principalmente com o aumento do Ca^{2+}) e também com o pH da água. Conseqüentemente, isto influencia indiretamente na osmorregulação.

Referências Bibliográficas

ARANA, L. V. **Princípios Químicos de Qualidade da Água em Aqüicultura uma Revisão para Peixes e Camarões**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1997. 166p.

BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2004. 232 p.

BALON, K. Epigenesis of an epigenecist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. **Guelph Ichthyological Review**, v. 4, p.1-42, 1990.

BENGSTON, D. A. Aquaculture of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): status of knowledge, current research and future research priorities. **Aquaculture**, v.176, p.39-49,1999.

BOND, C. E. **Biology of Fishes**. Fort Worth: Saunders College, 1996.

BONGA, S. E. W.; VAN DER MEIJ, J. C. A. Effect of ambient osmolarity and calcium on prolactin cell activity and osmotic water permeability of the gills in the telost *Sarotherodon mossambicus*. **Genetic Comparative Endocrinology**, v.43, p.432-442, 1981.

BONGA, S. E. W. The stress in fish. **Physiological Reviews**, v.77, p.591-625, 1997.

BRESEGHELO, L.; CARDOSO, M. P.; BORGES-DEOLIVEIRA, R.; COSTA, M. F.; BARRETO, J. C. B.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; YAMADA, Á. T. Effects of sodium fluoride in gill epithelium of Guppy fish (*Poecilia vivipara*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p.274-280, 2004.

BUCHER, F.; HOFER, R. Histopathological effects of sublethal exposure to phenol on two variously pré-stressed populations on bullhead (*Cottus gobio* L.). **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, v.51, p.309-316, 1993.

CHIPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperature for *Rhamdia quelen* larvae (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, p.1069-1071, 2000.

EVANS, D. H. Osmotic and ionic regulation. In: **The physiology of fishes**. CRC Press:1993, p.315-341.

FERRARIS, R. P.; TAN J. D; DE LA CRUZ, M. C. Development of the digestive tract of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): Histology and histochemistry. **Aquaculture**, v. 61, n. 3-4, p. 241-257, 1987.

FLIK, G.; VAN RIJS, H.; WENDELAAR BONGA, S. E. Evidence for the presence of calmodulin in fish mucus. **European Journal Biochemistry**, v.138, p.651-654, 1984.

FLORES QUINTANA, C.; DOMITROVIC, H.; HERNÁNDEZ, D. P.; GIANISELLI, M.; KACZUBA, C. Características histológicas del segmento anterior del tubo digestivo del bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*). In: **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, Universidade Nacional do Nordeste, v. 40, 2004.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; CHIPARI-GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biología do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural** (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science), v.30, p.179-185, 2000.

GREENBERG A. E.; TARAS, M. J.; RAND, M. C. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 14th ed. Illinois: Springfield Bru-El Graphic, 1976. 310 p.

HENRIKSON, R. C.; MATOLTSY, A. G. The fine structure of teleost epidermis: Mucus cell. **Journal Ultrastructure Research**, v.21, p.213-221, 1968.

KAWEEWAT, K.; HOFER, R. Effect of UV-B radiation on goblet cells in the skin of different fish species. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 41, p. 222-226, 1997.

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Living Resource**, v.9, p.59-80, 1996.

LEONARDO, J. M. L. O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; NATALI, M. R. M., VOLSKI, T.; CAVICHIOLO, F. Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 863-870, 2001.

LOPES, J. M.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. **Aquaculture International**, v.00, p.1-8, 2001.

MARSHAL, W. S. Effects of hypophysectomy and ovine prolactin on the epithelial mucus-secreting cells of the Pacific staghorn sculpin, *Leptocottus armatus* (Teleostei: Cottidae). **Canadian Journal of Zoology**, v.54, p.1604-1609, 1976.

MCDONALD, D. G.; HOBE, H.; WOOD, C. M. The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. **Journal Experimental Biology**, v. 88, p.109-131, 1980.

MCDONALD, D. G.; FREDA, J.; CAVDEK, V.; GONZALEZ, R.; ZIA, S. Interspecific differences in gill morphology of freshwater fish in relation to tolerance of low-pH environments. **Physiological Zoology**, v.102, p.124-144, 1991.

O'BYRNE-RING, N.; DOWLING, K.; COTTER, D.; WHELAN, K.; MACEVILLY, U. Changes in mucus cell numbers in the epidermis of the Atlantic salmon at the onset of smoltification. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.1625-1630, 2003.

PIPER, R. G.; MCELWAIN, I. B.; ORME, L. E.; MCCRAREN, J. P.; FOWLER, L. G.; LEONARD, J.R. **Fish hatchery management**. Washington: United States Department of the Interior Fish and Wildlife Service, 1982. 517p.

POWELL, M. D.; SPEARE, D. J.; WRIGHT, G. M. Comparative ultrastructural morphology of lamellar epithelial, chloride and mucous cell glycocalyx of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill. **Journal Fish Biology**, v. 44, p.725-730, 1994.

ROBERTS, S. D.; POWELL, M. D. Comparative ionic flux and gill mucous cell Histochemistry: effects of salinity and disease status in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 134 (A), p. 525–537, 2003.

SHEPHARD, K. L., The influence of mucus on the diffusion of ions across the oesophagus of fish. **Physiological Zoology**, v. 55, p.401-429, 1982.

SHEFARD, K. L. Functions for fish mucus. **Review Fish Biology for Fisheries**, v.4, p.401-429, 1994.

SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I.; BALDISSEROTTO, B. Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. **Aquaculture**, v. 228, p.279-287, 2003.

SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of silver catfish larvae, *Rhamdia quelen*, (Heptapteridae) at different calcium and magnesium. **Neotropical Ichthyology**, v.3, p.299-304, 2005.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An Atlas of Fish Histology**. Normal and Pathological Features. 2 ed. Tokio: Kodanska, 1995.

TOWNSEND, C. R.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different levels of water hardness. **Aquaculture**, v.215, p.103-108, 2003.

VARSAMOS, S.; NEBEL, C.; CHARMANTIER, G. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.141A, p.401-429, 2005.

WEDEMEYER, G. A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C. B. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge, 1997. 278p.

WOOD, C. M.; WILSON, R. W.; GONZALEZ, R. J.; PATRICK, M. L.; BERGMAN, H. L.; NARAHARA, A.; VAL, A. L. Responce of na Amazonian Teleot, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremaly soft water. **Physiological Zoology**, v. 71, n. 6, p.658-670, 1998.

CAPÍTULO 3

DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS DE CLORETO EM EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen* (HEPTAPTERIDAE, TELEOSTEI). INTERAÇÃO DO pH E CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO E MAGNÉSIO NA ÁGUA

Resumo

Mudanças no pH e/ou concentração de íons na água podem proporcionar alterações fisiológicas nos estágios iniciais de desenvolvimento envolvendo principalmente as células de cloreto. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição de células de cloreto (CC) e atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase no desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen* em pH neutro e alcalino em diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} na água. Após a fertilização os ovos foram mantidos em água com pH 7,0 e 8,0 com 3 diferentes concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} da água (mg L^{-1}): dureza 20 mg L^{-1} CaCO_3 (5,0 Ca^{2+} : 2,08 Mg^{2+} , controle) e dureza 70 mg L^{-1} CaCO_3 (20 Ca^{2+} : 5,59 Mg^{2+} e 23 Ca^{2+} : 2,08 Mg^{2+}) a $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Os ovos foram coletados 24 h após fertilização (hpf) e as larvas em 6, 12, 30, 48 e 216 h após eclosão (hpe), para análises da distribuição das CC, concentração de íons corporal e atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase. A imunoreatividade para Na^+/K^+ -ATPase nas CC da superfície corporal e brânquias foi observada em 6-216 hpe após eclosão. Em 6 e 12 hpe, a maioria das CC foram localizadas na superfície corporal (55 e 44%) e saco vitelínico (34 e 32%). Entre 30-48 hpe, estas células localizavam-se no epitélio da cavidade branquial (20-29%) e brânquias (19-43%). Em 216 hpe, a maioria das CC foi observada nas brânquias (66%). O número total de CC foi maior em pH 7,0 e a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase foi menor do que em pH 8,0. A elevação da dureza na água aumentou a atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase, mas ocorreu diminuição de íons Na^+ e K^+ corporal principalmente em pH 7,0 na maior concentração de Ca^{2+} na água. A maior atividade da Na^+/K^+ -ATPase foi nas larvas cultivadas em alta concentração de Ca^{2+} na água. Os resultados sugerem que o aumento da concentração de Ca^{2+} (23 mg L^{-1}) na água em ambos pHs, não é o mais adequado para o cultivo das larvas de *Rhamdia quelen*. Entretanto, o pH 8,0 é indicado para esta espécie. As larvas expostas ao pH 7,0 apresentaram maior número de CC do que pH 8,0 e a dureza da água influenciou na densidade total de células de cloreto nas primeiras fases após eclosão (6-12 hpe), ocorrendo uma diminuição no número destas células em ambos pHs.

Introdução

Os peixes de água doce podem absorver Ca^{2+} e Mg^{2+} diretamente da água pelas brânquias ou da alimentação via intestino (WURTS & DURBOROW, 1992; BALDISSEROTTO & MIMURA, 1995; BIJEVELDS et al., 1998; FLIK et al., 1993). Estes íons são os principais constituintes da dureza da água sendo que o Ca^{2+} tem papel fundamental na regulação iônica, reduzindo a permeabilidade das membranas biológicas e, conseqüentemente, o fluxo difusivo de íons para o meio aquático (GONZAL et al., 1987; WURTS & DURBOROW, 1992; GONZALEZ, 1996). Já o Mg^{2+} participa ativamente de muitos processos celulares tais como síntese de proteínas, divisão celular, crescimento e homeostase (VAN DER VELDEN et al., 1990). Assim a elevação da dureza da água (adição de sais de Ca^{2+} e Mg^{2+}) em ambientes cujas águas são extremamente moles pode contribuir para diminuir o gasto metabólico da regulação iônica e osmótica dos peixes e protegê-los contra as alterações de pH, comuns em ambientes naturais e, principalmente, em sistemas de cultivo (WOOD, 2001).

Vários estudos têm demonstrado que o aumento da dureza da água aumenta a sobrevivência de algumas espécies de peixes (MCDONALD et al., 1980) principalmente durante os primeiros estágios de desenvolvimento (GONZAL et al., 1987; KETOLA et al., 1988; TUCKER & STEEBY, 1993; MOLOKWU & OKPOKWASILI, 2002).

As células de cloreto (CC), caracterizadas por possuírem numerosas mitocôndrias e unidades da enzima Na^+/K^+ -ATPase (DANG et al., 2000; HIROSE et al., 2003), são responsáveis pela absorção do Ca^{2+} , Na^+ e Cl^- nas brânquias de teleósteos de água doce (FLIK et al., 1993). Estas células têm sido descritas também no epitélio opercular, cavidade bucal e faringiana e na pele de algumas espécies de peixes (HWANG & HIRANO, 1985; HWANG, 1990; HWANG et al., 1994; LI et al., 1995). Durante o desenvolvimento embrionário e larval

estas células podem ser encontradas no epitélio do saco vitelino de embriões e distribuídas na superfície corpórea e epitélio branquial (ALDERDICE, 1988). No final da absorção do saco vitelino ocorre alteração na distribuição e no número das CC (ROMBOUGH, 1999) que pode variar em função das condições ambientais (FERNANDES et al., 1996, 1998).

O uso de calcáreo em sistemas de cultivo de organismos aquáticos para aumentar a dureza e/ou pH da água pode ser constituído de concentrações diferentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} , nesses sistemas as concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} e o pH são fatores que podem aumentar a sobrevivência e o crescimento larval (SILVA et al., 2005). A resistência de ovos e larvas de peixes de água doce em diferentes pHs tem interesse básico e aplicado na aquicultura (WILKIE & WOOD, 1994; HEATH, 1995; ROMBOUGH, 1999), pois concentrações altas e baixas do íon H^+ no meio aquático podem causar alterações morfofuncionais principalmente nas brânquias dos peixes (MCDONALD et al., 1991). Assim o estudo da distribuição e do número de CC nos estágios embrionários e larvais de peixes em diferentes condições de pH e dureza do meio aquático é de grande importância na avaliação do possível papel destas células no processo de adaptação e sobrevivência de larvas em ambiente natural e de cultivo.

O jundiá, *Rhamdia quelen*, tem ampla distribuição geográfica na América do Sul sendo encontrado desde o Sudeste do México a Argentina Central e é um peixe com alto potencial produtivo e economicamente importante no Brasil (GOMES et al., 2000, BALDISSEROTTO & RADUNZ NETO, 2004). Estudos recentes mostraram que as larvas desta espécie têm maior sobrevivência quando cultivadas em pH 8,0 do que em pH 7,0 (LOPES et al., 2001) e melhor sobrevivência e crescimento em dureza entre 20-70 mg L^{-1} CaCO_3 em pH 8,0 do que em níveis de dureza mais altos (150 mg L^{-1} CaCO_3) nesse pH (TOWNSEND et al., 2003; SILVA et al., 2003, 2005). Neste contexto, para contribuir com o estudo da biologia desta espécie, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a distribuição de células de cloreto e a atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase durante o

desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen* em pH neutro e alcalino e em diferentes concentrações de cálcio e magnésio na água.

Materiais e métodos

Os ovos de jundiá foram obtidos de desovas induzidas com uma injeção única de extrato hipofisário de carpa (fêmeas = 5 mg.kg⁻¹ e machos = 3 mg.kg⁻¹, de acordo com LEGENDRE et al (1996) em fevereiro-2002 e março-2003 no setor de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria-RS. As análises posteriores ao cultivo foram feitas no laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, Universidade Federal de São Carlos-SP.

Após a fecundação artificial os ovos foram submetidos a dois experimentos: I) pH neutro (7,0) e II) alcalino (8,0) a 24 ± 1°C, temperatura adequada para sobrevivência da espécie (CHIPARI-GOMES et al., 2000). Em cada experimento os ovos e larvas foram expostos a 3 tratamentos (mg L⁻¹): 20 Ca²⁺ e 5,59 Mg²⁺ e 23 Ca²⁺ e 2,08 Mg²⁺, com dureza 70 mg L⁻¹ CaCO₃ e 5,0 Ca²⁺ e 2,08 Mg²⁺ (controle), sendo a água de abastecimento do laboratório, com dureza 20 mg L⁻¹ CaCO₃.

Cada tratamento continha três unidades experimentais, totalizando nove incubadoras (4 L) e nove caixas de cultivo para larvas (40 L), mantidas com aeração artificial constante e sistema de cultivo fechado.

A água de abastecimento das incubadoras e caixas foi previamente preparada em tanques com a adição de CaCl₂ e/ou MgCl₂ para alteração da dureza e o pH foi ajustado com fosfato de sódio monobásico (0,05M). O monitoramento do pH da água foi feito três vezes ao dia (Quimis, Q-400 A). A concentração de oxigênio dissolvido foi medida diariamente com

oxímetro (YSI- modelo Y5512), a concentração de amônia total foi determinada utilizando o método de nesslerização e a amônia não ionizada foi calculada de acordo com PIPER et al (1982), a alcalinidade foi determinada por titulometria (precisão $4.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) (GREENBERG et al., 1976). A concentração de Na^+ e K^+ em cada tratamento foram medidas utilizando-se fotômetro de chama (Digimed modelo DM-61).

Os ovos foram coletados 24 h após fertilização (hpf - embrião) e as larvas em 6, 12, 30 e 48 e 216 h após eclosão (hpe, 9 dias após a eclosão ou 7 dias de larvicultura) para análise da distribuição das CC, concentração de íons corporal e atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase.

A localização da Na^+/K^+ -ATPase foi feita através de imunocitoquímica em ovos e larvas que foram fixados em Bouin, desidratados em etanol, incluídos em parafina e seccionados longitudinalmente ($10\mu\text{m}$). As células de cloreto (CC) foram identificadas por imunocitoquímica (anticorpo Ig $\alpha 5$: anti Na^+/K^+ -ATPase) de acordo com o método descrito por DANG et al (2000) com modificações. Após remoção da parafina as lâminas foram lavadas em tampão tris-salino com triton (TBSTX-0,5 M, NaCl- 1,54 M e 0,1 % de Triton X-100, diluído 1:10, pH 7,4) e as ligações não específicas foram bloqueadas com soro de cabra (20% por 20 min). Em seguida, as lâminas foram incubadas durante 15 horas com anticorpo anti Na^+/K^+ -ATPase (IgG $\alpha 5$, Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences, The University of Iowa, USA) diluído 1:300. Após a remoção do primeiro anticorpo foi adicionado o segundo anticorpo (IgG anti-mouse- GAM) com diluição 1:150 durante 1 h e, posteriormente a sua remoção, as lâminas foram incubadas por mais 1 h com a peroxidase anti-peroxidase (M/PAP, diluição 1:800). O excesso da peroxidase foi retirado com 2 banhos (10 min) em tampão tris: TB- 0.5 M (diluído 1:10) pH 7,4. Todo o processo foi realizado em temperatura ambiente ($20\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) em câmara escura e úmida. A localização do anticorpo (detecção das imuno-peroxidases) foi realizada utilizando coloração com solução de DAB ($0,05 \text{ mg l}^{-1}$ de 3-3-diaminobenzidina, diluído em tampão Tris (TB

diluído 1:10, pH 7,4) com sulfato de níquel II amônio (0,25%) em água oxigenada (0,015%) durante 6 min. A reação foi interrompida com banhos em água destilada (2x, 10 min). Em seguida as seções foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan.

As CC foram identificadas como células do epitélio do corpo em contato com o meio externo (água) em que se observou imunoreatividade da Na^+/K^+ -ATPase. A localização das CC e análise quantitativa foi feita em perfil de 5 cortes sagitais/animal e os dados foram expressos em mm^{-1} por espessura de embrião ou larva (considerando a espessura dos cortes sagitais no total do perfil). Foram utilizados 5 animais/tratamento. As CC dos embriões e larvas foram quantificadas nas regiões da superfície corporal (onde considerou-se como corpo as regiões da cabeça, tronco e cauda), o saco vitelínico, cavidade branquial e brânquias como indicado na Fig. 1, utilizando um microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmara de vídeo e um computador através do programa C.A.S.T. System (Olympus, Denmark).

Para uma análise qualitativa de identificação da superfície das células de cloreto dos embriões e larvas foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM 940 A). As amostras foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura em série de álcool (50, 70, 80, 90, 95, 100% por 10 min) e diafanizadas em HMDS, e coladas ao suporte do microscópio com cola de prata e posteriormente cobertas com ouro.

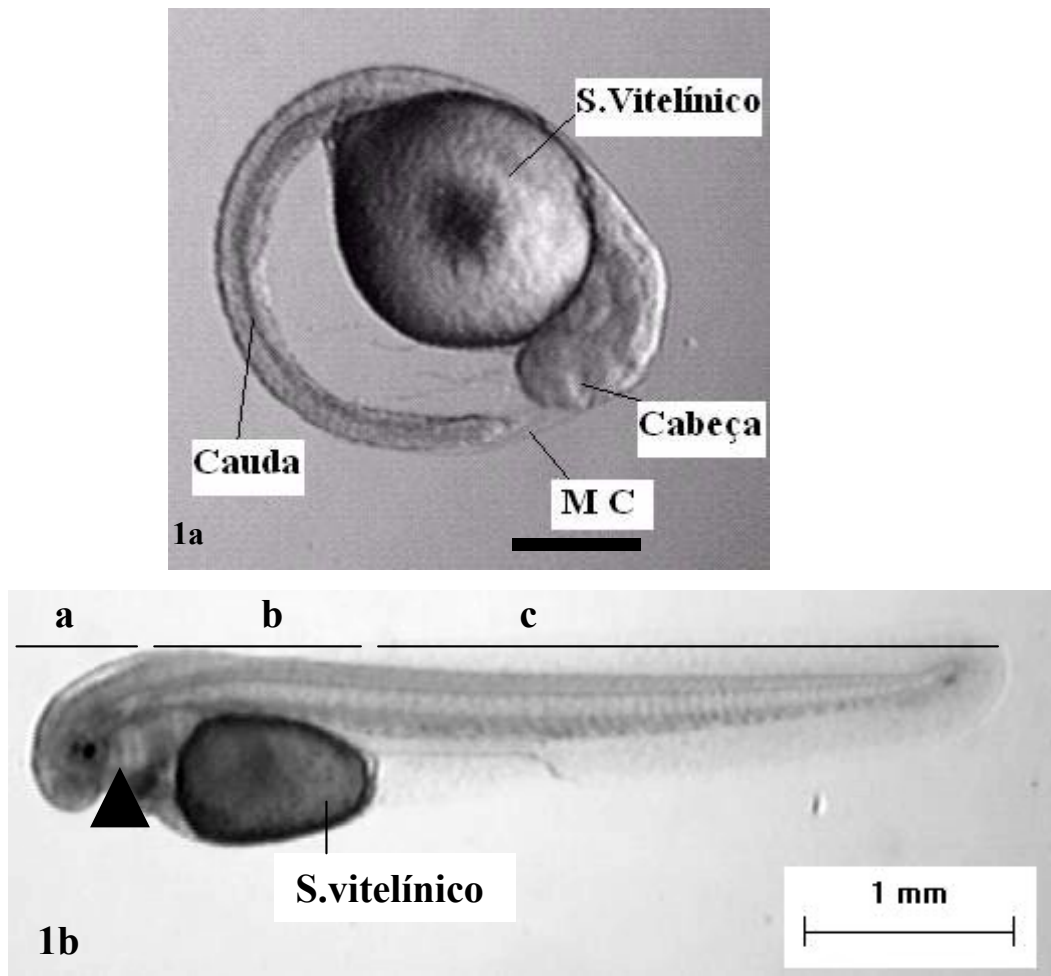


Figura 1- Identificação das regiões de contagem das células de cloreto em embrião e larva de jundiá (*Rhamdia quelen*). 1a) Embrião (24 h após fertilização): cabeça, saco vitelínico e cauda. MC- membrana coriônica. 1b) Larva (6 h após eclosão, controle: pH 8,0): superfície corporal/corpo- indicado por letras a (cabeça), b (tronco) e c (cauda). Região da cavidade branquial e brânquias (seta preta) e saco vitelínico. Escala= 1mm.

A atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase (definida como Na^+ - e K^+ -dependente da adenosina trifosfatase sensível a ouabaina) foi determinada em frações de homogenados (total corporal) de ovos e larvas (“pool” = 9). Após a coleta, os animais foram congelados (-20°C) em tampão SEI (Sacarose- 0,3M; EDTA-0,0001M; Imidazol- 0,03M, pH 7,4) contendo β -mercaptoethanol (10mM) para posterior análise. Os ovos e larvas foram homogeneizados e centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C . O sobrenadante foi

coletado e a ele foi adicionado 10 µl de saponina (0,2 mg mL⁻¹, emulsificante) por mL de sobrenadante.

A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase foi determinada como descrita por QUABIUS et al (1997) para leitura em microplaca. Foi utilizado 5 µl do sobrenadante da amostra ao qual foi adicionado 100 µl de tampão SEI contendo 3 mM de Na₂ATP (“Vanadium free”), pH 7,6. A atividade da enzima foi determinada pela diferença entre as amostras incubadas com tampão contendo KCl (13mM) e amostras com tampão contendo ouabaína (2,5 mM). O tempo de incubação foi de 30 minutos a 20-22°C, no escuro. Após a incubação a reação foi interrompida pela adição de 200 µl de uma mistura de 1:1 de TCA 8,6% e o reagente de cor (0,66 mM H₂SO₄ + 9,2 mM de molibdato de amônia + 0,33 mM de FeSO₄ 7H₂O). A leitura foi realizada em 595 nm em leitora de microplaca (Dynex MRX technologies, Inc.) e a atividade da enzima foi expressa em µmol.Pi. mg proteína⁻¹. h⁻¹. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Após as coletas os ovos e larvas (em “pool” = 9) foram imediatamente congelados a -20°C para determinação da concentração dos íons Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ e Cl⁻ totais. As amostras foram secas em estufa a 70°C durante 24 h até obtenção da massa seca, digeridas em ácido nítrico concentrado (MOL et al., 1999) e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica (SPECTRA A – VARIAN, software SPECTRA A 220 v.2.0) com limite de detecção (mg L⁻¹): Ca²⁺- 0,06, Mg²⁺- 0,005, Na⁺- 0,035 e K⁺- 0,10. O Cl⁻ foi determinado utilizando método colorimétrico com limite de detecção de 14 a 3,9 .10³ mg L⁻¹ (kit LABTEST Diagnóstica) em leitora de microplaca (Dynex MRX technologies, Inc.) com leitura em a 490 nm. As concentrações de Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻ corporais foram expressas em função da massa seca em µmol g⁻¹.

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 3x2 (tratamentos

e pHs) com três repetições utilizando a análise de variância (ANOVA “Two way”). Sempre que diferenças foram detectadas foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância $p < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o “software” ESTAT (v.2.0).

Resultados

Durante todo o período experimental a temperatura (23-24°C), alcalinidade total (20-30 mg L⁻¹ CaCO₃) e as concentrações de oxigênio dissolvido (6,7-7,2 mg L⁻¹), amônia total (0,2-0,8 mg L⁻¹), potássio (1,5-1,6 mg L⁻¹) e sódio (27,4-28,1 mg L⁻¹) da água não apresentaram diferença significativa nos pHs e concentrações Ca²⁺: Mg²⁺ analisados.

Vinte e quatro horas após fertilização, os embriões não possuíam células imunopositivas para a Na⁺/K⁺-ATPase. As larvas eclodiram com 27-36 hpf e em seis horas após eclosão foi detectada imunoreatividade para Na⁺/K⁺-ATPase nas CC da superfície corporal, brânquias e nos rins enquanto que no intestino apenas a partir de 30 hpe foi observada imunoreatividade para essa enzima (Fig. 2 e 3). A Figura 4 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura em larvas 6 hpe sugerindo diferentes estágios de desenvolvimento destas células, onde células pequenas e com poucas viscosidades expostas na superfície são células em estágio inicial de desenvolvimento.

A distribuição de células imunopositivas para a Na⁺/K⁺-ATPase na superfície das larvas não foi alterada em função do pH e das concentrações Ca²⁺: Mg²⁺ na água, mas foi diretamente relacionada às fases do desenvolvimento (Fig. 5). Entre 6 e 12 hpe 55 e 44%, respectivamente, das CC estavam localizadas na superfície corporal, 34 e 32% no saco vitelínico. Entre 30-48 hpe, as CC foram predominantes no epitélio da cavidade branquial (20-29%) e brânquias (19-43%), respectivamente. Em 216 hpe a maioria das CC estava localizada nas brânquias (66%).

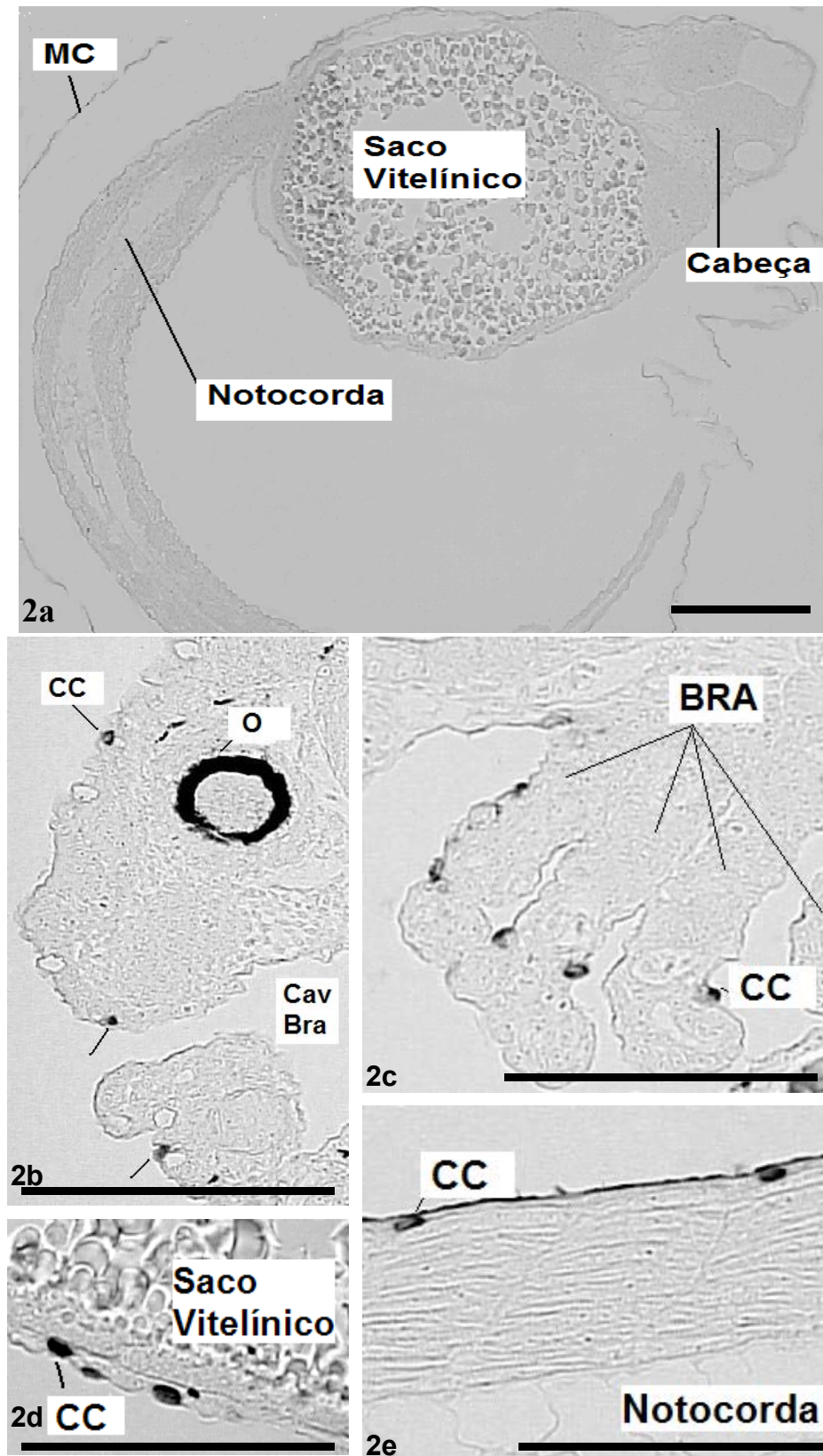


Figura 2- Células imunopositivas para a Na⁺/K⁺-ATPase nas diferentes regiões do embrião e larvas (6h após a eclosão em água controle com pH 8,0) de jundiá, *Rhamdia quelen*. (2a) Embrião 24 h após fertilização. Não houve células imunopositivas para a Na⁺/K⁺-ATPase. MC= membrana coriônica. (2b-2e). Larva 6 h após eclosão em água controle com pH 8,0. Note células imunopositivas para a Na⁺/K⁺-ATPase na cabeça (2b), brânquias (2c), saco vitelínico (2d) e cauda (2e). Cav Bra, cavidade branquial; bra, brânquias; O, olho. Escala = 1mm.

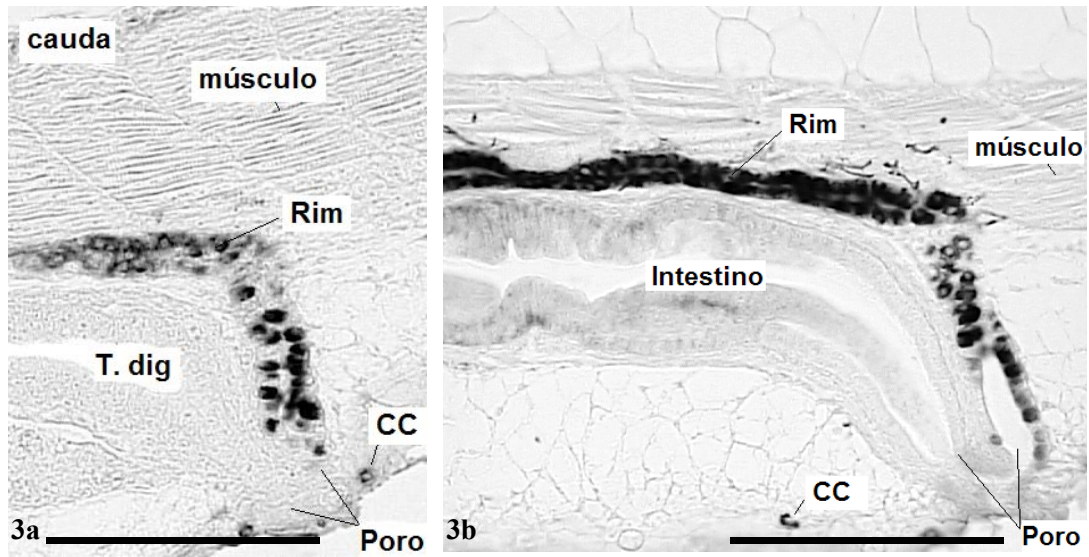


Figura 3- Células imunopositivas para a Na^+/K^+ -ATPase nos rins (3a) 6h após eclosão e no intestino (3b) 30 h após eclosão de larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*. Note que trinta horas após eclosão o tubo digestivo está mais desenvolvido e apresenta leve inumoreatividade para a Na^+/K^+ -ATPase. Escala = 1mm.

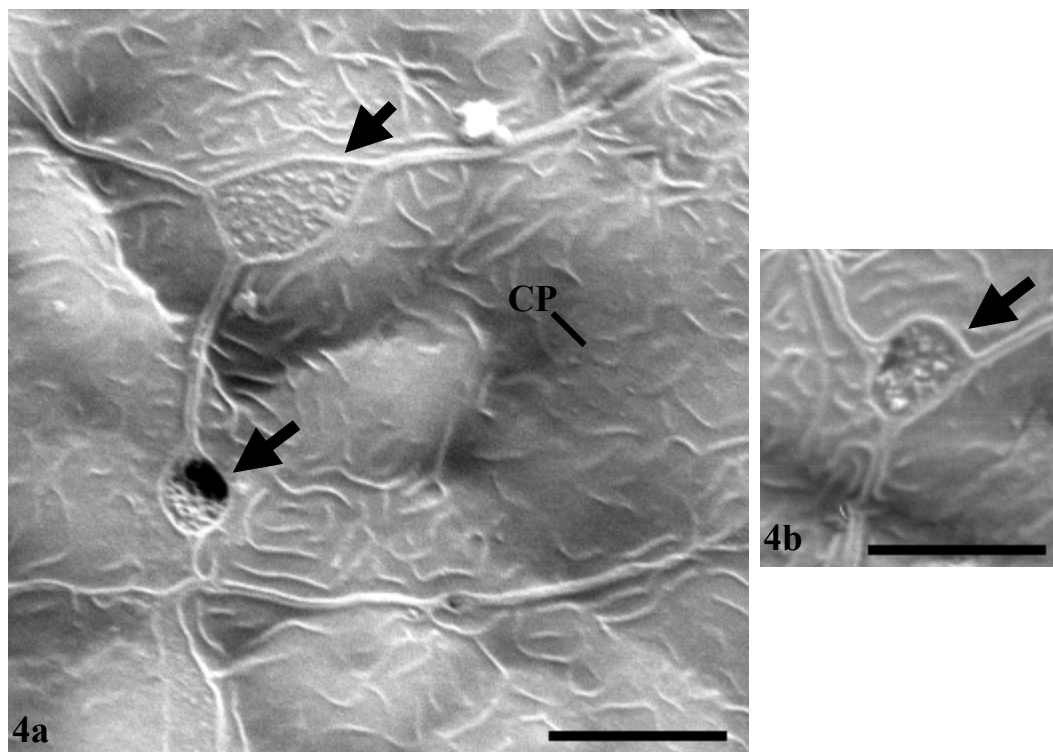


Figura 4- Células de cloreto de larvas de *Rhamdia quelen* em microscopia eletrônica de varredura. Imagem da região do saco vitelínico em larvas 6h após a eclosão em água controle com pH 8,0. 4a e 4b) Diferentes estágios de desenvolvimento das células de cloreto. 4b-detulhe de CC em estágio inicial de desenvolvimento. CP= célula pavimentosa. Escala = $6\mu\text{m}$.

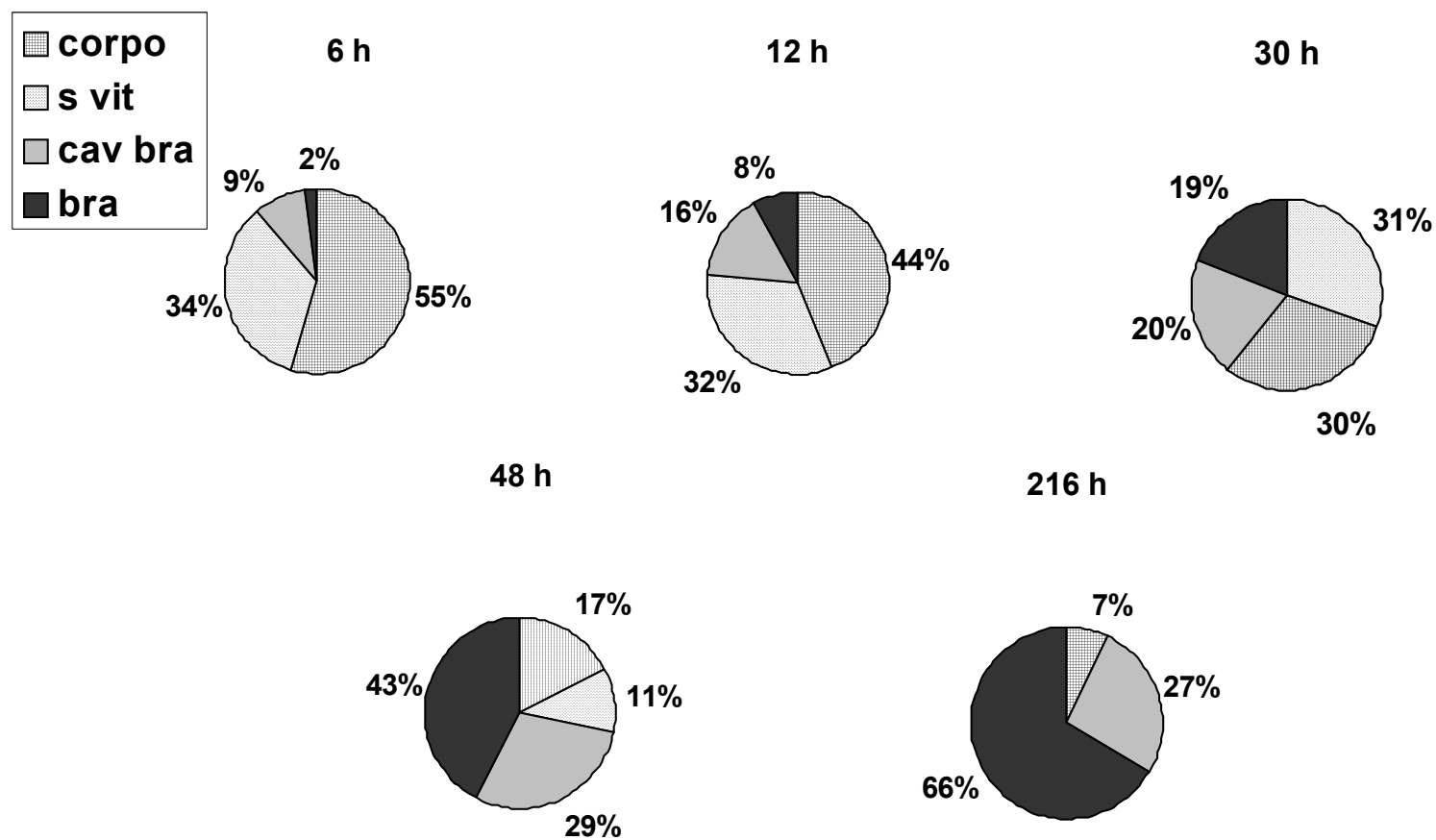


Figura 5- Padrão geral da distribuição das células de cloreto em larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*, na superfície corporal (corpo), saco vitelínico (s. vit), cavidade branquial (cav bra), brânquias (bra) em 6, 12, 30, 48 e 216 h após a eclosão.

Em ambos pHs o número total de CC aumentou com o desenvolvimento larval (Fig. 6) sendo que em larvas 30 e 48 h após a eclosão ($p < 0,05$) foi maior em pH 7,0 do que em pH 8,0. O aumento da dureza com diferentes concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} na água não alterou o número total de CC em ambos os pHs, exceto em 6 e 12 hpe cujo número foi menor que na dureza 20 (5,0:2,03) ($p < 0.05$) (Tabela 1).

A enzima Na^+/K^+ -ATPase não foi detectada pela técnica utilizada em 24 hpf e 6-12 hpe, provavelmente em função da concentração de proteína ter sido menor que $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (concentração ótima de proteína sugerida para técnica). Trinta horas após a eclosão, a atividade da enzima foi significativamente maior em pH 8,0 e na maior concentração de Ca^{2+} (23 mg L^{-1}) em ambos pHs, enquanto que 216 hpe a atividade da enzima foi maior em pH 7,0 e dureza $70 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ principalmente na maior concentração de Ca^{2+} evidenciando interação entre pH e concentração de Ca^{2+} na água para a atividade da enzima (Tabela 2).

A composição iônica das larvas apresentou grande variabilidade nas fases de 48 (início da alimentação externa – fase de adaptação) e 216 hpe (quando se alimentam ativamente). Quarenta e oito horas após a eclosão a concentração de Ca^{2+} corporal foi maior nas larvas cultivadas com a maior concentração de Ca^{2+} (23 mg L^{-1}) na água em ambos pHs. Enquanto que a concentração de Mg^{2+} corporal foi maior nas larvas expostas a maior concentração de Mg^{2+} ($5,56 \text{ mg L}^{-1}$) na água nos dois pHs. As concentrações de Na^+ , K^+ e Cl^- não foram significativamente diferentes.

Em 216 hpe a concentração de Ca^{2+} corporal aumentou com o aumento do Mg^{2+} da água (dureza 70, concentração de $\text{Mg}^{2+} = 5,59 \text{ mg L}^{-1}$), entretanto a concentração de Mg^{2+} e o Cl^- corporal não foram significativamente diferentes em relação às concentrações de Ca^{2+} : Mg^{2+} em ambos pHs. A concentração de K^+ das larvas mantidas em pH 8,0 foi menor do que em pH 7,0 em relação ao aumento do Ca^{2+} e o Mg^{2+} da água. Com o aumento da dureza da água (principalmente com o aumento do Ca^{2+} na água) ocorreu interação entre o pH e

concentração de Ca^{2+} : Mg^{2+} na água somente em relação aos íons Na^+ e K^+ , indicando menor concentração principalmente dos íons Na^+ com o aumento do Ca^{2+} na água em ambos pHs (Tabela 3). A Fig 7A mostra a tendência do aumento da enzima Na^+/K^+ -ATPase com o aumento somente do Ca^{2+} (23 mg L^{-1}) na água, e na Fig. 7 B houve uma maior atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase em 216 hpe nos animais expostos a maior concentração de Ca^{2+} (23 mg L^{-1}) na água e a interação com o pH da água nestas fases (Fig. 7C e D). Contudo, pode-se notar que a concentração de íons Na^+ e K^+ em pH 7,0 em 48 hpe é maior do que 216 hpe. Entretanto, em pH 8,0 as concentrações destes íons, em 216 hpe, são maiores do que 48 hpe e estes apresentam níveis semelhantes no qual possivelmente indica melhor condição de regulação neste pH.

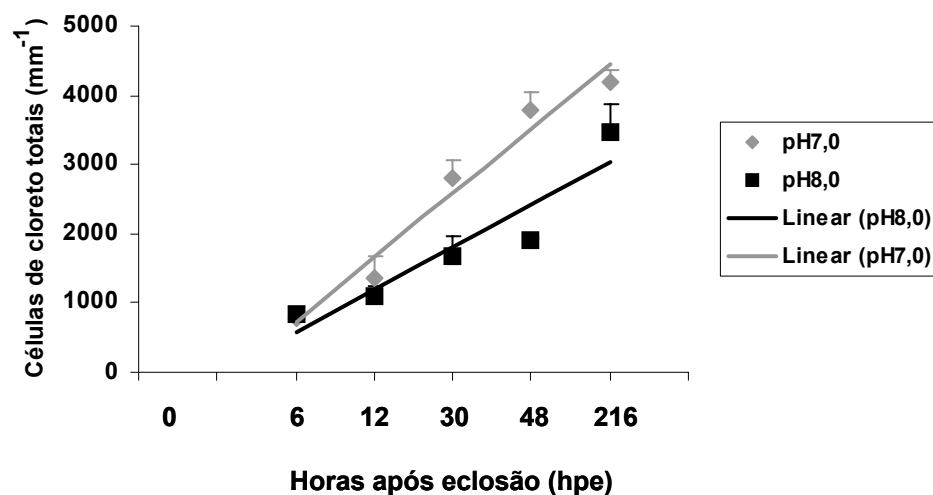


Figura 6- Efeito dos pHs sobre o número total de células de cloreto em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) 6, 12, 30, 48 e 216 h após a eclosão. Retas indicam correlação linear entre número total de CC (Y) e as fases de desenvolvimento (X) em: pH 7,0: $y = -1126 + 928x$ ($r^2 = 0,97$) e pH 8,0: $y = -652 + 612,3X$ ($r^2 = 0,87$).

Tabela 1- Número total de células imunopositivas para a Na⁺/K⁺-ATPase (CC) no período embrionário e larval de 6, 12, 30, 48 e 216h após eclosão de jundiá (*Rhamdia quelen*) em pH 7,0 e 8,0 com diferentes concentrações de cálcio e magnésio da água. n=5 animais/tratamento. hpf- horas após fertilização. média ± EPM.

Estágio de desenvolvimento		CC totais (mm ⁻¹ larva)					
	Tempo (h)	pH7,0			pH8,0		
		Ca ²⁺ :Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)			Ca ²⁺ :Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)		
		5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
Embrionário	24hpf	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00
Após eclosão (h)	6h	1400±223 ^a	600±253 ^b	330±110 ^b	1130±210 ^a	673±81 ^b	687±93 ^b
	12h	1646±250 ^a	1513±306 ^b	890±187 ^b	1600±523 ^a	1050±190 ^b	607±24 ^b
	30h	2925±556	2313±943	3213±520	1680±181*	1700±166*	1660±261*
Alimentação Exógena	48h	3960±180	3913±707	3473±289	2567±81*	1993±404*	1193±331*
	216h	4707±481	4220±320	3785±463	3780±1720	3620±100	3027±319

Dureza da água- ¹ 20 mg L⁻¹ CaCO₃- controle. ² 70 mg L⁻¹ CaCO₃- com variação da concentração de Ca²⁺:Mg²⁺ (mg L⁻¹).

Letras diferentes no tempo indicam diferença significativa das médias ± erro padrão entre as concentrações de Ca²⁺:Mg²⁺ em cada pH (p<0,05). * diferença significativa entre média ± erro padrão do pH 8,0 em relação ao pH 7,0 (p<0,05).

Tabela 2- Atividade específica da enzima Na^+/K^+ ATPase em diferentes fases de desenvolvimento de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) cultivadas em pH 7,0 e 8,0 com diferentes concentrações de cálcio e magnésio da água. hpf- horas após fertilização. n= 3 “pools” de 9 animais/tratamento. nd- não detectado. média \pm EPM.

Estágio de desenvolvimento		Atividade Específica Na^+/K^+ ATPase ($\mu\text{mol.Pi. mg proteína}^{-1}.\text{h}^{-1}$)					
	Tempo (h)	pH7,0			pH8,0		
		$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})			$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})		
		5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
Embrionário	24hpf	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Após eclosão (h)	6h	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	12h	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30h	0,60 \pm 0,10 ^a	0,99 \pm 0,09 ^{ab}	1,50 \pm 0,28 ^b	1,55 \pm 0,50 ^{a*}	1,67 \pm 0,19 ^{ab*}	2,64 \pm 0,83 ^{b*}
Alimentação Exógena	48h	0,67 \pm 0,08	1,02 \pm 0,34	1,73 \pm 0,23	1,45 \pm 0,52	0,92 \pm 0,09	1,67 \pm 0,21
	216h	1,59 \pm 0,63 ^{a#}	1,78 \pm 0,26 ^{b#}	4,04 \pm 0,28 ^{b#}	2,58 \pm 0,37 ^a	2,35 \pm 0,35 ^a	2,92 \pm 0,08 ^a

Dureza da água- ¹ 20 mg L^{-1} CaCO_3 - controle. ² 70 mg L^{-1} CaCO_3 - com variação da concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1}).

Letras diferentes no tempo indicam diferença significativa das médias \pm erro padrão entre as concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ em cada pH ($p < 0,05$). * diferença significativa entre média \pm erro padrão do pH 8,0 em relação ao pH 7,0 ($p < 0,05$).

interação entre pH e $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$.

Tabela 3- Íons corporais (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e Cl^-) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) 48 e 216 h após eclosão cultivadas em pH 7,0 e 8,0 e diferentes concentrações de cálcio e magnésio da água. n=3 réplicas. média \pm EPM.

Íons corporais ($\mu\text{mol/g}$)	pH7,0			pH8,0		
	$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})			$\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1})		
	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²	5,0:2,08 ¹	20,0:5,59 ²	23,0 :2,08 ²
48h após eclosão						
Ca^{2+}	18,27 \pm 1,44 ^a	12,07 \pm 2,87 ^a	46,92 \pm 9,38 ^b	17,00 \pm 1,53 ^a	16,97 \pm 1,02 ^a	46,00 \pm 9,50 ^b
Mg^{2+}	5,99 \pm 0,17 ^a	15,12 \pm 2,87 ^b	6,31 \pm 0,54 ^a	6,76 \pm 0,55 ^a	18,14 \pm 2,77 ^b	2,80 \pm 0,01 ^a
Na^+	152,10 \pm 36,3	114,10 \pm 43,9	53,94 \pm 4,75	21,76 \pm 0,19*	21,88 \pm 0,76*	14,58 \pm 0,41*
K^+	135,9 \pm 58,4	82,50 \pm 5,40	56,73 \pm 0,05	29,16 \pm 0,66	46,99 \pm 20,26	73,43 \pm 17,03
Cl^-	146,53 \pm 62,27	109,90 \pm 51,80	54,95 \pm 12,95	36,31 \pm 0,22	24,21 \pm 9,88	48,75 \pm 19,90
216h após eclosão						
Ca^{2+}	29,11 \pm 2,79 ^a	42,62 \pm 1,68 ^b	27,15 \pm 7,99 ^a	30,30 \pm 4,07 ^a	38,08 \pm 0,17 ^b	31,84 \pm 0,16 ^a
Mg^{2+}	6,92 \pm 0,47	9,60 \pm 1,56	6,18 \pm 2,10	2,53 \pm 0,01	1,56 \pm 0,22	6,09 \pm 0,01
Na^+	56,64 \pm 2,81 ^{a#}	64,86 \pm 2,05 ^{b#}	19,53 \pm 0,47 ^{c#}	72,94 \pm 0,05 ^{a#}	65,35 \pm 4,65 ^{b#}	17,06 \pm 2,20 ^{c#}
K^+	58,74 \pm 3,90 ^{ab#}	76,64 \pm 10,34 ^{a#}	40,36 \pm 18,91 ^{b#}	81,09 \pm 0,91 ^{a#}	10,38 \pm 1,70 ^{b#}	18,33 \pm 4,15 ^{b#}
Cl^-	36,63 \pm 17,27	61,06 \pm 9,97	73,26 \pm 0,01	73,27 \pm 0,02	48,84 \pm 12,42	97,69 \pm 32,30

Dureza da água- ¹ 20 mg L⁻¹ CaCO₃- controle. ² 70 mg L⁻¹ CaCO₃- com variação da concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (mg L^{-1}).

Letras diferentes no tempo indicam diferença significativa das médias \pm erro padrão entre as concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ em cada pH (p<0,05). * diferença significativa entre média \pm erro padrão do pH 8,0 em relação ao pH 7,0 (p<0,05).

interação entre cada pH e $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$.

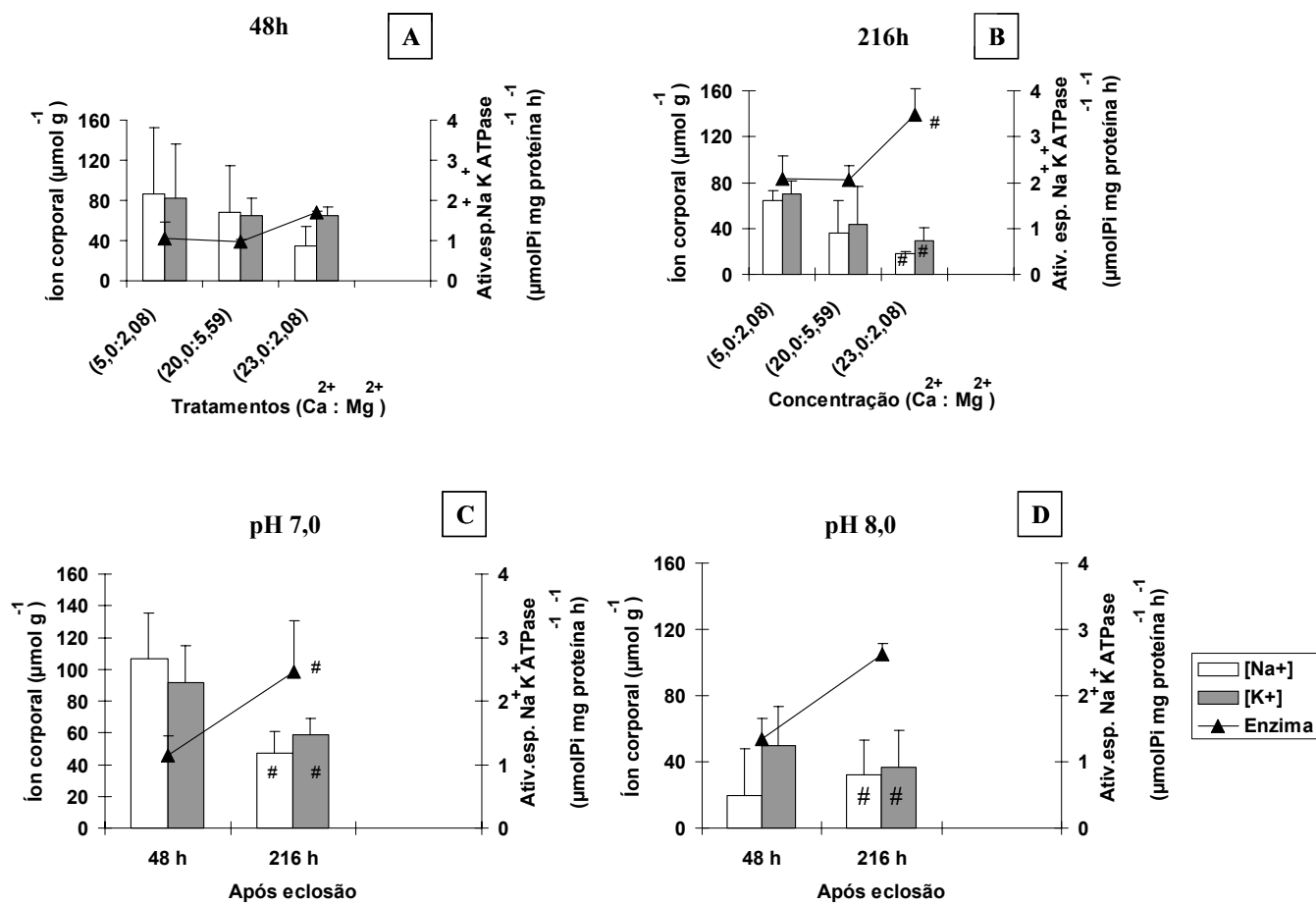


Figura 7- Interação entre a concentração de $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (A e B) e pH da água (C e D) as 48 e 216 h após eclosão em relação à atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase e concentração dos íons corporais Na^+ e K^+ em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). # indica interação.

Discussão

A distribuição de CC no jundiá, como outras espécies de teleósteos (HWANG et al., 1989; AYSON et al., 1994; LI et al., 1995; WALES & TYTLER, 1996) foi relacionada às fases de desenvolvimento. Em jundiá, a ausência de imunoreatividade positiva a $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ nas células de embriões (24 hpf) deve-se provavelmente ao córion que segundo EDDY et al (1990) contribui para a regulação iônica em peixes de água doce, concentrando cátions no fluido perivitelínico. Os colóides presentes no ovo, constituídos por proteínas eletricamente negativas, atraem os cátions do meio externo, resultando no acúmulo de cátions no fluido perivitelínico (KETOLA et al., 1988).

BARRET et al (2001) estudando o desenvolvimento embrionário de truta arco-íris sugerem que, concomitantemente com a difusão de íons para o fluido perivitelínico, pode ocorrer a absorção ativa de íons pelo embrião. Embora não tenha sido possível determinar a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ em embriões de *R. quelen* 24h após fertilização, a ausência de imunoreatividade positiva para essa enzima corrobora as hipóteses de KETOLA et al (1988) e EDDY et al (1990).

Em *Tilapia zillii* as primeiras CC aparecem no epitélio do saco vitelínico, em embriões descorionados, 24 h após fertilização (FISHELSON & BRESLER, 2002) e em *Fundulus heteroclitus* pequenas e esparsas CC na membrana do saco vitelínico e na superfície corporal dos embriões foram observadas 48 h após fertilização em animais adaptados a água doce a 20 °C (KANEKO & KATO, 2004). A eclosão das larvas de *R. quelen* ocorre em aproximadamente 27-36 hpf, quando cultivada a 24°C, dificultando a comparação com outras espécies cuja fase embrionária é mais longa.

LIN et al (2001) avaliando células de cloreto na superfície corporal de larvas de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) através de microscopia eletrônica de varredura mencionam que

ocorre um estágio diferenciado de desenvolvimento das células de cloreto. Corroborando com este autor, as larvas de jundiá também parecem indicar células de cloreto em estágios diferentes de desenvolvimento de acordo com exposição da superfície apical (vilosidades) onde uma grande área exposta indica melhor capacidade de transporte.

Assim como em tilápia, *Oreochromis mossambicus* (VAN DER HEIJDEN et al., 1999) e outros teleósteos (HWANG & HIRANO, 1985; HWANG, 1989; WALES & TYTLER, 1996) a maioria das CC localizam-se extrabranquialmente até 48h após a eclosão, e a medida que a larva cresce, o número de CC aumenta na cavidade branquial e brânquias, enquanto diminui na superfície corporal do saco vitelínico. O desenvolvimento da imunoreatividade para Na^+/K^+ -ATPase em CC jovens é considerado como um fator importante para o desenvolvimento da capacidade osmorregulatória em larvas (SHIKANO & FUJIO, 1998). TYTLER & IRELAND (1995), utilizando sonda mitocondrial fluorescente DASPI (2-(4-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium iodide) para identificação de CC em larvas de “turbot” (*Scophthalmus maximus*) entre 1- 5 dias após eclosão verificaram a diminuição da fluorescência das CC no tegumento das larvas durante o desenvolvimento larval.

Alguns autores sugerem que o saco vitelínico é o principal local envolvido com a osmorregulação em larvas após a eclosão, antes que as CC branquiais sejam funcionais (HWANG et al., 1999). Os dados obtidos no presente estudo sugerem que, além do saco vitelino, a superfície corporal também é um importante local para osmorregulação nas primeiras fases após eclosão (6-12 hpe), pois ocorre um elevado número de CC. Ao longo do desenvolvimento das larvas de jundiá (30 a 216 hpe), além das brânquias, o epitélio da cavidade branquial parece ser um importante local para trocas iônicas. A grande concentração de CC na superfície corporal e não no saco vitelínico em 6-30 hpe sugere que o corpo, nestas fases, é o epitélio com maior superfície para trocas e isto pode indicar um padrão de

distribuição destas células em larvas adaptadas a baixas durezas, no qual caracteriza a maioria das águas brasileiras (WOOD et al., 1998).

HWANG (1989) verificou em larvas de *Cyprinus carpio* 24 h após eclosão, CC somente sobre o saco vitelínico e não observou CC sobre o epitélio das brânquias, cavidade branquial e corpo. KANEKO & KATOH (2004) mostraram que em larvas de “killifish” (*Fundulus heteroclitus*) adaptadas a água doce, 25 dias após fertilização, a membrana opercular (na cavidade branquial) é o local com maior número de CC depois das brânquias. Segundo HWANG (1989) a variabilidade na distribuição e densidade das CC em larvas de peixes depende da espécie e parece estar relacionada aos diferentes requerimentos osmorregulatórios. Além disso, a concentração de íons na água é um outro fator que influencia no número de CC em peixes (LAURENT & HEBIBI, 1989; PERRY, 1997; MORON et al., 2003).

O aumento excessivo da dureza da água (150 mg L^{-1} como CaCO_3) parece induzir alguns efeitos deletérios em larvas de jundiá, uma vez que a sobrevivência das larvas após a eclosão foi baixa nessa dureza (TOWNSEND et al., 2003; SILVA et al., 2003, 2005). SILVA et al (2003, 2005) sugeriram que esses efeitos estão relacionados principalmente ao aumento do Ca^{2+} e não do Mg^{2+} na água e que larvas de jundiá toleram no máximo 20 mg L^{-1} de Ca^{2+} na água, inclusive em dureza da água $70 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. No presente estudo, o número de CC mostrou grande variabilidade independente do pH e da concentração de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} na água, entretanto o aumento da concentração de Ca^{2+} : Mg^{2+} (dureza da água = 70) resultou em uma diminuição do número de CC somente nas fases de 6-12 hpe após eclosão. A interpretação destes resultados sugere que a concentração de Ca^{2+} na água parece ser um fator que modula o número de CC logo nas primeiras fases após eclosão, pois possivelmente estas são as fases mais sensíveis do desenvolvimento.

A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase em larvas de jundiá cultivadas em diferentes concentrações de Ca^{2+} na água, em ambos os pHs, não evidenciou uma relação direta com o número de CC. Essa ausência de relação entre atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase e número de CC provavelmente deve-se à contribuição de outros órgãos envolvidos na regulação iônica e osmótica, como o rim e intestino, que possuem células com imunoreatividade positiva para a Na^+/K^+ -ATPase, principalmente 48 e 216 hpe, período em que se inicia a alimentação exógena. O rim e a região basal dos enterócitos no intestino apresentam atividade da Na^+/K^+ ATPase em larvas como descrito em larva de truta marrom, *Salmo trutta* adaptada à água doce, 14 dias após eclosão (SEIDELIN et al., 1999). Além disso, a aparente discrepância entre a atividade da Na^+/K^+ ATPase e o número de CC nos pHs avaliados pode estar associado ao número de CC efetivamente maduras e funcionais na superfície corporal e branquial. CC imaturas ou em degeneração possuem menos unidades funcionais da enzima Na^+/K^+ -ATPase e conseqüentemente uma menor atividade da enzima (DANG et al., 2000). As características das mitocôndrias nas CC e sua funcionalidade relacionada à densidade podem indicar o estado de atividade destas organelas nas CC e sua maturação é importante para a demanda metabólica necessária para o aumento do transporte iônico exigido durante o crescimento (SHIRAISHI et al., 1997).

O desenvolvimento larval é caracterizado como um período de mudanças tanto internas como externas muito rápidas, que vai desde a dependência quase total do saco vitelínico para a sobrevivência até a completa independência a partir da alimentação exógena (SCHREIBER, 2001), principalmente em larvas de peixes tropicais que têm um período embrionário curto comparado a espécies de ambientes de clima temperado. Esse período de mudanças muito rápidas pode resultar em um ciclo celular relativamente curto e, portanto a um número baixo de CC efetivamente funcionais.

A mudança no conteúdo iônico dos tecidos de larvas em fases inicial de vida tem sido estudada em várias espécies de teleósteos. HWANG et al (1994) mostrou que a tilapia (*Oreochromis mossambicus*) mantém níveis de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} constantes durante o estágio embrionário e que aumentam após a eclosão, enquanto que o nível de Mg^{2+} permanece constante ao longo do desenvolvimento embrionário e larval. Em jundiá a concentração de íons corporais parece variar em função do pH e concentração de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} na água, evidenciando que as maiores concentrações de Ca^{2+} na água ocasionaram um desequilíbrio dos íons Na^+ e Cl^- que pode não estar relacionado diretamente à atividade da Na^+/K^+ - ATPase. Neste caso, destaca-se que além da provável interferência da alimentação exógena sobre a composição iônica das larvas, induzindo a variabilidade iônica em relação às fases de desenvolvimento, sugere-se que a adaptação e a captura do alimento possivelmente influencia a capacidade osmorregulatória, sendo que esta também é alterada pela disponibilidade de íons do ambiente.

O maior acúmulo de Ca^{2+} e Mg^{2+} em larvas cultivadas com a maior concentração de Ca^{2+} (23 mg L^{-1}) e Mg^{2+} ($5,59 \text{ mg L}^{-1}$) da água respectivamente, sugere que a absorção de Ca^{2+} e Mg^{2+} depende da concentração destes íons na água. Estudos em peixes juvenis e adultos indicam rotas diferentes para a absorção de Ca^{2+} e Mg^{2+} . A entrada de Mg^{2+} ocorre através da membrana apical do enterócito e na região basolateral é transportado, via transportador $2\text{Cl}^-/\text{Mg}^{2+}$ para o meio extracelular (BIJEVELDS, 1998). A absorção de Ca^{2+} é mediada pela difusão através das brânquias, tegumento corporal e intestino dos peixes, dependendo da fase de desenvolvimento (WAGNER et al., 1998). O Ca^{2+} entra na membrana apical da CC por difusão e como há necessidade de manter a concentração intracelular baixa desse íon, o excesso de Ca^{2+} no citosol é transportado para o meio extracelular via Ca^{2+} -ATPase (PEDERSON & CARAFOLI, 1987).

Pequenas mudanças na concentração de Ca^{2+} interna em larvas de peixes tem efeito marcante sobre as funções neurais, cardiovasculares e musculares, sendo que a manutenção da concentração adequada de Ca^{2+} circulante é um requerimento importante para o desenvolvimento (GUERREIRO et al., 2004). A relação neuroendócrina em fase de larva é um fator importante a ser analisado em futuros estudos, pois auxilia na capacidade osmorregulatória, e possivelmente não é funcional no início do desenvolvimento embrionário e larval dificultando a homeostase.

Conclusão

Em pH 7,0 as larvas mostram maior dificuldade de manter a homeostase que induz a um aumento no número de CC não acompanhado por um aumento da atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase, exceto nas maiores concentrações de Ca^{2+} na água. A maior atividade da Na^+/K^+ -ATPase em larvas cultivadas em alta concentração de Ca^{2+} na água pode representar um gasto metabólico maior para compensar a perda iônica nesse pH.

Os resultados sugerem que a concentração de Ca^{2+} de 23 mg L^{-1} , dureza 70 mg L^{-1} CaCO_3 na água em ambos pHs, não é o mais adequado para o cultivo das larvas de *Rhamdia quelen*, principalmente devido ao desequilíbrio entre Na^+ e K^+ corporal.

Em pH 7,0, as larvas sugerem maior número de CC do que pH 8,0, e a dureza da água influenciou na densidade total de células de cloreto nas primeiras fases após eclosão (6-12 hpe), ocorrendo uma diminuição no número destas células em ambos pHs. Portanto, sugere-se que as larvas logo após a eclosão modulam o número de CC de acordo com a composição iônica do ambiente.

Sugerimos que futuros estudos avaliem as características da membrana apical, volume e superfície das mitocôndrias das CC para o melhor entendimento da funcionalidade destas

células e a relação entre o número de CC e atividade da Na^+/K^+ -ATPase e sua interação com as condições de cultivo.

Referências Bibliográficas

ALDERDICE, D. F. Osmotic and ion regulation in teleost eggs and larvae. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D.J. **Fish Physiology XI the Physiology of Developing Fish**. Part-A eggs and larvae. ed. San Diego: Academic Press, 1988. p. 163-251.

AYSON, G. G.; KANEKO, T.; HASEGAWA, S.; HIRANO, T. Development, of mitochondrion- rich cells in the yolk-sac membrane of embryos and larvae of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, in fresh water and sea water. **Journal of Experimental Zoology**, v.270, p.129-135, 1994.

BALDISSEROTTO, B.; MIMURA, O. M. Ion and water transport in the gut of the freshwater teleost *Prochilodus scrofa*. **Ciência e Cultura** (J. of the Braz. Assoc. for the Adv. of Sci.), v.47, p.83 – 85, 1995.

BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. **Criação de jundi** . Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2004. 232 p.

BARRET, K. J.; MCDONALD, D. G.; O'DONNELL, M. J. Changes in ion content and transport during development of embryonic rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v.59, p.1323-1335, 2001.

BIJEVELDS, M. J. C.; VAN DER VELDEN, J. A.; KOLAR, Z., FLIK, G. Magnesium transport in freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v.201, p.1981 – 1998, 1998.

BRADFORD, M. N. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CHIPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperature for *Rhamdia quelen* larvae (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, p.1069-1071, 2000.

DANG, Z.; LOCK, R. A. C.; FLIK, G.; BONGA, S. E. W. Na^+/K^+ -ATPase Immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. **Journal of Fish Biology**, v.203, p.379-387, 2000.

EDDY, F. B.; WARD, M. R.; TALBOT, C.; PRIMMET, D. Ionic movement across the chorion in newly shed salmon eggs (*Salmo salar* L.). **Journal Comparative and Physiology**, v.159, p.771-776, 1990.

FERNANDES, M. N. Morpho-functional adaptations of gills in tropical fish. In: VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V.; RANDALL, D. J. **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Manaus: Instituto Nacional pesquisas da Amazônia, 1996. p. 181-190.

FERNANDES, M. N.; PERNA, S. A.; MORON, S. E. Chloride cell apical surface changes in gill epithelia of the armoured catfish *Hypostomus plecostomus* during exposure to distilled water. **Journal of Fish Biology**, v.52, p.844-849, 1998.

FISHELSON, L.; BRESLER, V. Comparative studies of the development and differentiation of chloride cells in tilapine fish with different reproductive styles. **Journal of Morphology**. v.253, p.118-131, 2002.

FLIK, G.; VAN DER VELDEN, K. J.; DECHERING, K. J.; VERBOST, P. M.; SCHOENMAKERS, T. J. M.; KLAR, K. I., BONGA, S. E. W. Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gill and gut of tilapia *Oreochromis mossambicus*: a review. **Journal of Experimental Zoology**, v.265, p.356-365, 1993.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; CHIPPARI GOMES, A. R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE). Uma revisão. **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.179-185, 2000.

GONZAL, A. C.; ARALAR, E. V.; PAVICO, J. M. The effects of water hardness on the hatching and viability of silver carps (*Hypophthalmichthys molitrix*) eggs. **Aquaculture**, v.64, p.111-118, 1987.

GONZALEZ, R. J. Ion regulation in ion poor waters of low pH. In: VAL, A. L.; ALMEIDA – VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1996. 420 p.

GREENBERG A. E.; TARAS, M. J.; RAND, M. C. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 14th ed. Illinois: Springfield Bru-El Graphic, 1976. 310 p.

GUERREIRO, P. M.; FUENTES, J.; FLIK, G.; ROTLAND, J.; POWER, D. M.; CANARIO, A. V. M. Water calcium concentration modifies whole-body calcium uptake in sea bream larvae during short-term adaptation to altered salinities. **Journal of Fish Biology**, v.207, p.645-653, 2004.

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. Florida: Lewis Publishers, 1995.356 p.

HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells (review). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.136, p.593-620, 2003.

HWANG, P. P.; HIRANO, R. Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages of teleost development. **Journal of Experimental Zoology**, v.236, p.115-126, 1985.

HWANG, P. P. Distribution of chloride cell in teleost larvae. **Journal of Morphology**, v.200, p.1-8, 1989.

HWANG, P. P., Salinity effects on development of chloride cells in the larvae of ayu (*Plecoglossus altivelis*). **Marine Biology**, v.107, p.1-7, 1990.

HWANG, P. P.; TSAI, Y. N.; TUNG, Y. C. Calcium balance in embryos and larvae of the freshwater adapted teleost, *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.13, p.325-353, 1994.

HWANG, P. P.; LEE, T. H.; WENG, C. F.; FANG, M. J.; CHO, G. Y. Presence of Na⁺ K⁺ ATPase in mitochondria rich cells in the yolk sac epithelium of larvae of the teleost *Oreochromis mossambicus*. **Physiology and Biochemistry Zoology**, v.72, p.138-144, 1999.

KANEKO, T.; KATOH, F. Functional morphology of chloride cells in killifish *Fundulus heteroclitus*, a euryhaline fish teleost with seawater preference. **Fisheries Science**, v.70, p.723-733, 2004.

KETOLA, H. G.; LONGAGRE, D.; GREULICH, A.; PHETTERPLACE, L.; LASHOMB, R. High calcium concentration in water increases mortality of Salmon and Trout eggs. **The Progressive Fish Culturist**, v.50, p.129-135, 1988.

LAURENT, P.; HEBIBI, N. Gill morphometry and fish osmoregulation. **Canadian Journal of Zoology**, v.67, p.3055-3063, 1989.

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Living Resource**, v.9, p.59-80, 1996.

LI, J.; EYGENSTEIN, J.; LOCK, R. A. C.; VERBOST, P. M.; VAN DER HEIJDEN, A. J. H.; BONGA, S. E. W.; FLIK, G. Branchial chloride cells in larvae and juveniles of freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Fish Biology**, v.198, p.2177-2184, 1995.

LIN, L. Y.; HWANG, P. P. Modification of morphology and function of integument mitochondria-rich cells in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to ambient chloride levels. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 74, n. 4, p. 469-479, 2001.

LOPES, J. M.; SILVA, L. V. F.; BALSISSEOTTO, B. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. **Aquaculture International**, v.9, n.1, p. 73-80, 2001.

MCDONALD, D. G.; HOBE, H.; WOOD, C. M. The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. **Journal of Fish Biology**, v.88, p.109-131, 1980.

MCDONALD, D. G.; FREDA, J.; CAVDEK, V.; GONZALEZ, R.; ZIA, S. Interespecific differences in gill morphology of freshwater fish in relation to tolerance of low-pH environments. **Physiological Zoology**, v.102, p.124-144, 1991.

MOL, J. H.; ASTMA, W.; FLIK, G.; BOUWMEESTER, H.; OSSE, J. W. Effect of low ambient mineral concentrations on the accumulation of calcium, magnesium and phosphorous by early life stages of the air-breathing armoured catfish *Megalechis personata* (Siluriformes: Callichthyidae). **Journal of Fish Biology**, v.202, p.2121-2129, 1999.

MOLOKWU, C. N.; OKPOKWASILI, G. C. Effect of water hardness on egg hatchability and larval viability of *Clarias gariepinus*. **Aquaculture International**, v.10, p.57-64, 2002.

MORON, S. E.; OBA, E. T.; ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 298A, p.93-104, 2003.

PERDERSON, P. L.; CARAFOLI, E. Ion motive ATPases. I- Ubiquity, properties, and significance to cell function. **TIBS**, v.12, p.146-150, 1987.

PERRY, S. F. The chloride cell: structure and function in the gill of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, v.59, p.325-347, 1997.

PIPER, R. G.; MCELWAIN, I. B.; ORME, L. E.; MCCRAREN, J. P.; FOWLER, L. G.; LEONARD, J.R. **Fish hatchery management**. Washington: United States Department of the Interior Fish and Wildlife Service, 1982. 517p.

QUABIUS, E. S.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **General Comparative Endocrinology**, v.108, p.472-482, 1997.

ROUMBOUGH, P. J. The gill of fish larvae. Is it primarily a respiratory or an ionoregulatory structure?. **Journal of Fish Biology**, v.55, p.186-204, 1999.

SCHREIBER, A. M. Metamorphosis and early larval development of the flatfishes (Pleuronectiformes): an osmoregulatory perspective. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.129B, p.587-595, 2001.

SEIDELIN, M.; MADSEN, S. S.; BYRIALSEN, A.; KRISTIENSEN, K. Effects of insulin-like growth factor and cortisol on Na K ATPase expression in osmoregulatory tissues of Brown Trout (*Salmo trutta*). **General Comparative Endocrinology**, v.113, p.331-342, 1999.

SHIKANO, T.; FUJIO, Y. Immunolocalization of Na⁺ K⁺ ATPase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimatation. **Journal of Fish Biology**, v.201, p.3031-3040, 1998.

SHIRAIISHI, K.; KANEOKO, T.; HASEGAVA, S.; HIRANO, T. Development of multicellular complexes of chloride cells in the yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae seawater. **Cell Tissue Research**, v.288, p.583-590, 1997.

SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I.; BALDISSEROTTO, B. Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. **Aquaculture**, v.228, p.279-287, 2003.

SILVA, L. V. F., GOLOMBIESKI, J. I., BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of silver catfish, *Rhamdia quelen*, (Pimelodidae) larvae at different calcium and magnesium concentrations. Neotropical Ichthyology, v.3, n.2, p. 299-304, 2005.

TOWNSEND, C. R.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* exposed to different levels of water hardness. **Aquaculture**, v.215, p.103-108, 2003.

TUCKER, C. S.; STEEBY, J. A. A practical calcium hardness criterion for channel catfish hatchery water supplies. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 24, p.396-401, 1993.

TYTLER, P.; IRELAND, J. The influence of temperature and salinity on the structure and function of mitochondria in chloride cells in the skin of the larvae of the turbot (*Scophthalmus maximus*). **Journal of Thermological Biology**, v.20, p.1-14, 1995.

VAN DER HEIJDEN, A. J. H.; VAN DER MEIJ, J. C. A. Ultrastructure and distribution dynamics of chloride cells in tilapia larvae in fresh water and sea water. **Cell Tissue Research**, v.297, p.119-130, 1999.

VAN DER VELDEN, J. A.; GROOT, J. A.; FLIK, G.; POLAK, P.; KOLAR, Z.I. Magnesium transport in fish intestine. **Journal of Fish Biology**, v.152, p.587-592, 1990.

WAGNER, G. F.; HADDAD, M.; FARGHER, R. C.; MILIKEN, C.; COPP, D. H. Calcium is an equipotent stimulator of staniocalcin secretion in freshwater and seawater salmon. **General Comparative Endocrinology**, v.109, p.186-191, 1998.

WALES, W.; TYTLER, P. Changes in chloride cell distribution during early larval stages of *Clupea harengus*. **Journal of Fish Biology**, v. 49, p.801-814, 1996.

WILKIE, M. P.; WOOD, C. M. The effects of extremely alkaline water (pH 9,5) on trout gill function and morphology. **Journal of Fish Biology**, v.45, p.87-98, 1994.

WOOD, C. M.; WILSON, R. W.; GONZALEZ, R. J.; PATRICK, M. L.; BERGMAN, H. L.; NARARA, A.; VAL AL. Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water. **Physiological Zoology**, v.71, n. 6, p. 658-670, 1998.

WOOD, C. M. Toxic responses of the gill. In: Schlenck, D., Benson, W. H. (Eds.). **Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts**. New York: Taylor & Francis, 2001. p. 1-89.

WURTS, W. A.; DURBOROW, R. M. Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds. **Aquaculture Program- SRAC publication**, 1992. 464 ed. 4 p.

CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo indicam que o pH 8,0 é o melhor para o cultivo de larvas de *Rhamdia quelen*, e que o aumento da dureza da água para 70 mg L⁻¹ CaCO₃,

principalmente nas concentrações de 20 mg L⁻¹ de Ca²⁺ e 5,59 mg L⁻¹ de Mg²⁺ favorecem o aumento da área corporal total das larvas em ambos pHs.

Nosso trabalho confirma estudos anteriores que o melhor crescimento e sobrevivência das larvas de jundiá foram obtidos com pH alcalino (pH 8,0), assim como o aumento da dureza é indicado para o cultivo das larvas desta espécie desde que na faixa de concentração 20-70 mg L⁻¹ CaCO₃, e nas concentrações de até 20 mg L⁻¹ de Ca²⁺ e 7,11 mg L de Mg²⁺ na água de cultivo para larvas, sugerindo uma maior sensibilidade ao aumento do Ca²⁺ na água. Trabalhos anteriores com a mesma espécie não indicam diferença significativa no crescimento em 48 e 216 h após a eclosão com o aumento da dureza da água para 70 mg L⁻¹ (independente das concentrações de Ca²⁺ e Mg²⁺ da água). Entretanto, estes mencionam que o crescimento das larvas de jundiá diminuiu com o aumento de 24,95 mg L⁻¹ de Ca²⁺ na água em 21 dias de cultivo após a eclosão. Os dados obtidos neste estudo sugerem que o aumento da concentração de Ca²⁺ (23 mg L⁻¹) na água em ambos pHs, não é o mais adequado para o cultivo das larvas de *Rhamdia quelen*, devido a apresentar um desequilíbrio ionoregulatório entre Na⁺ e Cl⁻ em ambos pHs. Apesar de não se obter diferenças na sobrevivência, crescimento (em 48 e 216 h após a eclosão) e na morfologia geral das larvas com relação à dureza da água utilizada, este fato possivelmente indica uma tendência de uma condição não favorável de cultivo em longo prazo, quando se aumenta a concentração de Ca²⁺ acima de 20 mg L⁻¹.

Considerando que a maior taxa de sobrevivência e crescimento ocorreu em pH 8,0 independente da concentração de Ca²⁺ e Mg²⁺ na água, pode-se inferir que em pH 7,0 as larvas têm maior dificuldade para manter a homeostase que induz a um aumento no número de CC não acompanhado por um aumento da atividade específica da enzima Na⁺/K⁺-ATPase, exceto nas maiores concentrações de Ca²⁺ na água. A maior atividade da Na⁺/K⁺-ATPase em

larvas cultivadas em alta concentração de Ca^{2+} na água pode representar um gasto metabólico maior para compensar a perda iônica nesse pH.

As larvas de jundiá expostas ao pH 7,0 sugerem maior número de células de cloreto e também de células mucosas do que as larvas cultivadas em pH 8,0 e a dureza da água influenciou na densidade total destas células, principalmente nas células de cloreto nas primeiras fases após eclosão (6-12 hpe) ocorrendo menor número de CC em ambos pHs. Portanto, os dados evidenciam que o número de células de cloreto e também de células mucosas podem ser modulados de acordo com a composição iônica do ambiente nas larvas de jundiá logo após a eclosão.

Em nosso estudo, a densidade de células mucosas foi maior em pH 7,0, e ocorreu menor sobrevivência e crescimento neste pH, este fato possivelmente indica que as larvas parecem estar em condições menos favoráveis, sugerindo maior produção de muco. Contudo, estas células apresentam uma relação com o ambiente de cultivo em função da disponibilidade de Ca^{2+} . Portanto, sugere-se que além de uma resposta adaptativa, possivelmente ocorre uma relação osmorregulatória indireta entre as células mucosas das larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) e a dureza da água principalmente em função do Ca^{2+} , influenciada pelo pH da água nas fases larvais avaliadas.

O estágio de desenvolvimento de 6-216 h após eclosão é considerado como período crítico, devido ao desenvolvimento das estruturas osmorregulatórias (brânquias, intestino e rins), ressaltando o início da alimentação exógena (a partir de 48 h após eclosão). As interações referentes à atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase, íons corporais Na^+ e K^+ e número total de células mucosas, foram influenciados pelo pH e principalmente a concentração de Ca^{2+} na água, sendo que 23 mg L^{-1} de Ca^{2+} parece não ser adequado para o cultivo da espécie devido ao aumento da enzima Na^+/K^+ -ATPase, diminuição dos íons Na^+ e K^+ , e alteração quantitativa das células mucosas. Além disto, não se pode descartar a

sensibilidade das larvas nesta fase inicial de adaptação também à alimentação exógena o que sugere o período crítico. Portanto, acredita-se que estas informações são úteis para pesquisadores e/ou produtores, na determinação de técnicas de manejo das fases iniciais de vida de *Rhamdia quelen* contribuindo para o estudo biológico desta espécie em ambiente de cultivo.

O presente trabalho sugere a importância das fases iniciais no desenvolvimento de uma espécie de peixe com potencial produtivo, em que a busca pelo entendimento das relações morfofuncionais com o ambiente mostra a necessidade da aplicabilidade dos estudos biológicos na aquicultura. Além disto, considera-se que as relações ecológicas de adaptações no ambiente natural e de cultivo são de extrema relevância para o conhecimento da espécie de interesse econômico ou biológico para posteriormente se investir com êxito na escala de produção da espécie desejada.