

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesas antioxidantes e alterações bioquímicas no pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em resposta à exposição ao cobre, à hipóxia e ao meio ácido, isolados ou associados.

Fernanda Garcia Sampaio

São Carlos - SP

Dezembro - 2008

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesas antioxidantes e alterações bioquímicas no pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em resposta à exposição ao cobre, à hipóxia e ao meio ácido, isolados ou associados.

Fernanda Garcia Sampaio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para Obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de Concentração em Ciências Fisiológicas.

São Carlos - SP

Dezembro - 2008

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

S192da

Sampaio, Fernanda Garcia.

Defesas antioxidantes e alterações bioquímicas no pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em resposta à exposição ao cobre, à hipóxia e ao meio ácido, isolados ou associados / Fernanda Garcia Sampaio. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

162 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Ecotoxicologia. 2. Metabolismo oxidativo. 3. Sulfato de cobre. 4. Pacu (Peixe). 5. Hipóxia. I. Título.

CDD: 612.39 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Convênio UFSCar - UNESP

Defesa de Tese de Fernanda Garcia Sampaio

Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin.....

Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato.....

Prof^a. Dr^a. Margarida Maria Barros.....

Prof^a. Dr^a. Marisa Narciso Fernandes.....

Prof^a. Dr^a. Flavia Sant'Anna Rios.....

Handwritten signatures in blue ink, corresponding to the names of the professors listed on the left. The signatures are: Francisco Tadeu Rantin, Luiz Edivaldo Pezzato, Margarida Maria Barros, Marisa Narciso Fernandes, and Flavia Sant'Anna Rios.

Dr. Francisco Tadeu Rantin
Orientador

*“Mestre não é quem sempre ensina,
mas quem de repente aprende”.*

João Guimarães Rosa

Dedico

Aos meus pais Moacyr Alvaro e Maria Inês

meus alicerces de vida

por vocês tenho enorme admiração

E aos meus irmãos Bernardo e Luciana

pelo amor e amizade

Agradecimentos

Em especial:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, pela oportunidade de trabalhar na sua equipe, pela orientação durante o desenvolvimento do doutorado, pelos ensinamentos em fisiologia e pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Agradeço acima de tudo pela relação de amizade, incentivo e respeito.

À minha co-orientadora, Dra. Cheila de Lima Boijink, por permitir que este trabalho fosse realizado em conjunto, ensinando-me e dividindo comigo seus conhecimentos. Acima de tudo, pela amizade que criamos, e por enfrentarmos juntas noites em claro na condução dos experimentos.

Às grandes amigas, Eliane Tie Oba e Laila Romagueira, por partilharmos muitos momentos juntas. Agradeço a vocês todo o esforço e auxílio no desenvolvimento deste trabalho. A colaboração e presença de vocês foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos Fábio Castro, Lenize Flores e Wagner Mariano. Pelo período em que moramos juntos, dividindo as dificuldades e as alegrias, construindo um lar que abrigou muitos que passaram pela fisiologia. Esta arte é para poucos.

À grande amiga Diana Monteiro por incansavelmente me consolar quando eu achava que tudo estava perdido. Muitas vezes, sem perceber, me ensinou que não se desiste facilmente.

Aos grandes amigos Cléo Leite e André Cruz, por tornarem os dias em São Carlos mais felizes. Por dividirem comigo grandes dilemas da vida.

Às amigas profa. Dra. Ana Kalinin, Dra. Cleoni Carvalho e Dra. Mônica Jones pelas sugestões durante o desenvolvimento do trabalho e pela participação na banca de qualificação. Obrigada pelo auxílio e pela amizade.

Agradeço

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas e do Departamento de Ciências Fisiológicas.

Em especial à profa. Dra. Keico Nonaka pela amizade.

À professora Marisa Narciso Fernandes por permitir o uso dos equipamentos de seu laboratório.

Ao professor Pedro Padilha, (Unesp- Botucatu) pelo auxílio nas análises químicas.

Aos amigos Fernando "Foguinho", Fernanda, Lyandra, Luciano, Charles, Mariana, Juliana, Kátia, Valéria, Jeane, José Roberto, pela amizade e alegrias compartilhadas.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato e Profa. Dra. Margarida Maria Barros, mestres e amigos, e a Profa Dra. Marisa Narciso Fernandes e Profa. Dra. Flávia Rios, por aceitarem colaborar nesta etapa de avaliação.

Agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho, auxiliando na minha formação profissional e científica.

RESUMO

O sulfato de cobre (CuSO_4) é amplamente utilizado na aquicultura. A exposição ao cobre pode ser danosa aos peixes e resultar em alterações no metabolismo oxidativo e danos no tecido branquial, dificultando as trocas gasosas. Pacus, *Piaractus mesopotamicus*, ($\text{Wt} = 43,4 \pm 3,35$ g), foram distribuídos em tanques experimentais ($n = 10$; 180 L) e expostos por 48 h ao controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L^{-1}), 2.0Cu (2.0 mg.L^{-1}), 0CupH (sem adição de cobre, $\text{pH} = 5.0$), 0.4CupH (0.4 mg.L^{-1} , $\text{pH} = 5.0$), 2.0CupH (2.0 mg.L^{-1} , $\text{pH} = 5.0$), 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L^{-1} , hipóxia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L^{-1} , hipóxia). As respostas do metabolismo oxidativo ao cobre mostraram-se tecido-específicas. No fígado e no músculo vermelho a superóxido desmutase (SOD) foi responsiva aos aumentos de cobre aquático. As atividades da glutatona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) mostraram íntima relação entre a atividade destas peroxidases. Os intermediários metabólicos plasmáticos e os parâmetros hematológicos nos peixes do grupo 0.4Cu foram semelhantes aos do grupo controle. Por outro lado, a exposição a 2.0Cu causou aumento na concentração de piruvato plasmático, número de eritrócitos (Eri) e concentração de hemoglobina (Hb). A concentração de cobre no plasma [Cu_p] aumentou no grupo 0.4Cu e diminuiu no 2.0Cu, sugerindo não haver relação linear entre o cobre presente na água e o cobre absorvido. As exposições a 0.4Cu e 2.0Cu resultaram em diminuição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase e aumento na concentração de metalotionina (MT) branquial. A exposição dos peixes a 0CupH diminuiu a concentração de glicose e piruvato com aumento do Eri, da Hb e na atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial. Estas respostas sugerem que o organismo acionou mecanismos para reverter o quadro de acidez no sangue, poupar energia e elevar a captação de oxigênio. No metabolismo oxidativo hepático do grupo 0CupH houve aumento da atividade da SOD. Possivelmente, a GSH-Px foi efetiva em manter as concentrações de hidroperóxido (HP). A CAT foi sensível às variações do pH. No músculo branco houve aumento do HP sem alteração das defesas antioxidantes (DAs). Houve diminuição na concentração plasmática de glicose, lactato, piruvato, amônia e aumento no Eri, Hb e na atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial, sugerindo que, em hipóxia, o pacu tendeu a aumentar a captação de O_2 e reduziu o metabolismo na tentativa de reverter a diminuição do pH do sangue. A avaliação dos biomarcadores em resposta ao cobre em meio ácido sugere uma interação entre estes fatores do metabolismo oxidativo, sendo, estas respostas, tecido-específicas. Os intermediários metabólicos se comportaram de maneira diferente, mas Eri e Hb tiveram o mesmo padrão de resposta nos peixes expostos ao cobre em pH neutro e pH ácido. Os intermediários metabólicos, os parâmetros hematológicos e o metabolismo oxidativo foram influenciados pela interação significativa entre cobre e oxigênio dissolvido. A MT se mostrou um efetivo biomarcador por responder ao cobre em diferentes pHs e oxigênio dissolvido. Os fatores associados, cobre + meio ácido e cobre + hipóxia, causaram distúrbios significativos nos biomarcadores em relação aos fatores isolados.

ABSTRACT

Copper sulfate (CuSO_4) is widely used in aquaculture. Exposure to this compound can be harmful to fish, resulting in oxidative metabolism alterations and gill tissue damages, prejudicing the respiratory gasses exchange. Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (Wt = $43,4 \pm 3,35$ g) were distributed in experimental tanks (n = 10; 180 L) and exposed for 48 h to control (without copper addition), 0.4Cu ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 2.0Cu ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 0Cu_{pH} (without copper addition, pH = 5.0), 0.4Cu_{pH} ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 5.0), 2.0Cu_{pH} ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 5.0), 0Cu_{Hpx} (without copper addition, hypoxia), 0.4Cu_{Hpx} ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, hypoxia), e 2.0Cu_{Hpx} ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, hypoxia). The oxidative metabolic responses to copper were tissue-specific. In liver and red muscle the superoxide dismutase (SOD) was responsive to the increases in the aquatic copper. Glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) showed close relation between the activities of these enzymes. The plasmatic intermediary metabolites and hematological variables in fish of group 0.4Cu were similar to those of control group. Conversely, the exposure to 2.0Cu caused an increase in the plasmatic pyruvate, number of red blood cells (RBC) and hemoglobin (Hb). Plasmatic copper concentration [Cu_p] increased in group 0.4Cu and decreased in 2.0Cu, suggesting the absence of linearity between aquatic and the absorbed copper. Exposure to 0.4Cu and 2.0Cu resulted in a reduction in Na^+/K^+ -ATPase activity and an increase in metallothionein (MT) in the gills. Exposure to 0Cu_{pH} caused a decrease in glucose and pyruvate concentrations and increase in RBC, Hb, and branquial Na^+/K^+ -ATPase activity. These responses suggest that the fish acted mechanisms to revert the blood acidosis, save energy and increase the oxygen uptake. In the hepatic oxidative metabolism of fish exposed to 0Cu_{pH}, an increase in SOD activity was observed. Probably GSH-Px was effective in keeping the hydroperoxides concentrations (HP). CAT was affected by pH variations. In the white muscle there was an increase in HP concentration without alteration in the antioxidante defenses (ADs). Plasmatic concentrations of glucose, lactate, pyruvate and ammonia decreased, while RBC, Hb and branquial Na^+/K^+ -ATPase increased, suggesting that pacu exposed to hypoxia tended to increase the oxygen uptake and reduce the metabolism in order revert the blood pH fall. The evaluation of biomarkers in response to copper in acid medium suggests an interaction between these factors in the oxidative metabolism. These responses were tissue-specific. The intermediary metabolites showed different response pattern, but RBC and Hb presented similar responses in fish exposed to copper in neutral and acid pH. The intermediary metabolites, hematological parameters and oxidative metabolism were influenced by the significant interaction between copper and dissolved oxygen. MT was an effective biomarker, responding to copper in different pHs and dissolved oxygen. Combined-factors, copper + acid medium and copper + hypoxia, caused significant disturbance in the biomarkers than single-factors.

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 2 |
| 2.1 O uso do sulfato do cobre em ecossistemas aquáticos e na aquicultura..... | 2 |
| 2.2 Toxicidade do cobre..... | 6 |
| 2.2.1. Conceitos de Toxicologia e Biomarcadores..... | 6 |
| 2.2.2. Mecanismos de ação e fatores que influenciam a toxicidade do cobre..... | 8 |
| 2.2.3. Influência do pH aquático na toxicidade do cobre..... | 12 |
| 2.2.4. Influência do oxigênio dissolvido na toxicidade do cobre | 15 |
| a. Compreendendo os conceitos do metabolismo oxidativo..... | 15 |
| b. Variações na concentração de oxigênio dissolvido na água e seu efeito na toxicidade do cobre..... | 17 |
| 2.4 O uso de biomarcadores na exposição ao cobre e aos fatores que influenciam sua toxicidade..... | 20 |
| a. Metabolismo oxidativo..... | 20 |
| b. Intermediários metabólicos..... | 24 |
| c. Metalotioninas..... | 29 |
| d. Enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase..... | 32 |
| e. Parâmetros Hematológicos..... | 35 |
| 2.5 Considerações sobre a espécie a ser estudada..... | 39 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 40 |
| 4. OBJETIVOS..... | 41 |
| 4.1 Objetivos Gerais..... | 41 |
| 4.2 Objetivos Específicos..... | 42 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS..... | 42 |
| 5.1. Peixes..... | 42 |
| 5.2. Exposição ao cobre, à hipóxia, ao meio ácido, isolados ou associados..... | 43 |
| 5.3 Cobre aquático..... | 43 |
| 5.4 Características do meio aquático..... | 44 |
| 5.5 Obtenção dos tecidos e determinações dos parâmetros..... | 44 |
| a. Metabolismo oxidativo | 44 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| b. Parâmetros hematológicos..... | 46 |
| c. Intermediários metabólicos no plasma..... | 46 |
| d. Concentração de Metalotionina e atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase nas brânquias..... | 47 |
| 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 48 |
| 7. RESULTADOS..... | 49 |
| 7.1 Parâmetros aquáticos..... | 49 |
| 7.2 Observações comportamentais..... | 50 |
| 7.3 Avaliação dos efeitos simples dos fatores..... | 51 |
| 7.3.1. Efeitos do incremento do cobre aquático em pH neutro e normóxia..... | 51 |
| a. Metabolismo oxidativo..... | 51 |
| b. Intermediários metabólicos..... | 53 |
| c. Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e concentração de Metalotionina branquial | 54 |
| d. Concentração de cobre plasmático [Cu _p] e pH sanguíneo | 54 |
| e. Parâmetros Hematológicos..... | 55 |
| 7.3.2. Efeitos da exposição ao meio ácido..... | 60 |
| 7.3.3. Efeitos da exposição à hipóxia..... | 67 |
| 7.4 Efeito da interação entre os fatores..... | 74 |
| 7.4.1 Efeito da interação dos níveis de cobre e dos níveis de pH..... | 74 |
| a. Metabolismo oxidativo..... | 74 |
| b. Intermediários metabólicos..... | 76 |
| c. Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e concentração de Metalotionina branquial | 76 |
| d. Concentração de cobre plasmático [Cu _p] e pH sanguíneo..... | 76 |
| e. Parâmetros Hematológicos..... | 77 |
| 7.4.2 efeito da interação dos níveis de cobre e dos níveis de oxigênio dissolvido..... | 84 |
| a. Metabolismo oxidativo..... | 84 |
| b. Intermediários metabólicos..... | 85 |
| c. Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e concentração de Metalotionina branquial | 86 |
| d. Concentração de cobre plasmático [Cu _p] e pH sanguíneo..... | 86 |
| e. Parâmetros Hematológicos..... | 86 |
| 8. DISCUSSÃO..... | 93 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 8.1 Avaliação dos efeitos simples dos fatores..... | 93 |
| 8.1.1 efeitos do incremento do cobre aquático em pH neutro e normóxia..... | 93 |
| a. Metabolismo oxidativo..... | 93 |
| b. Intermediários metabólicos..... | 97 |
| c. Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, concentração de Metalotionina branquial e [Cu _p]..... | 98 |
| d. Parâmetros Hematológicos..... | 101 |
| 8.1.2 exposição ao meio ácido..... | 102 |
| a. Metabolismo oxidativo..... | 102 |
| b. Intermediários metabólicos..... | 104 |
| c. Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, concentração de Metalotionina branquial e [Cu _p]..... | 104 |
| d. Parâmetros Hematológicos..... | 105 |
| 8.1.3 Exposição à hipóxia..... | 106 |
| a. Metabolismo oxidativo..... | 106 |
| b. Intermediários metabólicos..... | 106 |
| c. Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, concentração de Metalotionina branquial e [Cu _p]..... | 107 |
| d. Parâmetros Hematológicos..... | 108 |
| 8.2 Efeito da exposição associada dos fatores..... | 109 |
| 8.2.1 incremento do cobre em meio ácido..... | 109 |
| a. Metabolismo oxidativo..... | 109 |
| b. Intermediários metabólicos..... | 112 |
| c. Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, concentração de Metalotionina branquial e [Cu _p]..... | 114 |
| d. Parâmetros Hematológicos..... | 117 |
| 8.2.2 incremento do cobre em hipóxia..... | 119 |
| a. Metabolismo oxidativo..... | 119 |
| b. Intermediários metabólicos..... | 121 |
| c. Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, concentração de Metalotionina branquial e [Cu _p]..... | 123 |
| d. Parâmetros Hematológicos..... | 125 |
| CONCLUSÕES..... | 127 |
| REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 129 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Tabela 1 | Parâmetros físico-químicos de temperatura (°C), alcalinidade (CaCO ₃ ; mg L ⁻¹), dureza (CaCO ₃ ; mg.L ⁻¹), concentração de Na ⁺ (mEq L ⁻¹), concentração de K ⁺ (mEq L ⁻¹), e de amônia (mg L ⁻¹), da água dos aquários experimentais coletados ao início (0 h) e término do período experimental (48 h). | 50 |
| Tabela 2 | Razão R _{px} (GSH-Px/CAT) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao controle (sem adição de cobre, pH neutro e normóxia), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ cobre, pH neutro e normóxia), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH neutro e normóxia), por 48 horas. | 53 |
| Tabela 3 | Razão R _{EO} (HP/(GSH-Px+CAT)) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao controle (sem adição de cobre, pH neutro e normóxia), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ cobre, pH neutro e normóxia), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH neutro e normóxia), por 48 horas. | 53 |
| Tabela 4 | Concentrações plasmáticas de glicose (μmol.mL ⁻¹), lactato (μmol.mL ⁻¹), piruvato (μmol.mL ⁻¹), amônia (μmol.mL ⁻¹) e proteína (mg.mL ⁻¹) no pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao grupo 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre); por 48 horas. Valores são média ± DP. | 54 |
| Tabela 5 | Eri (x10 ⁶ .μL ⁻¹), Htc (%), Hb (g.dL ⁻¹), CHCM (%) e VCM (fL) de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao grupo 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre); por 48 horas. Valores são média ± DP. | 55 |
| Tabela 6 | HP (nmol.g tecido ⁻¹), SOD (USOD.mg proteína ⁻¹), GSH-Px (nmol.mg proteína ⁻¹) e CAT (nmol.mg proteína ⁻¹) no fígado de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média ± DP. | 78 |
| Tabela 7 | HP (nmol.g tecido ⁻¹), SOD (USOD.mg proteína ⁻¹), GSH-Px (nmol.mg proteína ⁻¹) e CAT (nmol.mg proteína ⁻¹) no músculo vermelho de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média ± DP. | 79 |
| Tabela 8 | HP (nmol.g tecido ⁻¹), SOD (USOD.mg proteína ⁻¹), GSH-Px (nmol.mg proteína ⁻¹) e CAT (nmol.mg proteína ⁻¹) no músculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média ± DP. | 80 |
| Tabela 9 | Razão R _{px} (GSH-Px/CAT) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5,0), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5,0); por 48 horas. | 75 |
| Tabela 10 | Razão R _{EO} (HP/(GSH-Px+CAT)) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao grupo 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5,0), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5,0) por 48 horas. | 75 |
| Tabela 11 | Concentrações plasmáticas de glicose (μmol.mL ⁻¹), lactato(μmol.mL ⁻¹), piruvato(μmol.mL ⁻¹), amônia (μmol.mL ⁻¹) e proteína (mg.mL ⁻¹) de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média ± DP. | 81 |

| | | |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Tabela 12 | Na ⁺ /K ⁺ -ATPase ($\mu\text{M Pi.mg prote\u00edna}^{-1}. \text{h}^{-1}$), Metalotionina (MT.g ⁻¹ tecido), [Cu _p] ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e pH sang\u00fc\u00edneo de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores s\u00e3o m\u00e9dia \pm DP. | 82 |
| Tabela 13 | Eri ($\times 10^6. \mu\text{L}^{-1}$), Htc (%), Hb (g.dL ⁻¹), CHCM (%) e VCM (fL) de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores s\u00e3o m\u00e9dia \pm DP. | 83 |
| Tabela 14 | HP (nmol.g tecido ⁻¹), SOD (USOD.mg prote\u00edna ⁻¹), GSH-Px (nmol.mg prote\u00edna ⁻¹) e CAT (nmol.mg prote\u00edna ⁻¹) no f\u00edgado de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, hip\u00f3xia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) por 48 horas. Valores s\u00e3o m\u00e9dia \pm DP. | 87 |
| Tabela 15 | HP (nmol.g tecido ⁻¹), SOD (USOD.mg prote\u00edna ⁻¹), GSH-Px (nmol.mg prote\u00edna ⁻¹) e CAT (nmol.mg prote\u00edna ⁻¹) no m\u00fasculo vermelho de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, hip\u00f3xia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) por 48 horas. Valores s\u00e3o m\u00e9dia \pm DP. | 88 |
| Tabela 16 | HP (nmol.g tecido ⁻¹), SOD (USOD.mg prote\u00edna ⁻¹), GSH-Px (nmol.mg prote\u00edna ⁻¹) e CAT (nmol.mg prote\u00edna ⁻¹) no m\u00fasculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, hip\u00f3xia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) por 48 horas. Valores s\u00e3o m\u00e9dia \pm DP. | 89 |
| Tabela 17 | Raz\u00e3o R _{px} (GSH-Px/CAT) no f\u00edgado, m\u00fasculo vermelho e m\u00fasculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao grupo 0CuHpx (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, hip\u00f3xia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) e 2.0CuHpx (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) por 48 horas. | 85 |
| Tabela 18 | R _{EO} (HP/(GSH-Px+CAT)) no f\u00edgado, m\u00fasculo vermelho e m\u00fasculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao grupo 0CuHpx (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, hip\u00f3xia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) e 2.0CuHpx (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) por 48 horas. | 85 |
| Tabela 19 | Concentra\u00e7\u00f5es plasm\u00e1ticas de glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), am\u00f4nia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) e prote\u00edna (mg.mL ⁻¹) de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto 0Cu controle (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, hip\u00f3xia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) por 48 horas. Valores s\u00e3o m\u00e9dia \pm DP. | 90 |
| Tabela 20 | Na ⁺ /K ⁺ -ATPase ($\mu\text{M Pi. prote\u00edna}^{-1}. \text{h}^{-1}$), Metalotionina (MT.g ⁻¹ tecido), [Cu _p] ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e pH sang\u00fc\u00edneo de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, hip\u00f3xia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) por 48 horas. Valores s\u00e3o m\u00e9dia \pm DP. | 91 |
| Tabela 21 | Eri ($\times 10^6. \mu\text{L}^{-1}$), Htc (%), Hb (g.dL ⁻¹), CHCM (%) e VCM (fL) de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto a 0Cu controle (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adi\u00e7\u00e3o de cobre, hip\u00f3xia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre, hip\u00f3xia) por 48 horas. Valores s\u00e3o m\u00e9dia \pm DP..... | 92 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Diagrama conceitual das formas químicas do cobre e do modelo-branquial de ligação do cobre. Adaptada de Pagenkopf, 1983. | 9 |
| Figura 2 | Escala de pH, mostrando a faixa recomendável para piscicultura. (Adaptado de Wurts & Durborow, 1992). | 12 |
| Figura 3 | Exemplar de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> | 40 |
| Figura 4 | Concentração nominal versus concentração mensurada ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos diferentes aquários experimentais, determinado ao início (0 h) do período experimental. | 49 |
| Figura 5 | Concentração de HP (nmol.g tecido ⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína ⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína ⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína ⁻¹) (D) no fígado do pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao controle (sem adição de cobre); 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle ($p < 0,05$). | 56 |
| Figura 6 | Concentração de HP (nmol.g tecido ⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína ⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína ⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína ⁻¹) (D) no músculo vermelho de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao controle (sem adição de cobre); 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle ($p < 0,05$). | 57 |
| Figura 7 | Concentração de HP (nmol.g tecido ⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína ⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína ⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína ⁻¹) (D) no músculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao controle (sem adição de cobre); 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle ($p < 0,05$)..... | 58 |
| Figura 8 | Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase branquial ($\mu\text{M Pi. proteína}^{-1}. \text{h}^{-1}$) (A) e da concentração de Metalotionina branquial (MT.g ⁻¹ tecido) (B) de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao grupo controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle ($p < 0,05$) | 98 |
| Figura 9 | Concentração de cobre no plasma [Cu _p] ($\mu\text{g.L}^{-1}$) (A) e do pH do sangue (pH _{sg}) (B) de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao grupo controle (sem adição de cobre), (0.4 mg.L ⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L ⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle ($p < 0,05$)..... | 59 |
| Figura 10 | Concentração de HP (nmol.g tecido ⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína ⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína ⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína ⁻¹) (D) no fígado de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias ($p < 0,05$). | 61 |
| Figura 11 | Concentração de HP (nmol.g tecido ⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína ⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína ⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína ⁻¹) (D) no músculo vermelho de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias ($p < 0,05$). | 62 |
| Figura 12 | Concentração de HP (nmol.g tecido ⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína ⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína ⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína ⁻¹) (D) no músculo branco de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias ($p < 0,05$). | 63 |
| Figura 13 | Concentrações plasmáticas de glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (A), lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (B), piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (C), amônia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (D) de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias ($p < 0,05$). | 64 |

- Figura 14** Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial ($\mu\text{M Pi. prote\^i}na^{-1}. h^{-1}$) (**A**) e da concentra\c{c}o\~n de Metalotionina branquial (MT.g^{-1} tecido) (**B**) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CupH (sem adi\c{c}o\~n de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$).65
- Figura 15** Concentra\c{c}o\~n de cobre no plasma [Cu_p] ($\mu\text{g.L}^{-1}$) (**A**) e do PH do sangue (pH_{sg}) (**B**) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CupH (sem adi\c{c}o\~n de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$). 65
- Figura 16** Eritr\^o\c{c}ito (Eri; $\times 10^6.\mu\text{L}^{-1}$) (**A**), hemat\^o\c{c}rito (Htc; %) (**B**), concentra\c{c}o\~n de hemoglobina (Hb; g.dL^{-1}) (**C**), MCHC (%) (**D**) e MCV (fL) (**E**) e prote\^i\c{c}a plasm\~atica (mg.mL^{-1}) (**F**) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CupH (sem adi\c{c}o\~n de cobre, pH=5,0), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$). 66
- Figura 17** Concentra\c{c}o\~n de HP ($\text{nmol.g tecido}^{-1}$) (**A**), SOD ($\text{USOD.mg prote\^i}na^{-1}$) (**B**), GSH-Px ($\text{nmol.mg prote\^i}na^{-1}$) (**C**) e CAT ($\text{UB.mg prote\^i}na^{-1}$) (**D**) no f\^i\c{c}ado de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CuHpx (sem adi\c{c}o\~n de cobre, hip\^o\c{c}xia), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$). 68
- Figura 18** Concentra\c{c}o\~n de HP ($\text{nmol.g tecido}^{-1}$) (**A**), SOD ($\text{USOD.mg prote\^i}na^{-1}$) (**B**), GSH-Px ($\text{nmol.mg prote\^i}na^{-1}$) (**C**) e CAT ($\text{UB.mg prote\^i}na^{-1}$) (**D**) no m\^u\c{c}ulo vermelho de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CuHpx (sem adi\c{c}o\~n de cobre, hip\^o\c{c}xia), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$). 69
- Figura 19** Concentra\c{c}o\~n de HP ($\text{nmol.g tecido}^{-1}$) (**A**), SOD ($\text{USOD.mg prote\^i}na^{-1}$) (**B**), GSH-Px ($\text{nmol.mg prote\^i}na^{-1}$) (**C**) e CAT ($\text{UB.mg prote\^i}na^{-1}$) (**D**) no m\^u\c{c}ulo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CuHpx (sem adi\c{c}o\~n de cobre, hip\^o\c{c}xia), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$). 70
- Figura 20** Concentra\c{c}o\~es plasm\~aticas de glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (**A**), lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (**B**), piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (**C**), am\^o\c{c}nia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (**D**) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CuHpx (sem adi\c{c}o\~n de cobre, hip\^o\c{c}xia), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$).71
- Figura 21** Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial ($\mu\text{M Pi. prote\^i}na^{-1}. h^{-1}$) (**A**) e da concentra\c{c}o\~n de Metalotionina branquial (MT.g^{-1} tecido) (**B**) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CuHpx (sem adi\c{c}o\~n de cobre, hip\^o\c{c}xia), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$). 72
- Figura 22** Concentra\c{c}o\~n de cobre no plasma [Cu_p] ($\mu\text{g.L}^{-1}$) (**A**) e do PH do sangue (pH_{sg}) (**B**) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CuHpx (sem adi\c{c}o\~n de cobre, hip\^o\c{c}xia), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$). 72
- Figura 23** Eritr\^o\c{c}ito (Eri; $\times 10^6.\mu\text{L}^{-1}$) (**A**), hemat\^o\c{c}rito (Htc; %) (**B**), concentra\c{c}o\~n de hemoglobina (Hb; g.dL^{-1}) (**C**), MCHC (%) (**D**) e MCV (fL) (**E**) e prote\^i\c{c}a plasm\~atica (mg.mL^{-1}) (**F**) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adi\c{c}o\~n de cobre) e 0CuHpx (sem adi\c{c}o\~n de cobre, hip\^o\c{c}xia), por 48 horas. Valores s\~ao m\~edia \pm DP. * representa diferen\c{c}a entre as m\~edias ($p < 0,05$). 73

1. INTRODUÇÃO

O aumento mundial da contaminação de sistemas de água doce com inúmeros compostos químicos industriais e naturais é hoje um dos principais problemas ambientais (Schwarzenbach et al., 2006). Mineração, emissão de esgoto doméstico, aplicação de fertilizantes e pesticidas degradam severamente os ecossistemas aquáticos com metais pesados. Estas substâncias por não serem componentes naturais do organismo são chamadas xenobióticos (Livingstone, 1993; 1998; Zagatto e Bertoletti, 2006). O ambiente aquático está, portanto, exposto a processos de poluição causados pela variedade e quantidade de substâncias químicas que nele ingressam. Via de regra, os estudos realizados para se conhecer o comportamento e os efeitos dos químicos nos organismos aquáticos são baseados na observação dos efeitos dos componentes isolados. Ferreira et al. (2008) acreditam que este modo de abordagem vem sendo modificado com o aumento das pesquisas de exposição a efeitos combinados.

As principais fontes de poluição nas águas interiores podem ser atribuídas a descargas de águas não tratadas, resíduos de efluentes industriais e resíduos da agricultura. A aquicultura, caracterizada nas últimas décadas como potencial atividade agropecuária (Newman, 1993), não está isenta desta negativa contribuição, uma vez que utiliza, em sua cadeia produtiva, compostos que interferem diretamente na cadeia trófica dos sistemas aquícolas. Muitas vezes, estes compostos se revelam tóxicos também aos organismos em produção e, na verdade, a intensificação da aquicultura teve como consequência a elevada incidência e severidade de doenças (Pavanelli et al., 1998). Além disso, as altas densidades de cultivo dos organismos aquáticos aumentam a concentração de matéria orgânica nos viveiros de produção, dificultando a manutenção da qualidade da água de cultivo (Kubitza, 1998). Dentre os principais produtos utilizados na piscicultura, para contornar as dificuldades no processo produtivo, podemos citar o sulfato de cobre (CuSO_4) que, quando utilizado indevidamente, gera efeitos tóxicos para as espécies aquáticas (Beaumont et al., 2000; Novelli Filho et al., 2000).

Os metais pesados, quando presentes em altas concentrações, estão entre as mais nocivas substâncias ativas capazes de causar sérios impactos nos sistemas metabólicos, fisiológicos, e até mesmo estruturais, nos organismos a eles expostos. Ao mesmo tempo, alguns metais agem como nutrientes essenciais em concentrações não-tóxicas (Tort, 1987). É o caso do cobre, que embora seja elemento essencial para o crescimento saudável dos organismos (Prasad, 1984; Cousins, 1985), mesmo em pequenas concentrações, pode ser perigoso para a biota aquática (Nriagu, 1990).

O íon cobre, elemento traço essencial em biologia, se torna único quimicamente devido à sua propriedade de adotar status redox distinto, apresentando-se nas formas oxidada (Cu^{2+}) e reduzida (Cu^+). Conseqüentemente, íons cobre servem como importantes co-fatores catalíticos na química redox de proteínas que possuem funções biológicas fundamentais exigidas no crescimento e desenvolvimento. Segundo Pena et al. (1999) estas proteínas são representadas, principalmente, pela Cu-Zn superóxido dismutase, enzima envolvida no processo de destoxificação de radicais livres, citocromo *c* oxidase, transportadora de elétrons na mitocôndria e pela metalotionina, seqüestradora de cobre. Proteínas que exigem cobre estão envolvidas em uma série de processos biológicos e alterações em suas atividades sempre causam distúrbios nos processos fisiológicos.

Os padrões de acumulação dos xenobióticos são diferentes para os distintos organismos e dependem do balanço entre a taxa de assimilação e a taxa de metabolização e eliminação destes compostos. Devido às diferenças nas formas de metabolizar os xenobióticos, é necessário detectar e avaliar o impacto de poluentes nos organismos expostos e não somente considerar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais. As respostas ao estresse são caracterizadas por mudanças fisiológicas e os efeitos dos poluentes nos peixes são obtidos por testes de toxicidade aguda e crônica (Heath, 1991). Os processos fisiológicos normais são afetados bem antes da morte de um organismo, justificando o uso de indicadores fisiológicos e bioquímicos para compreendermos as alterações decorrentes da exposição sub-letal a tóxicos (Van der Merwe et al., 1993).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O uso do sulfato do cobre em ecossistemas aquáticos e na aquicultura

Entre os numerosos compostos orgânicos que entram nos ecossistemas aquáticos o cobre é um dos mais difundidos poluentes e suas concentrações variam com sua forma química (Roy, 1997). O cobre é um componente natural do ambiente aquático e pode ser encontrado nas formas particulada, coloidal e dissolvido. Entre as fontes naturais de cobre encontram-se o intemperismo e as atividades vulcânicas. Como fontes antropogênicas destacam-se a mineração, atividades de fundição e a incineração. Além disso, o cobre é amplamente utilizado em formulações de fungicidas, bactericidas, algicidas e fertilizantes (Buratini e Brandelli, 2006). Desta forma, os organismos aquáticos podem ser expostos ao cobre tanto de maneira intencional como acidental. As descargas industriais de compostos de cobre são geralmente

adicionadas em águas onde os parâmetros variam consideravelmente. Características como a alcalinidade da água, dureza e pH influenciam fortemente a ação do cobre na água e, portanto, sua biodisponibilidade para os peixes (Laurén e McDonald, 1986; Mazon e Fernandez, 1999; Tao et al., 1999).

O sulfato de cobre (CuSO_4) é um dos compostos mais utilizados como algicida e herbicida aplicado em reservatórios, lagos, e em viveiros de peixes (Effler et al., 1980; Carbonell e Taranoza, 1993). É amplamente utilizado para controlar a floração de algas e o crescimento de organismos aquáticos indesejados em viveiros de aquicultura (Thornton e Rast, 1997). O CuSO_4 é, também, regularmente utilizado como agente terapêutico em peixes (Straus, 1993) no controle efetivo de doenças bacterianas branquiais e uma variedade de parasitas, com destaque para infestações tais como a ictiofitiríase (*Ichthyophthirius multifiliis*, *Piscinoodinium pillulare*, Reardon e Harrel, 1990) e monogenea, *Anacanthorus penilabiatus*. Em países como o México, ou em continentes como América do Norte (Thorburn e Moccia, 1993), Ásia (Tonguthai, 1997) e África (Hecht e Eddemann, 1998), são feitas aplicações intermitentes de CuSO_4 em peixes saudáveis como forma de profilaxia para prevenção de epidemias (Rábago-Castro et al., 2006).

Segundo Zagatto (1995), durante muito tempo foi aplicado quase que diariamente o CuSO_4 , numa quantidade aproximada de quatro toneladas por dia, no controle de algas cianofíceas do reservatório Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. Mozeto e Zagatto (2006) descrevem que, embora o cobre aplicado se complexa e acabe sendo carregado para o fundo, depositando-se no sedimento, é freqüente encontrar residual de cobre dissolvido nas águas do reservatório, principalmente, nas regiões onde a aplicação é mais intensa.

Em relatos obtidos após entrevista com técnicos e/ou piscicultores de agroindústrias no estado de São Paulo, SP, Brasil, o uso de CuSO_4 ocorre tanto com o objetivo profilático no controle de infestações de parasitas branquiais, como na busca da melhoria das condições da água dos viveiros que, em decorrência da intensidade de arraçamento e da elevada densidade de cultivo, podem ficar com excesso de partículas dissolvidas. Os banhos terapêuticos, segundo estes relatos, chegam a ser feitos aplicando-se nos viveiros CuSO_4 em doses de até 600g.m^{-2} ($150\text{ mg.L}^{-1}\text{ Cu}^{2+}$). Em parte destas constatações consta também que a aplicação em viveiros de cimento, nesta mesma concentração, causou mortalidade em 100% dos animais e que quando aplicados em viveiros de terra os animais chegaram a vir à superfície mostrando dificuldade respiratória.

Carvalho e Fernandes (2006) concluíram que o uso do CuSO_4 no controle de algas e parasitas de peixes deve considerar a sensibilidade da espécie ao cobre e principalmente o pH

da água dos viveiros de aquicultura. Além disso, os mecanismos bioquímicos em resposta à exposição ao cobre buscam restabelecer a homeostase e ocorrem, muitas vezes, no lugar de outras funções fisiológicas, interferindo no ganho de peso e crescimento, comprometendo a eficiência produtiva.

A toxicidade do cobre tem sido estudada em muitas espécies de peixe, sendo influenciada não só pela concentração do metal na água, mas também, por vários fatores que interferem na sua biodisponibilidade ao organismo exposto. As concentrações letais (CL50) de cobre para peixes de água doce variam intra e inter espécie. Na variação inter espécie, para o CuSO_4 , verificam-se valores de poucos $\mu\text{g.L}^{-1}$ a alguns mg.L^{-1} . Os dados apresentados na publicação do EPA (2007) mostram a amplitude de variação com valores de $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ para “northern squawfish”, *Ptychocheilus oreg*, (Andros e Garton, 1980) a $84600 \mu\text{g.L}^{-1}$ para “golden shiner”, *Notemigonus crysoleucas* (Hartwell et al., 1989). Muitas vezes a CL50 varia para uma mesma espécie, como no caso do “fathead minnow”, *Pimephales promela*, sendo que foram citadas CL50 de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Schubauer-Berigan et al., 1993) a $1485,90 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Erickson et al., 1996). Estudos como o de DeBoeck et al. (2004) mostraram que a exposição ao cobre foi altamente tóxica à truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, com CL50 (96 h) de $210 \mu\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado, a exposição crônica desta mesma espécie em fase juvenil, a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ por 28 dias, não teve efeito no crescimento ou no consumo alimentar dos indivíduos expostos.

Variações na toxicidade crônica de cobre entre as espécies de peixes, estágios de vida e qualidade da água foram verificados por Brix et al. (2001). Estas grandes variações são decorrentes da fase de vida, do tamanho do indivíduo exposto e das características físico-químicas da água. As concentrações usuais, segundo Boyd e Massaut (1999), variam de $0,5$ a $2,0 \text{mg.L}^{-1}$ de cobre. As recomendações práticas do uso de CuSO_4 em piscicultura são baseados somente na alcalinidade da água. De acordo com Wurts e Durborow (1992), o cobre não deve ser aplicado em águas com alcalinidade menor que 20mg.L^{-1} , preservando assim a vida dos peixes no viveiro.

Concentrações excessivas podem resultar em acúmulo do excesso do íon cobre e subsequente toxicidade, o que pode indiretamente reduzir o crescimento, a reprodução e a alimentação dos organismos expostos (Boyd, 1990). As variações nas recomendações técnicas baseadas na alcalinidade e na diversidade de dados resultantes dos testes de toxicidade, incoerentes com as aplicações praticadas na aquicultura mundial, demonstram que a utilização do CuSO_4 vem sendo feita de forma irregular, pois muitas vezes não são observados os parâmetros físico-químicos da água de uso.

A qualidade da água nos viveiros de cultivo de organismos aquáticos, principalmente de piscicultura, é afetada por interações dos diversos componentes químicos presentes neste ambiente. O pH dos viveiros varia diariamente devido à respiração e fotossíntese e quanto maior a concentração de organismos que liberam CO₂ na água, maior a oscilação deste parâmetro (Wurts e Durborow, 1992). Alguns autores descrevem a importância de se verificar as condições da água dos viveiros antes da aplicação do CuSO₄. Muitos destes alertas estão relacionados às características de diminuição do oxigênio dissolvido (OD) em consequência da presença e da mortalidade das algas, demonstrando então a possibilidade de, no momento da aplicação destes composto, o OD e o pH estarem diminuídos.

Wurts e Durborow (1992) descrevem que se um vasto *bloom* de algas cobrir grande parte do viveiro, não é recomendado o uso de CuSO₄, pois este tratamento irá provavelmente causar morte repentina das algas, podendo resultar em diminuição de OD, decorrente desta mortalidade, sufocando os peixes. Boyd (1998) também alerta para as aplicações de CuSO₄ em viveiros onde a superfície da água estiver coberta com plantas aquáticas em mais de 2/3. Porém, Boyd (1998) indica aplicações sucessivas deste composto de maneira a eliminar gradualmente estas macrófitas, evitando depleção de OD em função da decomposição destas. Este mesmo autor alerta ainda que assim que a concentração de cobre diminuir a níveis sub-letais para estes organismos, eles voltam a crescer, cobrindo novamente a superfície do viveiro. Assim, esta prática deve ser feita periodicamente, evitando o crescimento destes organismos indesejáveis, caracterizando esta ação como prática sucessiva.

Na aqüicultura, devido ao baixo tempo de residência do íon cobre na coluna d'água, há grande propensão deste íon se acumular nos sedimentos dos viveiros de cultivo. Han et al. (2001) verificaram que viveiros de piscicultura que receberam aplicações periódicas de CuSO₄ acumularam cerca de 40 mg.kg⁻¹ Cu para cada 1kg.ha⁻¹. As aplicações sucessivas destes compostos podem levar ao excesso de íon cobre no sedimento, e a maior preocupação com este excesso é que ainda não se compreende como age este “reservatório” de cobre, pois, acredita-se que ele não é só depósito de materiais mas sim um compartimento ativo que intercambia espécies, contaminantes ou nutrientes com a coluna d'água (Mozeto e Zagatto, 2006).

2.2 Toxicidade do cobre

2.2.1. Conceitos de Toxicologia e Biomarcadores

Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo a interação entre substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (Plaa, 1982). Nos testes de toxicidade, são estudadas as relações entre a dose de um poluente e seus efeitos nos organismos expostos. Inicialmente, os testes avaliam o efeito na sobrevivência dos organismos em estudo e posteriormente avaliam os efeitos da exposição a concentrações sub-letais, na tentativa de compreender os mecanismos que auxiliam os organismos a sobreviverem à exposição aos xenobióticos. Muitas biotransformações em enzimas ou outras proteínas são induzidas pela exposição a diferentes tipos de poluentes, formando a base para a utilização dos biomarcadores.

Linvingstone (1993) considera como biomarcadores os fluídos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, exposição a xenobiótico. Depledge (1993) caracteriza ainda como biomarcador as variações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que podem ser mensuradas em amostras de tecidos ou fluídos corporais. Unâнимes são os autores em apontar que as diferenças nestes biomarcadores fornecem evidências da exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos. Existem biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes. Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição ou de efeitos. Um biomarcador de exposição será qualquer alteração biológica mensurável que evidencie a exposição dos organismos a um poluente, exemplificado pela atividade das enzimas antioxidantes (Winzer et al., 2001) ou pela concentração de metalotioninas (McCarthy e Shugart, 1990). Biomarcadores de efeito serão aqueles que evidenciam algum efeito tóxico associado à exposição do organismo ao poluente, assim como, a peroxidação de lipídeos ou danos no DNA (Van Der Oost, 2003).

O estudo dos biomarcadores frente à exposição a xenobióticos nos permite descrever de maneira adequada efeitos induzidos por vários estressores ambientais em qualquer nível de organização biológica, do nível celular ao ecossistema. Deste modo, um biomarcador é um indicador da qualidade do ambiente, considerado como resposta biológica a químicos e que fornece a extensão da exposição do efeito tóxico. Os biomarcadores são mais comumente usados em exposições de indivíduos a diferentes concentrações sub-letais. Porém, a

concentração de um biomarcador bioquímico em um dado tecido também pode variar em resposta a características intrínsecas do organismo, como a fase de desenvolvimento e a idade (Hyne e Maher, 2000). Outro aspecto importante a ser considerado quando se avaliam efeitos induzidos por contaminantes químicos à biota é que, nos sistemas aquáticos naturais, os organismos podem estar expostos não a um único contaminante, mas sim, a uma miríade ou mistura de diferentes substâncias (Rand et al., 1995).

Os efeitos tóxicos das substâncias dependem de muitos fatores, incluindo a natureza do químico, a via de exposição, o local de ação, as vias metabólicas e a dose. Fundamentalmente, todos os efeitos tóxicos envolvem mecanismos moleculares e só podem ser entendidos se estes mecanismos forem conhecidos. A toxicidade se inicia com a interação com o alvo bioquímico. Segundo Mazon e Fernandes (2001), a relação entre o ambiente aquático e a superfície epitelial implica em que o tecido branquial, a pele e o intestino sejam os primeiros a entrar em contato com os poluentes, tornando estes órgãos potenciais indicadores da qualidade ambiental.

Para a compreensão dos efeitos de poluentes como metais, são fundamentais os estudos da assimilação, acumulação e excreção destes poluentes em organismos aquáticos. O termo biodisponibilidade varia consideravelmente e é normalmente específico a certas situações. Porém, uma definição genérica e usual é a relativa facilidade com que o químico é transferido do ambiente a uma localidade específica nos organismos de interesse. A biodisponibilidade, entre outros fatores, é diretamente influenciada pela forma química do componente avaliado (McDonald et al., 1989).

A superfície ativa dos metais na água é altamente dependente da química da água (McDonald et al., 1989). Entre os fatores mais importantes estão o pH, a dureza e a capacidade complexante do metal. A caracterização físico-química da água pode interferir diretamente na influência do cobre para os organismos. Sunda e Lewis (1978) descreveram que a presença de quelantes reduz a toxicidade do cobre por meio da formação de complexos biológicos indisponíveis. O efeito dos quelantes na redução da toxicidade do cobre para fitoplâncton foi demonstrado por Erickson et al. (1970) e Davey et al. (1973). Para Grosell et al. (2007), grande parte da variação dos efeitos do cobre é atribuída ao tamanho do peixe. De acordo com Blust et al. (1991), não há relação direta entre a concentração de cobre no meio e sua tomada e toxicidade. A dureza da água também pode afetar a toxicidade de vários poluentes, especialmente de metais. Geralmente, metais são menos tóxicos em águas mais duras, desde que o pH seja mantido constante (Aragão e Araújo, 2006).

2.2.2. Mecanismos de ação e fatores que influenciam a toxicidade do cobre

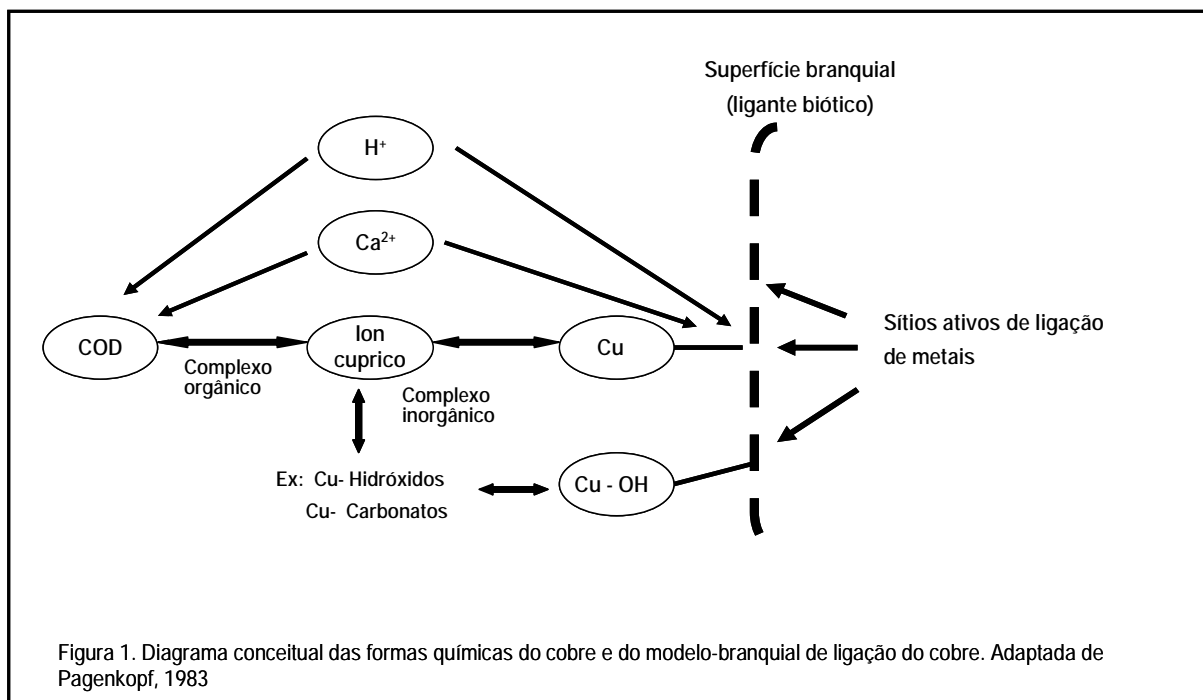
A toxicidade do cobre varia em relação a aspectos do ambiente de exposição, da sua forma química e em relação ao organismo e espécies expostas. Os mecanismos pelo qual o cobre irá agir no organismo a ele submetido dependerão inicialmente de sua absorção, o que diretamente afetará sua toxicidade. Porém acredita-se que, uma vez absorvido, o cobre induza a vários danos que podem levar à morte do organismo (Sanchez et al., 2005). Pesquisas realizadas com a exposição de diversas espécies de peixes ao cobre demonstraram que não somente sua absorção, mas a luta contra a absorção do cobre causa distúrbios nestes organismos aquáticos.

Existe grande influência do meio na absorção do cobre, pois ele compete com outros metais pelos sítios ativos de ligação nas brânquias. Há também a influência das características do meio aquático nas formas químicas do cobre, o que influencia diretamente sua biodisponibilidade e, indiretamente, seus efeitos nos organismos, pois irá interferir na captação do metal do meio. Os efeitos dos fatores físico-químicos que afetam a toxicidade do cobre são muitos e a especificidade química da água de exposição irá determinar se existirá efeito na especificidade do cobre e dos resultados da forte relação da toxicidade do cobre livre.

Em águas com concentrações adequadas de oxigênio, o cobre livre existe na forma de Cu^{2+} , fracamente associado com moléculas de água ($\text{Cu}\cdot n\text{H}_2\text{O}^{+2}$) mas, esta espécie normalmente representa a menor porcentagem do cobre total. Muito do cobre dissolvido é parte de complexos fortes com vários ligantes, incluindo compostos orgânicos dissolvidos, hidróxidos, carbonatos e outros ligantes inorgânicos (EPA, 2007). A diversidade de formas químicas que o cobre apresenta na água, torna complexa sua forma de absorção pelos organismos e a compreensão da sua biodisponibilidade. O modelo proposto por Pagenkopf (1983) é, atualmente, a base para a compreensão dos mecanismos de ação do cobre (EPA, 2007) nos organismos aquáticos. Este modelo (Figura 1) descreve a complexidade da ação do cobre, influenciado diretamente pela caracterização do ambiente aquático. Os estudos da toxicidade deste metal priorizam, ainda, a relação entre a existência de um ligante biótico neste contexto. Este ligante é representado pelas brânquias, por sítios de ligações nelas presentes e por sua complexidade química que também interfere na toxicidade do metal, caracterizando assim o Modelo Biótico Ligante (BLM).

Reações que ocorrem entre soluções podem afetar a forma e abundância em que uma espécie química, em particular uma substância, está presente e, conseqüentemente, pode influenciar a toxicidade direta que uma dada concentração total desta substância tem para organismos aquáticos. Isto parece ser o caso de soluções contendo cobre onde muito do cobre

Cu^{2+} combina-se com outros compostos (Shaw e Brown, 1974). A influência da especificidade do cobre decorrente da sua forma química é apresentada em vários estudos. Campbell et al. (1999) descrevem que a tomada de cobre pelas brânquias da truta arco-íris segue um modelo cinético, relativo à redução do Cu^{2+} a Cu^+ e que estas alterações ocorrem antes mesmo do contato com a membrana de transporte. Bogdanova et al. (1999) descreveram a possibilidade desta redução ocorrer na superfície da membrana extracelular sendo catalisado por substâncias com grupamento sulfidríla.



De acordo com Grosell et al. (2002; 2007), a concentração de cobre em ambientes aquáticos não é o único fator que dita a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos. Muitos autores relatam que a toxicidade do cobre varia em função das mudanças nas características físicoquímicas da água de exposição, tais como temperatura, compostos orgânicos dissolvidos, partículas suspensas, pH e vários cátions e ânions inorgânicos, incluindo os que determinam dureza e alcalinidade.

Normalmente, a toxicidade do cobre é reduzida pelo aumento na dureza da água (Sprague, 1968; Hunt, 1987; Campbell, 1995; Allen e Hansen, 1996) que é composta de cátions (principalmente de cálcio e magnésio) que não interagem diretamente com o cobre em solução para reduzir sua biodisponibilidade. Em muitos casos, o efeito aparente da dureza na toxicidade pode ser parcialmente em função da complexação do cobre com altas concentrações de hidróxidos e/ou carbonatos (aumento do pH e da alcalinidade) normalmente associados com

alta dureza (Inglis e Davis, 1972; Chakoumakos et al., 1979; Miller e Mackay, 1980; Erickson et al., 1987).

Existem evidências de que a toxicidade do cobre é afetada pelas condições de exposição cujos efeitos lhe são atribuídos por interferirem na sua biodisponibilidade. Entretanto, não pode ser presumido que todos os efeitos observados dos fatores físico-químicos na toxicidade do cobre refletem na biodisponibilidade ou que o efeito na biodisponibilidade é devido somente à complexação e competição com os cátions pelos ligantes. O efeito varia em função do tipo de metal e da água. Portanto, em estudos ecotoxicológicos é necessário considerar a dureza da água.

Neste sentido Aragão et al. (2003) avaliaram a dureza total das águas superficiais do Estado de São Paulo. Os resultados obtidos permitiram classificar essas águas como moles, com dureza média de $31 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ e possibilitaram justificar a utilização de água mole para a realização de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos no Estado. Assim, dependendo da química da bacia hidrográfica, sistemas caracterizados por apresentarem baixa dureza normalmente contém uma variedade de ligantes, tais como bicarbonato, flúor, sulfato, ácidos fúlvico e húmico. Muitos destes ligantes irão formar complexos relativamente estáveis, diminuindo a toxicidade dos metais. Sabe-se ainda que não somente a dureza e alcalinidade ditarão se o cobre estará mais ou menos biodisponível pois, o pH, temperatura, quantidade de material ligante entre outras características influenciarão na toxicidade deste metal.

Segundo Cassee et al. (1998), a interação entre compostos pode interferir em mecanismos do sistema biológico como no próprio processo de absorção, na distribuição, no metabolismo e na excreção ou até mesmo na toxicodinâmica, agindo nos receptores químicos destes. Grande (1967), por exemplo, relatou que quando peixes salmonídeos foram expostos ao cobre, em águas altamente moles, a toxicidade do cobre foi reduzida quando substâncias húmicas estavam presentes. Baixos níveis de nitrogênio, contendo ácidos orgânicos com propriedades quelantes, também reduziram a toxicidade de soluções de sais de cobre (Sprague, 1968).

Assim, acredita-se que existam fatores que interferem na forma química em que o cobre está presente na água, outros que irão modificar sua absorção por alterarem sua forma química na superfície de absorção, os que competem com este metal pelos mesmos sítios de ligação na superfície de absorção e fatores que indisponibilizam o cobre por se associarem a ele. Devido às dificuldades e limitações em se determinar e avaliar os metais e suas ações, tornaram-se

necessárias pesquisas que mostrassem e quantificassem os efeitos de parâmetros da qualidade da água que modificam a toxicidade de cada metal.

As brânquias dos peixes são a principal via de absorção de metais, representando uma vasta área de superfície (McKim, 1994). A especificidade do metal no microambiente pode ser alterada pela secreção de muco branquial pois o epitélio branquial é normalmente coberto com uma matriz extracelular contendo uma variedade de glicoproteínas (Tao et al., 2002). Assim, os metais podem se ligar ao muco branquial diminuindo sua disponibilidade (Varanasi e Markey, 1978).

O pH no microambiente da superfície branquial é diferente do pH da água do ambiente ao seu redor devido à influência das liberações de amônia, dióxido de carbono e outros compostos (Lin e Randall, 1990). Tem sido adotado, portanto, que mudanças na biodisponibilidade dos metais podem ser decorrentes das mudanças do microambiente branquial. Estas mudanças são associadas basicamente às alterações do pH deste microambiente e da complexação dos metais com o muco. Porém, estes dois fatores respondem a mudanças no pH do ambiente (Tao et al., 2002).

Tao et al. (2000) verificaram que, em carpa comum, *Cyprinus carpio*, a perda de carbono orgânico, que indiretamente corresponde ao muco branquial quando determinada na água que passou pelas brânquias, aumentou exponencialmente em resposta ao aumento de cobre aquático em pH ácido. O muco protetor é continuamente lavado pelo fluxo de água na respiração (Tao et al., 2000; Takasusuki et al., 2004) e repostado por novo muco secretado pelas células.

Pelgrom et al. (1995) expuseram a tilápia mossâmbica a níveis de cobre (50, 100 e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$) resultando em aumento significativo da concentração de cobre nas brânquias e no plasma, de modo mais proeminente nos peixes expostos a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Estes mesmos autores afirmaram que somente o plasma e não as células sangüíneas apresentou elevada concentração de cobre, indicando que muito do cobre que entra pelas brânquias é transportado pelo plasma. Estes resultados indicaram haver ceruloplasmina no sangue da tilápia sendo esta a principal proteína transportadora do cobre na corrente sangüínea. Entretanto, não houve direta relação entre a concentração de ceruloplasmina plasmática e concentrações de cobre na água.

Paris-Palacios et al. (2000) não encontraram linearidade entre a bioconcentração de cobre e sua concentração na água. Em “snakehead”, *Chana sp.*, e “killifish”, *Fundulus heteroclitus*, a bioconcentração diminuiu com o aumento do cobre ou de outros metais na água (Segner e Branubeck, 1990). De acordo com estes autores, os peixes não desenvolvem regulação das

ligações com metais abaixo de certas concentrações e baixas concentrações de metais na água podem resultar em alta bioacumulação. Estudos na cinética da toxicidade do cobre em truta arco-íris sugerem rápida eliminação do cobre. Assim, a concentração plasmática deve alcançar situação de equilíbrio após poucas horas ou dias (Carbonell e Tarazona, 1994).

2.2.3. Influência do pH aquático na toxicidade do cobre

O pH é definido como o logaritmo negativo (co-log) da concentração de íons hidrogênio (H^+) e, de modo simples, indica quão ácida ou básica está a água. Águas com pH = 7,0 são consideradas neutras. Abaixo deste valor são caracterizadas como ácidas e acima de 7,0 básicas. O pH da maioria dos tanques de cultivo de água doce estão entre 6,0 e 9,0, podendo variar diariamente em até dois pontos (Boyd, 1998). Vários fatores, como a poluição ambiental e a chuva ácida, afetam o pH aquático (Heath, 1991). Tanto o pH alto quanto o baixo são potencialmente tóxicos para peixes, conforme exemplificado na Figura 2. Existe uma faixa ideal de pH (6,5 a 9,0) para a sobrevivência da maioria dos peixes e abaixo ou acima dela, mecanismos bioquímicos e fisiológicos podem ser acionados na busca de sobrevivência a esta adversidade.

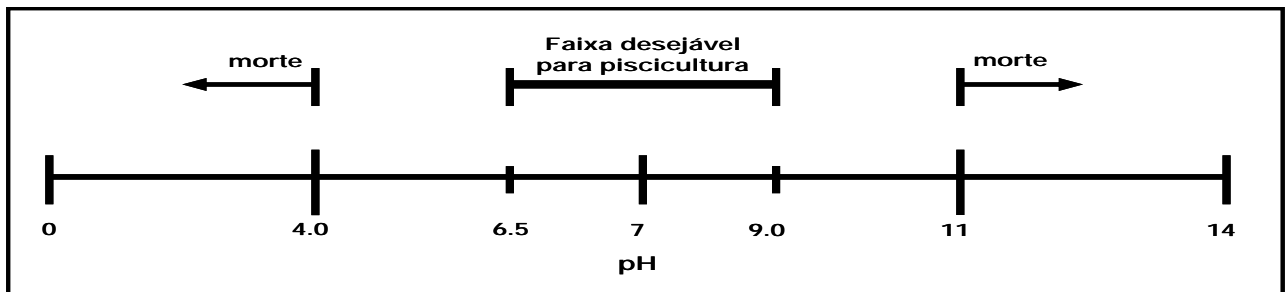


Figura 2: Escala de pH, mostrando a faixa recomendável para piscicultura. (Adaptado de Wurts e Durborow, 1992).

O pH tem efeito marcante na forma química em diversas substâncias potencialmente tóxicas e, conseqüentemente, pode ter grande influência na toxicidade. Stiff (1971) relatou que substâncias alcalinas inorgânicas ligam-se ao Cu^{2+} em pH neutro ou alcalino. Por outro lado, a diminuição no pH libera íon cúprico deste complexo. Muitos fatores bióticos e abióticos influenciam a biodisponibilidade e a toxicidade dos metais para organismos aquáticos. Além disso, as relações entre fatores que afetam a toxicidade nem sempre são lineares. Por exemplo, o pH baixo pode tanto aumentar como diminuir a toxicidade de metais em ecossistemas de

água doce (Campbell e Stokes, 1985). Os efeitos do pH aquático na atividade dos metais são complexos, uma vez que o pH afeta tanto a solubilidade quanto a especificidade de muitos metais (McDonald et al., 1989).

Dentre os efeitos das características químicas da água na toxicidade dos metais, o fator pH é o mais complexo de ser compreendido (McDonald et al., 1989). Os efeitos do pH na toxicidade do cobre são de particular importância em águas moles e de baixa alcalinidade, como a maioria das águas continentais brasileiras. Em água dura, a toxicidade do cobre é menor devido a complexação com Ca^{2+} e CO_3^{2-} (Playle et al., 1992), enquanto que em águas moles, que têm baixa concentração de Ca^{2+} e têm baixo poder tampão, acredita-se que a toxicidade do cobre seja maior, especialmente em baixo pH. A dureza da água, altos valores de pH ou baixa alcalinidade reduzem a letalidade do cobre para os peixes (Zitko e Carson, 1976; Howarth e Sprague, 1978; Erickson et al., 1996) mas, em pHs menores que 6,5, hidróxidos de cobre tóxicos são formados (Stouthart et al., 1996).

O cobre e o pH baixo parecem ser similares no mecanismo de toxicidade pois, ambos são caracterizados por causar produção excessiva de muco e sua precipitação nas brânquias, sendo a morte então atribuída por asfixia. O baixo pH inibe a absorção de Na^+ e Cl^- através das brânquias e estimula a difusão passiva do efluxo destes íons (Wood, 1989; 2001). O cobre também inibe a absorção de íons e favorece sua perda, o que pode aumentar os efeitos do pH (Wood 2001; Mazon et al., 2002a). Estudos realizados em água doce, onde as mudanças de concentração dos íons hidrogênio são mais pronunciadas, mostraram que a formação de complexos do cobre com ligantes orgânicos diminuem a sua absorção e toxicidade (Dodge e Theis, 1979; Guy e Kean, 1980, Borgmann e Ralph, 1983; Buckley, 1983; Starodub et al., 1987). Entretanto, também foi demonstrado que a absorção e toxicidade do cobre aumentou com a diminuição da concentração de íons hidrogênio, diminuindo a concentração de íons cupríco (Andrew et al., 1977; Howarth e Sprague, 1978; Chakoumakos et al., 1979; Miller e Mackay, 1980; Cusimano et al., 1986; Laurén e McDonald, 1986; Starodub et al., 1987). Nestas circunstâncias, acredita-se não haver relação direta entre a concentração de íons cúprico na solução e a absorção e toxicidade deste metal em organismos aquáticos (Blust et al., 1991).

O pH pode alterar a biodisponibilidade do cobre de três maneiras distintas: (1) modificando a forma química do metal na solução; (2) modulando a atividade do sistema de transporte do metal e (3) modificando processos fisiológicos que influenciam direta ou indiretamente os processos de tomada do metal (ex. alterando os potenciais de membrana, regulação osmótica e iônica; metabolismos energéticos) (Williams, 1981; Viarengo, 1989). Em

ambientes ácidos, a forma mais biodisponível do cobre é o cátion livre (Cu^{2+}) (Laurén e McDonald 1985; 1986; Tao et al., 2000; 2002). Já em água com pH alcalino, a forma mais biodisponível é o complexo de hidróxido de cobre ($\text{Cu}(\text{OH})_2$) (Playle et al., 1992; Tao et al., 2002).

Em ambientes básicos o cobre é complexado com hidrogênio e carbonato, mas em ambientes ácidos os íons cúprico e algumas espécies inorgânicas (ex: CuCl^+ e CuSO_4) tornam-se mais importantes. Para a mesma concentração de CO_2 dissolvido, o complexo com o carbonato é importante em um ambiente básico mas não em ambiente ácido (Blust et al., 1991). Por isto, é esperada maior toxicidade do cobre em pH ácido e menor em pH alcalino.

Os resultados da exposição do crustáceo eurialino artêmia, *Artemia franciscana*, a concentrações crescentes de cobre mostraram que a absorção deste metal aumentou linearmente em relação à sua concentração na solução e que este fato foi maior em água básica e neutra, quando comparado à água ácida (Blust et al., 1991). Estes mesmos autores explicam que o efeito dos íons hidrogênio na absorção do metal é expresso como ionização do sistema de transporte do metal, ressaltando que alterações no pH do meio modificam o processo de absorção do cobre. A protonação dos sítios de ligação envolvidos no seqüestro e transporte do cobre é exemplo da modificação causada pelas alterações na concentração de íon hidrogênio no mecanismo de absorção do cobre. Por isto, a protonação aumenta a absorção e biodisponibilidade dos íons cúprico livres e/ou outras espécies de íons cúprico com alterações do pH. Uma vez que mudanças na concentração de íons cúprico e na concentração de hidróxidos cúpricos são dependentes de pH, não é experimentalmente possível, de forma clara, separar os efeitos do pH na especificação do metal do efeito do pH no processo de absorção dos metais.

Menezes (2005) encontrou para o tambaqui, *Colossoma macropomum*, uma CL50 (96 h) de $2,68 \text{ mg.L}^{-1}$ Cu em pH 4,0. Este valor é quatro vezes maior do que o estimado por Oliveira (2003) para a mesma espécie, porém em pH 7,3. Outros resultados demonstraram que o curimatá, *Prochilodus scrofa*, apresentou maior sensibilidade ao cobre em pH 8 ($15 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$), se comparado com o valor de CL50 em pH 4 ($200 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) (Takasusuki et al., 2004).

Carvalho e Fernandes (2006) avaliaram a toxicidade do cobre em curimatá e obtiveram valores de CL50 (96 h) de 98 e $88 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ em pH 4,5 e 16 e $14 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ em pH 8,0, nas temperaturas de 20 e 30° , mostrando que esta espécie foi mais sensível ao cobre em pH básico que em pH ácido, nas duas temperaturas, concluindo que a toxicidade do cobre para esta

espécie depende do pH da água, corroborando os achados de Takasusuki et al. (2004). Os achados de Cusimano et al. (1986) também confirmaram que os efeitos do cobre em pH ácido diminuíram para truta arco-iris. Carvalho e Fernandes (2006) sugeriram que a diminuição da toxicidade do cobre em pH ácido pode ser decorrente da competição do H^+ e do Cu^{2+} pelo mesmo sítio de ligação no epitélio branquial (Laurén e McDonald, 1985), que é a principal superfície corporal de difusão água-sangue (Mazon et al., 2002a).

Çoğum e Kargin (2004) avaliaram a bioconcentração do cobre no fígado, brânquias e músculo da tilápia do Nilo em diferentes pHs (5,5, 7,8 e 9,5) por 7, 15 e 30 dias, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 $mg.L^{-1}$. Estes autores verificaram que em todos os pHs testados o acúmulo de cobre nos tecidos aumentou, significativamente, com o aumento de cobre na água e com o tempo de exposição. O acúmulo de cobre nos tecidos dos peixes expostos ao pH ácido foi maior do que o dos peixes expostos aos outros valores de pH.

Takasusuki et al. (2004) verificaram que, em curimatá, a exposição a concentrações crescentes de cobre aumentou o acúmulo deste metal no plasma, em pH alto e baixo. Porém, em pH 4,5 a concentração no plasma foi maior que em pH 8,0. As maiores concentrações, após 96 h de exposição, ocorreram nas brânquias e plasma com valores 250% maiores que no grupo controle.

2.2.4. Influência do oxigênio dissolvido na toxicidade do cobre

a. Compreendendo os conceitos do metabolismo oxidativo

O oxigênio, no seu estado molecular (O_2), é essencial para muitos processos metabólicos vitais, forçando a vida aeróbica a resistir a uma notável toxicidade caracterizada pelo chamado “paradoxo da vida aeróbica” (Ahmad, 1995). Os organismos aeróbicos são, muitas vezes, sujeitos a variações na concentração de oxigênio no meio (Davies, 2000). O paradoxo do oxigênio é derivado de sua natureza química. Na sua forma atômica (O), o oxigênio é um radical livre e na sua forma molecular (O_2) é um bi-radical livre (Davies, 2000), caracterizado por possuir um elétron não pareado na sua camada atômica mais externa. Quando dois átomos de oxigênio combinam para formar uma molécula de oxigênio, seus elétrons permanecem como dois elétrons não pareados. Esta natureza de bi-radical permite a reação de oxidação/redução. A redução tetravalente do oxigênio, catalisada pela citocromo *c* oxidase no final da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, produz água. Entretanto, reduções monovalentes geram diversos intermediários reativos, comumente conhecidos como espécies

reativas do oxigênio (EROs) (Sies, 1986). Se um único elétron é aceito pela molécula de O_2 ele deve atingir um dos orbitais mais externos, obtendo como produto o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Além da origem comum no metabolismo aeróbico (Fridovich, 1975), outra fonte importante de $O_2^{\bullet-}$ é o “burst respiratório” das células fagocíticas quando estas entram em contato com partículas invasoras.

Adicionando-se um segundo elétron ao $O_2^{\bullet-}$ ocorre a formação do íon peróxido O_2^{2-} que não possui elétron não pareado e não é um radical, mas é capaz de gerar novos pró-oxidantes (Dröge, 2002). Qualquer O_2^{2-} formado em pH fisiológico irá imediatamente sofrer protonação, gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em soluções aquosas o $O_2^{\bullet-}$ sofre a reação de dismutação para formar H_2O_2 e O_2 . A taxa de dismutação é mais rápida em valores de pH mais ácidos (Halliwell e Gutteridge, 1984).

A ruptura hemolítica de O-O do H_2O_2 produz dois radicais hidroxilas ($\bullet OH$) que possuem alta taxa de reação com grande parte das moléculas encontradas nos organismos vivos. A reatividade do $\bullet OH$ é tão alta que se os $\bullet OH$ forem formados em organismos vivos irão reagir imediatamente com moléculas biológicas ao redor, produzindo radicais secundários com reatividade variada. Um sistema biológico que produz $O_2^{\bullet-}$ provavelmente produzirá H_2O_2 , a não ser que o $O_2^{\bullet-}$ reaja imediatamente com outra molécula, por meio da reação de dismutação. A taxa na qual isto ocorre depende do pH, da concentração de $O_2^{\bullet-}$ e da ação de mecanismos de defesa. Acredita-se que os radicais hidroxila são os responsáveis por danos celulares que incluem peroxidação lipídica em membranas, oxidação direta de proteínas e clivagem de moléculas de DNA e RNA (Pena et al., 1999).

A oxidação biológica é um processo primitivo e, em face da inevitável conseqüência da toxicidade do O_2 , a evolução proporcionou estratégias apropriadas de defesa para sobreviver ao “paradoxo do oxigênio”. Quando formas mais complexas da vida aeróbica se desenvolveram, a elaboração de defesas antioxidantes se diversificou e se adaptou a novas situações. A primeira linha de defesa é composta por substâncias antioxidantes como a vitamina C, E, o ácido úrico, glutathiona e carotenóides. Além do mais, diversas enzimas de defesa antioxidantes (DAs) previnem a cascata oxidante, reagindo, interceptando e inativando os EROs, encerrando o ciclo da peroxidação lipídica. As enzimas antioxidantes são cruciais no esforço em conter a toxicidade do oxigênio, quando o suprimento de outros compostos antioxidantes está escasso ou esgotado (Ahmad, 1995), atuando ainda em conjunto com estes compostos. O estresse oxidativo (EO) ocorre quando a taxa de geração de EROs excede a da sua remoção (Sies, 1986), podendo haver excesso na produção de EROs em níveis que comprometem a

capacidade destes compostos em combater sua formação ou até mesmo a inibição destes mecanismos. Os efeitos deletérios do EO incluem a oxidação de proteínas, DNA e componentes esteróides, assim como, a peroxidação de lipídeos na membrana celular. Esta reação produz hidroperóxidos de lipídeos (HP) instáveis, produtos que, em decomposição, são altamente reativos, ameaçando a integridade celular, perpetuando o ciclo de peroxidação (Sies, 1986). Muitos poluentes ambientais podem induzir o EO em animais aquáticos, incluindo os peixes e estes mecanismos vêm ganhando muita atenção no campo da ecotoxicologia (Lemaire et al., 1996).

b. Variações na concentração de oxigênio dissolvido na água e seu efeito na toxicidade do cobre

Segundo Braum e Junk (1982), Saint-Paul (1984) e Val (1986) as oscilações extremas no oxigênio dissolvido no ambiente exigem dos organismos aquáticos, notadamente dos peixes, uma série de respostas adaptativas. Estas respostas envolvem desde manifestações comportamentais, como migrações laterais e o acionamento da respiração na superfície aquática, até o desencadeamento de ajustes fisiológicos e bioquímicos, com aumento do hematócrito e da taxa de hemoglobina, alterações enzimáticas e processos de regulação gênica.

A produção de EROs tem íntima relação com a proporção de O₂ consumido pelo organismo. Neste sentido, mudanças na disponibilidade do O₂ podem resultar em estresse oxidativo (Wilhelm Filho et al., 1993). Segundo Degroot e Littauer (1989), como a velocidade de formação dos EROs é proporcional ao consumo de O₂ e à quantidade de mitocôndrias presentes no tecido, a expectativa inicial é de que situações de hipóxia resultem em diminuição da velocidade de geração de EROs. Entretanto, sob determinadas condições, a geração pode ser aumentada também durante estas condições. No caso de um quadro isquêmico ou mesmo hipoxêmico, onde o O₂ está presente em concentrações que limitam sua redução para H₂O pela citocromo *c* oxidase, o aumento da capacidade de redução da cadeia respiratória, aliado ao acúmulo de co-fatores reduzidos (potencial redutor) nas células, pode aumentar a produção de O₂[•] pelos componentes da cadeia transportadora de elétrons (Freeman e Crapo, 1982). Geralmente os aumentos destes intermediários reativos são acompanhados, compensatoriamente, por respostas dos sistemas de proteção antioxidantes enzimáticos (Freeman e Crapo, 1981), evitando assim o EO.

Sabe-se que em órgãos de mamíferos submetidos à hipóxia e à reoxigenação ocorre aumento na produção de EROs causando oxidação dos componentes celulares, incluindo proteínas e lipídeos de membranas (Halliwell e Gutteridge, 1985; Kramer et al., 1994). Os elétrons liberados na cadeia respiratória mitocondrial são reduzidos durante a isquemia. Entretanto, a reoxigenação imediata destes elétrons ocorre após o reinício do refluxo do O₂, reperfundindo o sistema, levando a superprodução de oxiradicais (Ruuge et al., 1991). Tais alterações não só terminam com o período de privação de O₂, mas também, com as conseqüências da reintrodução do O₂ (Storey, 1990; Storey e Storey, 1996). Por outro lado, animais que convivem naturalmente com alterações na disponibilidade de O₂ podem apresentar adaptações bioquímicas. Se a potencialização da produção de EROs e da peroxidação lipídica são prejudiciais aos mamíferos em situação de isquemia e reoxigenação, isto pode ser também um problema para os peixes durante a volta de uma situação de hipóxia ou anóxia. Segundo Lushchak et al. (2001), os sistemas enzimáticos de defesa antioxidante são componentes chave do mecanismo bioquímico, que permitem a sobrevivência de certos moluscos e algumas espécies de vertebrados inferiores durante a anóxia/hipóxia seguida da reoxigenação. O aumento da atividade destas enzimas parece ser importante para a defesa contra a formação de EROs durante a reoxigenação nestas espécies.

Em relação a anóxia ou a hipóxia severa, existem relatos de que não é a redução de oxigênio *per se*, mas sim o retorno à normóxia que se constitui no fator mais crítico das oscilações de OD, influenciando diretamente o metabolismo oxidativo (Barry, 1994). A resposta mais comum à hipóxia observada em peixes é o aumento das defesas antioxidantes, tanto enzimáticas quanto não enzimáticas. Este processo foi denominado por Hermes-Lima et al. (2001) como “preparação para o estresse oxidativo”. Luchchak et al. (2001) em douradinho, *Carassius auratus*, e Cooper et al. (2002), em “spot fish”, *Leiostomus xanthurus*, mostraram que a anoxia ativou as defesas antioxidantes, corroborando os achados de Víg e Necmcsók (1989), Hermes-Lima e Storey (1993; 1998), para ectotérmicos.

A concentração de oxigênio dissolvido na água varia constantemente até mesmo em condições naturais. Ações antropogênicas também contribuem para condições de hipóxia, pois a adição excessiva de compostos orgânicos no meio aquático resulta em *bloom* de algas e microorganismos que podem causar alterações na concentração de OD, especialmente à noite, na fase escura da fotossíntese. Entretanto, a influência do OD na toxicidade foi muito estudada nas décadas de 60 e 70 mas, surpreendentemente, poucas pesquisas foram realizadas após este período (Ratter e Heath, 1995).

Os peixes amazônicos possuem mecanismos que incluem modificações comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que permitem, até certo ponto, a sobrevivência dos indivíduos em ambientes hipóxicos (Almeida-Val et al., 1993; 1999). As respostas fisiológicas frente às reduções nos níveis de OD ocorrem via: (1) aumento da frequência ventilatória, volume ventilatório e redução na frequência cardíaca; (2) aumento no número de eritrócitos circulantes, taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito; (3) aumento na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio ajustado à proporção de fosfato inorgânico (NTP) e taxa de hemoglobina e ajustes no pH sanguíneo; (4) expressão de múltiplas hemoglobinas com diferentes propriedades funcionais; e (5) depressão do metabolismo (Val, 1996). Os ajustes fisiológicos buscam favorecer a tomada de O₂ e transferência para os tecidos. Tais ajustes são acionados assim que o animal detecta alterações na concentração de OD, via sistema sensorial ou via processos metabólicos (Hochachka e Somero, 1984; Woottonm, 1990). Peixes oxi-reguladores são capazes de manter o aporte de O₂ ao organismo até uma tensão crítica de O₂ (PcO₂), a qual varia entre as espécies. A partir desta PcO₂ a tomada de O₂ branquial diminui com sua redução no ambiente. As respostas fisiológicas buscam manter a concentração de oxigênio no sangue até que o custo da ventilação seja maior do que o ganho com o oxigênio tomado do ambiente (Hochachka, 1980; Jensen et al., 1993; Jobling, 1994). Portanto, até a PcO₂ da espécie, é esperado que as respostas fisiológicas e hematológicas à hipóxia mantenham os níveis de O₂ adequados. No entanto, estes ajustes implicam em maior gasto de energia obtida por meio de reservas, como glicogênio, proteínas e lipídeos.

A baixa concentração de OD, condição característica de muitos rios poluídos, foi apontada por muitos autores por aumentar o efeito de tóxicos para peixes (Lloyd, 1961). De acordo com Berner (1981), os depósitos sedimentares e portanto, as formas químicas em que os metais se encontram, podem ser classificadas em função da concentração de OD no ambiente, mostrando a instabilidade dos minerais em função deste fator e as mudanças que irão ocorrer nos sistemas aquáticos, influenciando na toxicidade de diferentes metais pesados. Jackson (1984) avaliou a interação de diversos metais, entre eles o cobre, o zinco e o selênio e seus efeitos em organismos aquáticos, sugerindo haver alterações em função da predominância de condições aeróbias e anaeróbias nos sistemas naturais. Esta inter-relação foi exemplificada com resultados obtidos na interação cobre-zinco, havendo influência do zinco no acúmulo de mercúrio em concentrações hipóxicas, que não se modificaram na presença de maiores concentrações de OD. Lloyd (1961) demonstrou que a toxicidade aguda de zinco, cobre, chumbo, compostos fenólicos e amônia aumentou significativamente em águas com baixa

concentração de OD. O fator principal para esta modificação foi a diminuição do OD, induzindo a um aumento na frequência respiratória, alterando o fluxo de água nas brânquias e, conseqüentemente, influenciando a absorção dos compostos tóxicos. A toxicidade do ácido sulfídrico para *Carassius auratus* aumentou 1,4 vezes quando em hipóxia (Adelman e Smith, 1972). Esses achados demonstraram que as mudanças na toxicidade desses metais não se devem somente à concentração destas substâncias no meio.

Além das ocorrências naturais, a hipóxia em ambientes aquáticos pode também ser conseqüência de ações antropogênicas, aumentando sua frequência, duração e intensidade, resultando muitas vezes em diminuições da biodiversidade (Connolly et al., 2004). Hanazato e Dodson (1995) observaram efeito sinérgico do carbanil (CO.N.C₆H₅) e hipóxia em *Daphnia pulex*. Ferreira et al. (2008) avaliaram os efeitos das concentrações de OD na toxicidade do cádmio e do carbendazim (fungicida agrícola), para *Daphnia magna*. Descreveram que a exposição a condições agudas destes fatores resultou em sinergismo, verificado principalmente na diminuição da CL50, com a diminuição gradativa do OD. Porém, estes autores ressaltaram que a interpretação das possíveis interações entre tóxicos e variações no OD devem ser cautelosas pois, a exposição à hipóxia implica em aumento de estresse. A hipóxia severa causa redução gradual de elétrons na cadeia mitocondrial, levando à formação incontrolada de EROs com conseqüente alteração no status redox (Chandel e Schumacker, 2000). O acúmulo de metais também causa aumento de EROs como H₂O₂, O₂•⁻ e •OH, culminando em estresse oxidativo (Livingstone, 2001; Dautremepuits et al., 2002). Este pode ser o motivo pelo qual, durante exposição de curto período à hipóxia, a *Daphnia* elevou as taxas ventilatórias e cardíaca levando ao aumento da absorção de cádmio (Paul et al., 1998).

2.4 O uso de biomarcadores na exposição ao cobre e aos fatores que influenciam sua toxicidade

a. Metabolismo oxidativo

Como todos os organismos, os peixes também são susceptíveis aos efeitos das EROs e possuem inerentes e efetivas defesas antioxidantes que já estão bem descritas na literatura (Wilhelm Filho, et al., 2005; Martínéz-Álvarez et al., 2005). Dentre os mecanismos de defesa destacam-se a atuação das enzimas antioxidantes. Dentre elas a enzima superóxido dismutase (SOD) que remove o O₂•⁻ por meio da aceleração da reação de dismutação, transformando ânions superóxido em peróxido de hidrogênio (Yim et al., 1993). A SOD é de grande

importância em permitir que os organismos sobrevivam na presença do O₂ e tolerem aumentos na concentração de EROs (Halliwell e Gutteridge, 1985). Yim et al. (1993) e Sanchez et al. (2005) acreditam que, por ser uma metaloenzima, a SOD apresenta rápida resposta à exposição ao cobre como resultado da ligação do metal à enzima. A catalase (CAT), enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio, está distribuída em praticamente todos os tipos celulares, principalmente no fígado e no sangue dos vertebrados superiores. Por possuir alto K_m, a CAT é dificilmente saturada pelo substrato (Scandalios, 2005). Por outro lado, altas concentrações de O₂^{•-} podem inibir sua atividade (Kono e Fridovich, 1982). A enzima glutatona peroxidase, GSH-Px, encontrada também em diferentes tecidos animais. Ela converte a glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG), utilizando como substrato o H₂O₂ (Grisham, 1992).

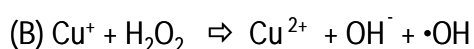
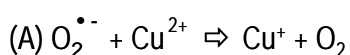
Fatores como o comportamento, condições do ambiente e mudanças sazonais influenciam a atividade das enzimas das DAs. A atividade destas enzimas é tecido-específica. Alguns trabalhos citam atividades em tecidos diferentes e até mesmo ausência de atividade em alguns tecidos, como é o caso da atividade eritrocitária da CAT. Wdzieczak et al. (1982) demonstraram variação da atividade da CAT em muitas espécies de peixes de água doce e de água salgada. A maior atividade, entre os peixes de água doce, foi para a atividade da CAT eritrocitária da perca, *Perca fluviatilis*. Entretanto, Wilhelm Filho et al. (1993) relataram a ausência de atividade da CAT nos eritrócitos de outras espécies de peixes. Diferenças entre tecidos já foram relatadas por Wdzieczak et al. (1982), Radie et al. (1985a; 1985b), Wilhelm Filho et al. (1993) e Otto e Moon (1996). O epitélio das glândulas gasosas da bexiga natatória (Morris e Albright, 1984) e da retina dos peixes (Desrochers e Hoffert, 1983) apresentaram aumento da atividade da SOD, permitindo maior tolerância à toxicidade do oxigênio nestas estruturas. Algo similar foi encontrado no músculo vermelho, que normalmente mostra maiores atividades de SOD (Mazeaud et al., 1979). Estes mesmos autores descreveram que as maiores atividades das DAs ocorrem nos tecidos mais oxidativos. Cassini et al. (1993) e Wilhelm Filho et al. (1993) encontraram correlação positiva entre enzimas antioxidantes e intensidade metabólica.

Nas últimas décadas as pesquisas em ecotoxicologia têm buscado evidências que associem a produção de EROs à contaminação ambiental. Sugere-se que os biomarcadores de estresse oxidativo possam ser utilizados em programas de monitoramento ambiental (McCarthy e Shugart, 1990). Uma vez descoberta a importância de reações de radicais livres nos processos biológicos como mecanismos que auxiliam na destoxificação de xenobióticos, várias pesquisas

sobre processos pró-oxidantes e antioxidantes têm sido realizadas (Halliwell e Gutteridge, 1989).

As águas residuais contêm uma variedade de poluentes orgânicos e metálicos. Muitos deles são fortemente oxidantes (Avci et al., 2005). Ciprinídeos de água doce de áreas sabidamente poluídas mostraram sinais de estresse oxidativo, com aumento das atividades da SOD e CAT e maior peroxidação lipídica quando comparado aos peixes de áreas não poluídas (Gül et al., 2004). Pedrajas et al. (1995) acreditam que a indução da CAT e GSH-Px após exposição ao cobre indica que este metal induz espécies de HP no fígado, sendo que, provavelmente, o H₂O₂ resultante da atividade da SOD foi a fonte para o subsequente aumento da atividade da CAT. Matés (2000) descreveu a capacidade da GSH-Px na destoxificação dos lipoperóxidos produzidos.

O cobre é requisito absoluto para o metabolismo aeróbico e, não obstante, é altamente genotóxico e citotóxico. Muitas teorias buscam explicar os mecanismos pelos quais o cobre é considerado pró-oxidante no metabolismo. Sua toxicidade pode ser causada pela capacidade de catalisar as reações que levam à formação de EROs em peixes (Roméo e Gnassia-Barelli, 1997; Roméo et al., 2000; Lopes et al., 2001). O cobre pode ser reduzido de Cu²⁺ a Cu⁺ via reação de Haber-Weiss (A + B) (Storey, 1996), catalisando a formação de •OH, o mais potente radical oxidante capaz de ligar-se a praticamente todas as moléculas biológicas (Buerttner, 1993). Além disso, quando em altas concentrações, o cobre também colabora com a formação de •OH a partir de hidro e lipoperóxidos (B) já formados por outros processos fisiológicos, aumentando a peroxidação das membranas celulares (Baker et al., 1998).



A exposição a elevadas concentrações de cobre é danosa. Sua toxicidade crônica afeta inicialmente o fígado, pois este é o primeiro local de deposição após entrar na corrente sangüínea. Uma das conseqüências mais conhecidas do excesso de cobre é o dano peroxidativo de membranas lipídicas (Chow, 1979), o que pode gerar alterações nos parâmetros sangüíneos, como hematócrito e concentração de hemoglobina (Gatlin e Wilson, 1986). Os mecanismos de DAs são conhecidos por serem capazes de inativar esta cadeia de peroxidação, evitando a formação do •OH.

Por ser parte integrante da importante enzima antioxidante cobre-zinco superóxido dismutase (Cu, Zn-SOD), a restrição de cobre pode diminuir a função catalítica desta enzima

em vários tecidos, tornando sua atividade um marcador do status de cobre nos diferentes tecidos. O cobre apresenta, portanto, importante papel na prevenção de danos oxidativos (Linder, 2001). Por outro lado, sua carência resulta na redução das atividades da GSH-Px e da CAT (McDermott et al., 1994).

Outras teorias propõem que o cobre liga-se a proteínas inibindo inúmeras enzimas essenciais. Na presença do O₂, a ligação metal-proteína pode ser oxidada irreversivelmente, inativando a enzima (Nakamura & Yamazaki, 1972). As diversas teorias explicativas para a atuação do cobre no metabolismo oxidativo indicam que há, em muitos casos, sinergismo entre estes mecanismos, podendo, participar tanto na formação dos EROs quanto atuar nos mecanismos protéicos, estimulando ou mesmo inibindo enzimas. Rowley e Halliwell (1983) descreveram que, *in vitro*, a adição de sais de Cu⁺ a um sistema gerou altas concentrações de H₂O₂, levando à formação de radicais •OH, mas que esta reação foi prevenida pela adição de concentrações fisiológicas de histidina e albumina. Estes autores concluíram que, as altas concentrações de proteínas no sangue ligam-se ao cobre indisponibilizando-o para catalisar a formação de radicais livres de •OH.

Em peixes existem relatos de que o cobre pode tanto estimular quanto inibir as enzimas antioxidantes, dependendo da dose, da espécie e/ou da via de exposição. Após exposição do “stickleback”, *Gasterosteus aculeatus aculeatus*, às concentrações de cobre de 0, 25, 100 e 200 µg.L⁻¹, Sanchez et al. (2005) observaram rápido aumento nas concentrações das enzimas SOD, CAT e GSH-Px e diminuição das concentrações de GSH. A exposição ao cobre, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias no bass europeu, *Dicentrarchus labrax* (Gwozdinski et al., 1992) e aumentou a atividade da CAT no fígado e rim de carpa comum (Dautremepuits et al., 2004). Paulistinhas (“zebrafish”, *Danio rerio*) expostos a 40 e 140 µg.L⁻¹ de CuSO₄, por duas semanas, mostraram inibição nas atividades da CAT e GST (Paris-Palacios et al., 2000). Da mesma forma, em carpa comum, CAT e GST foram inibidas após 96 h de exposição ao cobre nas concentrações de 100 e 250 µg.L⁻¹ (Dautremepuits et al., 2002). Utilizando injeção intraperitonal de cobre, houve inibição da SOD em carpas após 48 h (Varanka et al., 2001), enquanto esta enzima foi rapidamente induzida em dourada, *Sparus aurata* (Pedrajas et al., 1995).

Muitas das pesquisas de EO em peixes objetivam os aspectos toxicológicos, assim como, os efeitos de diferentes xenobióticos na atividade das enzimas antioxidantes e na intensidade da peroxidação lipídica (Di Giulio et al., 1989; Bairy et al., 1996; Zikic et al., 1996; Hai et al., 1997). Estes parâmetros foram propostos como biomarcadores para contaminantes. Entretanto, revisando os estudos disponíveis, há tendência clara, em muitos casos, de que as

respostas estejam relacionadas à espécie, tecido, parâmetro antioxidante e/ou dose-resposta (Martínez-Alvarez et al., 2005). Estudos relacionados ao estresse oxidativo em peixes abrem novas linhas de pesquisa, gerando maiores conhecimentos na fisiologia e toxicologia de peixes. Novos estudos poderão agregar informações mais precisas a respeito das respostas das defesas antioxidantes nas diferentes espécies de peixes sob variadas circunstâncias, assim como, a respeito dos mecanismos regulatórios destas respostas, trazendo benefícios relacionados à piscicultura e à aquicultura (Martínez-Alvarez et al., 2005).

Normalmente, a avaliação do metabolismo oxidativo é realizada no fígado de peixes (Fitzgerald, 1992). Na musculatura dos peixes, a avaliação do status oxidativo também tem importância, principalmente, pelo alto metabolismo oxidativo e produção de EROs no músculo vermelho (Asknes e Njaa, 1981; Wilhelm Filho et al., 1993) e pela influência direta do metabolismo oxidativo e da oxidação lipídica na qualidade do filé dos peixes a serem consumidos (Sant'Ana e Mancini-Filho, 2000).

b. Intermediários metabólicos

A alteração nas concentrações dos intermediários metabólicos plasmáticos ou teciduais vem sendo empregada em estudos de efeitos de poluentes. Tais parâmetros permitem desenhar os ajustes no metabolismo energético de carboidratos durante o período de exposição a condições adversas (Heath, 1995). A estimulação do metabolismo pode ser claramente refletida nas mudanças no consumo de oxigênio durante a exposição ao cobre (McGeer et al., 2000) ou pelo aumento de excretas metabólicas (ex: amônia; Taylor et al., 1996). Uma das principais fontes de energia utilizada pelos peixes são os carboidratos e sua taxa de utilização depende diretamente da demanda energética do indivíduo (Soengas e Moon, 1995). Muitos peixes quando submetidos a situações de estresse realizam ajustes metabólicos que incluem a redução do metabolismo basal e a utilização de processos como a glicogenólise, que converte o glicogênio armazenado no fígado em glicose (Hochacka e Somero, 1984). Os níveis de glicose sanguíneos são frequentemente citados como indicador fisiológico sensível ao estresse em peixes (Wedemeyer e McLeay, 1981). Segundo Wendell Bonga (1997) e Van Weerd e Komen (1998), o aumento de glicose no plasma, após exposição ao estresse assegura o abastecimento e redistribuição de energia para defender o equilíbrio homeostático.

A hipersecreção de adrenalina e de cortisol são consideradas as primeiras respostas ao estresse. Estas respostas nos peixes podem ser ativadas em decorrência da exposição a metais

pesados (Pratap e Wendelaar Bonga, 1990), alavancando um amplo conjunto de alterações bioquímicas e fisiológicas chamados de estresse secundário. Os efeitos metabólicos incluem hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, catabolismo da proteína muscular e alteração dos níveis de proteína no sangue, colesterol e ácidos graxos livres (Wendelaar Bonga et al., 1990; Jobling, 1994). O cortisol afeta o metabolismo de carboidratos, assim aumentos nos níveis de cortisol são freqüentemente seguidos de hiperglicemia em peixes (Wendelaar Bonga, 1977). Os níveis plasmáticos de glicose têm mostrado correlação com os níveis de cobre na brânquia, até mesmo em longas exposições, e deste modo tem sido sugerido como indicador de estresse (Laurém e McDonald, 1985). A exposição ao cobre interfere no processo de captação de oxigênio por causar alterações histopatológicas nas brânquias. Segundo Mazon et al. (2002b), o aumento da glicose plasmática pode ocorrer de maneira mais severa refletindo a ação do cobre no processo de troca gasosa decorrente das alterações na estrutura branquial. Para suprir a demanda energética na destoxificação e reparação dos processos de exposição ao cobre, o glicogênio e/ou a glicose são mobilizados no fígado. Carvalho (2003) afirma que o cobre em excesso altera o metabolismo celular, requerendo energia para destoxificação.

Hiperglicemia é uma resposta comum a estressores em peixes de água doce e tem sido considerada como indicador de exposição sub-letal a poluentes (Hatting, 1976). Monteiro et al. (2005) avaliaram os efeitos da exposição ao cobre nas concentrações de 40 e 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, por 3, 7, 14 e 21 dias. Observaram aumento na concentração de glicose plasmática com a elevação de cobre aquático, porém, não houve linearidade em relação às concentrações e ocorreu interação positiva entre tempo de exposição e cobre na glicose plasmática. Pelgrom et al. (1995) observaram aumento da glicose plasmática em tilápia mossambica, *Oreochromis mossambicus*, exposta ao cobre (200 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Tavares-Dias et al. (2002) observaram hiperglicemia em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, após exposição a duas doses de 1 mg.L^{-1} CuSO_4 .

Em situações estressantes, como em ambientes com concentração de oxigênio reduzida, determinados peixes podem produzir lactato (Hochacka e Somero, 1984). As concentrações de lactato plasmático são indicativas de ativação de metabolismo anaeróbico. A exposição ao cobre não promoveu alterações nas concentrações de lactato plasmático de bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (Griffin et al., 1999). Dethloff et al. (1999) expuseram truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, ao cobre na concentração de 16 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e não verificaram alterações de glicose e lactato plasmáticos. Outros autores pesquisando os efeitos de concentrações sub-letais do cobre que variaram de 9,5 a 27 $\mu\text{g.L}^{-1}$ também não verificaram alterações do metabolismo glicolítico

(McKim et al., 1970; Christensen et al., 1972). Alterações significativas foram verificadas em concentrações de cobre iguais ou acima de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (McKim et al., 1970; Christensen et al., 1972; Cyriac et al., 1989; Shah et al., 1995).

Peixes cronicamente expostos a contaminantes químicos podem apresentar hipoglicemia, provavelmente devido à combinação de alguns efeitos como depleção do glicogênio hepático, redução da alimentação e até perda de glicose na urina (Heath, 1995). Por exemplo, Haux et al. (1981) observaram que trutas arco-iris expostas ao chumbo, durante 16 semanas, apresentaram redução da glicemia. Winkaler et al. (2001) avaliaram a glicemia de lambaris, *Astyanax sp.*, coletados em diferentes ambientes. Estes autores verificaram que os peixes provenientes dos locais potencialmente mais contaminados apresentaram redução da glicemia, podendo representar estresse crônico. A inibição da atividade da piruvatoquinase pelo cobre e zinco foi descrita em robalo, *Dicentrarchus labrax*, e os efeitos destes metais têm relação com a competição direta com cátions bivalentes pelos sítios de ligação da proteína induzindo variações na conformação da enzima (Isani et al., 1994).

Evidências nas alterações da atividade das enzimas, chave da via glicolítica no fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa*, mantido em pH baixo ou alto, com ou sem adição de cobre, demonstram o efeito do ambiente nas respostas metabólicas adaptativas (Carvalho e Fernandes, 2008). Estes autores observaram alterações no metabolismo dos peixes exigindo alta energia para sobreviver aos efeitos da temperatura, pH e cobre. Takasusuki et al. (2004) expuseram curimatás a concentrações de cobre de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH 4,0 e de 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH 8,0, por 96 h. Observaram aumento na glicose plasmática dos animais expostos ao cobre e pH (alto e baixo) em relação às exposições isoladas destes fatores, refletindo aumento na demanda energética para manter a homeostase. Observaram, ainda, aumento nas concentrações plasmáticas de lactato dos peixes expostos por 24 h ao cobre em pH 4,5; indicando o uso de glicólise anaeróbica neste tecido para suprir os requerimentos energéticos.

A exposição ao cobre e baixo pH, isolados e associados, causou aumento da amônia plasmática (Wilson e Taylor, 1993; Beaumont et al., 1995b; Day e Butler, 1996). Beaumont et al. (2000) encontraram correlação negativa entre a velocidade de natação e a concentração de amônia plasmática, sugerindo que a amônia pode afetar a performance natatória por sua função reguladora de certas vias metabólicas ou por efeitos na função neuromuscular (Beaumont et al., 1995b). Aumentos na concentração de amônia plasmática foram observados por outros autores na associação de exposição a cobre e pH ácido como em truta marrom, *Salmo trutta* (Beaumont et al., 1995a; 2000; Day e Butler, 1996) e truta arco-iris (Wilson e Taylor, 1993).

A P_{CO_2} é a tensão de O_2 abaixo da qual o peixe não é capaz de suprir a demanda de O_2 necessária à manutenção de seu metabolismo aeróbico. Desta forma, o animal passa a utilizar mecanismos como o metabolismo anaeróbico para suprir a demanda energética (Santos, 2006). Hochachka e Somero (1973; 1984) propuseram que organismos ectotérmicos, particularmente os peixes, utilizam estratégias bioquímicas para manter a homeostase metabólica durante oscilações de OD, de temperatura e de outros parâmetros químicos da água. Diminuições do OD são normalmente encontradas em águas tropicais (Almeida-Val et al., 1993). Animais que vivem nestas condições apresentam diferentes estratégias para sobreviver e se adaptar a ela. Dentre elas as respostas bioquímicas contribuem para que os peixes possam enfrentar baixos níveis de OD, tamponando seus efeitos (Moraes et al., 2002).

Em condição de hipóxia severa, a quantidade de oxigênio liberada para os tecidos é menor do que a necessária para a manutenção do metabolismo aeróbico. Como consequência, ocorre uma reorganização metabólica seguida de uma das vias: aumento da taxa de produção anaeróbica de ATP ou diminuição da taxa de ATP (depressão metabólica) (Dunn e Hochachka, 1986). Estes mecanismos envolvem ativação glicolítica tendo como substrato a glicose e/ou o glicogênio e lactato como produto intermediário (Panepucci et al., 2001). Independentemente da resposta bioquímica, as estratégias comportamentais ou fisiológicas decorrentes da exposição à hipóxia são observadas em muitas espécies de peixes, para preservar a deficiência energética celular (Moraes et al., 2002).

Tem sido sustentado que a supressão metabólica é elemento chave da tolerância à hipóxia em uma variedade de organismos, incluindo os peixes (Hochachka e Somero, 1984). Esta diminuição no metabolismo aeróbico, juntamente com a ativação do metabolismo anaeróbico, possibilita a algumas espécies de peixes sobreviverem por longos períodos hipóxicos. Estes ajustes podem ocorrer simultaneamente com outros mecanismos, melhorando a transferência de oxigênio (Val, 1996). Muitos animais expostos à hipóxia e anóxia por longos períodos podem inibir a ativação glicolítica para prevenir acidificação metabólica (Sidell, 1983), pois a diminuição do pH pode prejudicar processos fisiológicos e causar danos severos às células (Van den Thillard e Van Waarde, 1985; Wood, 1991).

De acordo com Vijayan et al. (1997), em tilápia mossâmbica submetida a estresse, o cortisol contribui direta ou indiretamente na produção de glicose, proveniente, provavelmente, da gliconeogênese dos substratos, incluindo lactato e aminoácidos. O lactato é o produto final da glicólise em condições de hipóxia e aumenta por processos fermentativos nos tecidos (Crestani et al., 2006). A fermentação da glicose, gerando lactato, foi descrita por Dunn e

Hochachka (1986). De acordo com Begum e Vijayaraghavan (1999) aumento no conteúdo de lactato indica desordens metabólicas e pode sugerir estresse respiratório severo nos tecidos de peixes.

Almeida-Val et al. (1993) mostraram que o tambaqui, *Colossoma macropomum*, começa a utilizar o metabolismo anaeróbico quando a redução da depressão metabólica não foi mais suficiente ou quando a concentração de O₂ na água alcançou níveis reduzidos (hipóxia severa), aumentando a produção de lactato. Affonso et al. (2002) encontraram, em tambaqui exposto à hipóxia, acúmulo de lactato plasmático, demonstrando dependência do metabolismo anaeróbico. A fermentação glicolítica parece ser uma adaptação comum do tambaqui a condições de estresse (Duncan, 1998). Portanto, a utilização do metabolismo anaeróbico pode ser importante para a sobrevivência de peixes em condições adversas.

Moraes et al. (2002) expuseram a tucunaré, *Gymnotus carapo*, à hipóxia ambiental e observaram aumento de duas vezes no lactato plasmático. Virani e Rees (2000) expuseram o “gulf killifish”, *Fundulus grandis*, à hipóxia e verificaram aumento de 20 vezes no lactato plasmático, indicando aumento no metabolismo anaeróbico. Moraes et al. (1997a) avaliaram os efeitos da exposição do cascudo, *Hypostomus regani*, à hipóxia extrema (8 mg.L⁻¹ OD). Após quatro horas de exposição houve aumento do lactato plasmático, indicando ampla mobilização de intermediários e alta atividade fermentativa. Espécies como o douradinho, *Carassius auratus*, (Shoubridge e Hochachka 1981) e a carpa, *Cyprinus carpio* (Hochachka, 1961) desenvolveram notável capacidade de anaerobiose sob hipóxia severa. Santos (2006) observou níveis constantes de lactato plasmático em decorrência da exposição do matrinxã, *Bryncon cephalus*, à hipóxia, demonstrando que estes valores não se alteraram em decorrência da diminuição metabólica pois foi observada baixa atividade natatória.

As proteínas representam grande fonte energética para os teleósteos (Weber e Zwingslstein, 1995). A redução hepática de proteína em bagre do canal exposto ao clomazone (isoxazolidinonas), herbicida utilizado na agricultura, indica aclimação fisiológica dos peixes para superar a situação de estresse utilizando o catabolismo de proteína para suprir a demanda de energia (Crestani et al., 2006). Santos (2006) avaliou a exposição do matrinxã à hipóxia e observou um aumento de amônia plasmática, possivelmente decorrente da mobilização de aminoácidos para a síntese de glicose e glicogênio em outros tecidos (Walsh e Henry, 1991; Moraes et al., 1996; 2002). Moraes et al. (2002) sugeriram que a concentração elevada de amônia plasmática acompanhada de aminoácidos livres em tucunarés expostos à hipóxia, indica nova síntese de glicose pois, o aumento de amônia foi acompanhado de piruvato e glicose.

Moraes et al. (1997b) avaliaram os efeitos da exposição à hipóxia severa ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ OD), por seis horas, em pacu. Foi observado um aumento da glicose plasmática nas primeiras horas de exposição decaindo posteriormente. Os níveis de lactato plasmático aumentaram no início da exposição, voltando para os níveis-controle após seis horas. Não houve variação na concentração de piruvato plasmático. A relação lactato/piruvato revelou mudanças metabólicas significativas no plasma, caracterizando este tecido como via importante para tamponar o sistema.

Panepucci et al. (2001) avaliaram os efeitos da exposição à hipóxia em pacu, por dois, quatro e seis horas. Estes autores observaram um aumento no lactato plasmático após quatro horas, diminuindo após seis horas, o que demonstra ativação do metabolismo anaeróbico. A diminuição, após 6 h, pode ter-se dado em função da respiração na superfície aquática (ASR), mecanismo utilizado por esta espécie durante períodos de hipóxia severa, para a utilização da camada mais oxigenada da interface ar-água e ventilar suas brânquias (Rantin e Kalinin, 1996; Rantin et al., 1998).

Modificações no pH do sangue afetam o pH intracelular que, por sua vez, pode alterar profundamente o metabolismo, uma vez que a conformação de proteínas e a atividade enzimática são influenciadas por mudanças no pH (Devlin, 1997). A manutenção do pH interno e a regulação iônica são normalmente problemas para peixes em pHs baixo e alto, visto que muitos processos metabólicos necessitam de pH ideal para sua performance (Yesaki e Iwama, 1992).

Pelgrom et al. (1995) verificaram uma diminuição no pH sangüíneo de tilápia mossâmbica exposta a concentração de cobre de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, caracterizando distúrbio da regulação ácido-base. Muitos animais expostos à hipóxia por longos períodos podem inibir a via glicolítica para prevenir acidose metabólica (Sidell, 1983) pois, a diminuição do pH do sangue pode prejudicar processos fisiológicos e causar danos severos às células (Wood, 1991). Affonso et al. (2002) verificaram que a exposição à hipóxia causou diminuição significativa do pH sangüíneo em tambaqui.

c. Metalotioninas

As metalotioninas (MTs) são proteínas não enzimáticas, de baixo peso molecular e alta concentração de cisteínas. Os grupos tiol (-SH) dos resíduos de cisteína permitem às MTs se ligarem a metais da família I B e II B da Tabela periódica (Kägi e Nordberg, 1979). Devido a

esta capacidade de ligação com metais essenciais, como o Cu e o Zn, as MTs são citadas no controle homeostático da disponibilidade destes metais nos sistemas biológicos (Hamer, 1986), caracterizando-as por agir como reserva disponível para satisfazer demandas enzimáticas e metabólicas destes metais (Brouwer et al., 1989; Viarengo e Nott, 1993; Roesijadi, 1996). Diversos autores acreditam que a indução das MTs contribui para aumentar a tolerância à exposição de metais (Roesijadi et al., 1982; Geroge e Olosson, 1994; Pavicic et al., 1994; Schlenk et al., 1999; Cajaraville et al., 2000; Linde et al., 2001). Desde a descoberta e caracterização de MTs por Margoshes e Vallee (1957), houve propostas de implicação destas proteínas nos processos de destoxificação por metais pesados, por não exercerem sua ação tóxica quando ligados a elas. Ferreira et al. (2008) apontaram que os efeitos antagônicos encontrados após a exposição a concentrações de cádmio e carbendazim se devem à redução na toxicidade do cádmio causada pela indução na concentração da MT. A MT é induzida por metais pesados (Sato et al., 1996) e também por diferentes químicos e estressores e particularmente por pró-oxidantes (Viarengo et al., 1999).

A indução da síntese de MT já foi descrita em diversos grupos animais (anelídeos, moluscos, crustáceos e peixes) em resposta à contaminação por metais como a Ag, Cd, Cu e Hg, sugerindo o uso potencial da concentração de MT como biomarcador (Amiard et al., 2006). A MT é parte do conjunto de biomarcadores reconhecidos no continente europeu, sendo avaliada em programas de monitoramento ambiental (BEQUALM) (Mathiessen, 2000). É parte também dos biomarcadores selecionados para monitorar ambientes marinhos no plano de ações da Organização das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP/RAMOGGE, 1999).

Por possuir características altamente conservativas e por ser praticamente onipresente, as MTs possuem papel essencial nos processos vitais (Amiard et al., 2006). Mason e Jenkins (1995) propuseram duas funções para as MTs. Primeiramente, estas proteínas constituem reservas não tóxicas disponíveis para a síntese de metaloenzimas (Brouwer et al., 1989; Viarengo e Nott, 1993; Roesijadi, 1996). Segundo Roesijadi et al. (1992), as MTs podem reduzir a ligação de metais nos sítios de ligação, diminuindo assim seu potencial tóxico. As MTs parecem ter outras funções importantes, incluindo a proteção contra radiação ionizante (Cai et al., 1999) e prevenção do estresse oxidativo (Cavaletto et al., 2002; Correia et al., 2002). Organismos pré-expostos a metais, como o Cd, resistiram ao estresse oxidativo aumentando a concentração de MTs parecendo limitar os efeitos do $\bullet\text{OH}$ e $\text{O}_2\bullet$ por reagirem com eles. A atuação das MTs como parte do sistema de defesas antioxidantes ainda está em discussão. Amiard et al. (2006) fizeram uma revisão dos conceitos atuais do papel da MT em organismos invertebrados e sua

utilização como biomarcadores. Parece que a ligação do cobre com o grupamento sulfridrila da MT é uma das mais estáveis dentre os demais metais, resistindo à degradação e diminuindo a disponibilidade destes ao se ligarem à MT (Bremmer, 1991; Amiard et al., 2006). Assim, as formas de atuação como antioxidante pode ser por indisponibilizar o cobre para gerar EROs ou pela própria ação redox dos resíduos de cisteína (English e Storey, 2003).

Compostos oxidantes promovem a ativação de genes para a metalotionina (MT), o que implica no envolvimento das MTs nos sistemas de defesa antioxidante celular (English e Storey, 2003). Porém, alguns autores afirmam que os resultados de pesquisas sobre as propriedades antioxidantes das MTs ainda são contraditórios. As funções biológicas das MTs envolvem a destoxificação de metais e sua homeostase; por isso a MT é uma proteína importante para o metabolismo intracelular do cobre, na proteção contra danos oxidativos e toxicidade resultante da exposição excessiva a estes metais (Muto et al., 1999). A MT apresenta ainda importante papel como sequestradora de espécies de radicais livres, protegendo estruturas celulares contra o estresse oxidativo (Sato e Bremner, 1993). Por outro lado, Fabisiak et al. (1999) demonstraram que as ligações cobre-MT são sensíveis à oxidação pelo H_2O_2 e que a oxidação parece diminuir a habilidade da MT em sequestrar cobre. Desta forma, a liberação do cobre pode potencializar os danos celulares em situação de EO, demonstrando que os mecanismos fisiológicos podem potencialmente controlar a ligação e/ou liberação do cobre destas proteínas chave. A habilidade da MT em se ligar com o cobre e suprimir o cobre mediador de oxidações foi ótima em ambientes redutores e corresponde à capacidade máxima da MT em se ligar ao cobre (12 mol de Cu/1mol de MT). Em contraste, só uma fração destes sítios de ligação e desta capacidade de supressão foi observada quando a interação MT-Cu ocorreu em ambientes oxidados. Assim a proteção da MT por meio da ligação com o cobre é fortemente abalada na presença de H_2O_2 , disponibilizando o cobre para eventuais reações redox.

Foi constatado que aumentos na concentração de MT podem estar associados à diminuição da sensibilidade de um organismo ao excesso de metais (Roesijadi e Fellingham, 1987; Stuhlbacher et al., 1992; Pavicic et al., 1994). A indução da MT em peixes é influenciada por fatores naturais como: diferenças inter-específicas, idade, sexo, maturidade sexual, etc. (Duquesne, 1992). Alguns fatores não relacionados com a contaminação de metais também podem induzir à síntese de MTs, gerando falsas conclusões no uso deste biomarcador. Fatores como temperatura (Serafim et al., 2002), pH (Carvalho et al., 2004), salinidade (Leung et al., 2002), tamanho do organismo (Leung e Furness, 2001), estresse físico por captura, despesca e transporte, salinidade e estágio reprodutivo (Baer e Thomas, 1990), variações na concentração

de OD e congelamento (English e Storey, 2003), presença de antibióticos ou herbicidas (Mosleh et al., 2004) são os mecanismos descritos na literatura por estimularem aumentos na concentração de MTs nos peixes. Entretanto, o nível de indução nestas condições é normalmente menor que o causado por metais (Kägi, 1993). Este fator é importante, pois, a relevância do uso da MT como biomarcador depende das condições naturais do ambiente e não somente da concentração do metal no meio de exposição (Amiard et al., 2006). English e Storey (2003) afirmam que as funções das MTs variam de forma espécie-específica e estresse-específica.

A MT tem sido identificada em vários órgãos de peixes expostos a metais (Olsvik et al., 2000; Bragigand e Berthet, 2003) sendo o fígado o órgão no qual tem sido encontrada em concentrações mais altas (Olsvik et al., 2000). Os tecidos normalmente envolvidos com a absorção, estoque e excreção de metais, têm alta capacidade de sintetizar MTs. Nos organismos aquáticos estas proteínas foram identificadas nas glândulas digestórias (Viarengo et al., 1984) e brânquias (Viarengo et al., 1980; Roesijadi e Klerks, 1989; Mouneyrac et al., 1998). As brânquias dos peixes são órgãos multifuncionais onde ocorrem os transportes de íons, trocas gasosas, regulação ácido-base e excreções (Wendelaar Bonga et al., 1990). É o primeiro local de ação tóxica de exposição ao cobre onde ocorrerá acúmulo deste metal em peixes podendo, eventualmente, levar a danos e disfunções ao órgão (Mallatt, 1985; Pelgrom et al., 1995). Os danos branquiais podem ser prevenidos ou contrabalançados pelo aumento na síntese de MTs (Dang et al., 1999).

d. Enzima Na^+/K^+ -ATPase

Nos peixes teleósteos, os mecanismos de regulação ácido-base são aperfeiçoados pela dinâmica modulação das proteínas transportadoras de íons nas brânquias e rins (Heisler, 1989; Clairbone et al., 2002). As brânquias dos peixes de água doce possuem mecanismos para o transporte ativo de Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} e K^+ (Eddy, 1985). Estes mecanismos são afetados pela ação de metais, destacando-se como marcadores de mecanismos de intoxicação (McDonald et al., 1989). Efeitos potenciais dos metais na fisiologia dos peixes podem estar associados a: 1. interrupção de um ou mais mecanismos de transporte, ampliando ou bloqueando as vias de difusão; 2. interferindo nos sítios de ligação do Ca^{2+} na superfície, com concomitante efeito na estabilidade da membrana (McDonald et al., 1989). As células cloreto, células de transporte de íons do tecido branquial dos peixes teleósteos, que atuam no equilíbrio osmótico e

hidroeletrolítico, são ricas em mitocôndria e extensos sistemas de membranas tubulares, contendo grande quantidade de enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$. Esta enzima pertence ao grupo das ATPases e utiliza energia para o transporte iônico, mantendo o gradiente celular de Na^+ e K^+ . Sua atividade possui papel crucial no transporte de íons no epitélio branquial (McCormick, 1995; Flik et al., 1996).

Existem relatos que evidenciam os efeitos de metais no mecanismo de osmorregulação. Em truta arco-íris, o cobre induziu distúrbios osmorregulatórios pela diminuição da captação ativa de íons, devido à inibição direta da atividade de enzimas específicas para o transporte iônico, tal como a $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ (Li et al., 1998; DeBoeck et al., 2000). Lorz e McPherson (1976) observaram inibição da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ branquial em salmão “coho”, *Oncorhynchus kisutch*, expostos a concentrações de cobre de 5 a 30 ppb. Ay et al. (1995) expuseram a tilápia “redbelly”, *Tilapia zillii*, a concentrações de 0,5; 1,2 e 4,0 mg.L^{-1} de CuSO_4 (14 dias) e encontraram correlação negativa ($r = - 0.756$) entre os níveis de cobre aquático e a atividade branquial da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$. Dang (2000) observaram que a tilápia mossâmbica exposta por quatro semanas à água ácida ou cobre aquático aumentou a densidade de células cloreto mas diminuiu a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ branquial. Wendelaar Bonga et al. (1990) e Li et al. (1998) caracterizaram previamente esta alteração afirmando que o aumento de células cloreto em condições de estresse ocorre com liberação de células imaturas com baixas concentrações da enzima. O cobre diretamente induz necrose e indiretamente, via cortisol, induz apoptose das células cloreto na brânquia de tilápias (Li et al., 1998). Dang (2000) descreveram que em tilápia mossâmbica houve aumento no número de células cloreto necróticas e apoptóticas e que estas continham menores concentrações de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$.

McGeer et al. (2000) observaram que a truta arco-íris, quando exposta cronicamente ao cobre (2 meses – 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$), apresentou aumento de 2,5 vezes na atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ branquial e caracterizou esta resposta como tentativa de restabelecer o transporte iônico branquial perdido durante a longa exposição ao metal. Monteiro et al. (2005) observaram que o acúmulo de cobre nas brânquias inibiu a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ branquial em tilápia do Nilo exposta às concentrações de cobre de 0,04 e 0,40 mg.L^{-1} . Esta inibição ocorreu com três dias de exposição e permaneceu até 21 dias, confirmando a ausência de processo compensatório no tecido branquial. Houve diferença entre a exposição aos níveis de cobre avaliados, com valor menor para o grupo exposto à concentração de 0,4 mg.L^{-1} . Pelgrom et al. (1995) expuseram a tilápia mossâmbica a concentrações de cobre de 0,05; 0,10 e 0,20 mg.L^{-1} ,

por seis dias, resultando em aumento significativo da concentração de cobre nas brânquias e no plasma de forma mais proeminente nos peixes expostos a 0,20 mg.L⁻¹.

Pesquisas demonstraram que “fathead minnows”, *Pimephales promelas*, diminuiu a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase em resposta à exposição ao cobre (0,15 mg.L⁻¹) em 24 horas de exposição (Kolok et al., 2002). Entretanto, esta resposta pode ter resultado de danos causados nas brânquias e em algumas espécies pode ser reflexo dos mecanismos de defesa que resultariam na diminuição da taxa metabólica em um período de 24 h. DeBoeck et al. (2007) relataram diminuição da Na⁺/K⁺-ATPase em carpa comum e carpa “gibel”, *Carassius auratus gibelio*, em poucas horas de exposição a níveis sub-letais de cobre. Por não terem sido observados danos branquiais nestes peixes, os autores sugerem que esta diminuição pode permitir ao peixe sobreviver à fase de “choque inicial” de exposição ao cobre, através da redução do fluxo de água e da absorção branquial de cobre. Neste cenário, a redução da taxa metabólica pode ser resultado tanto da redução de necessidade energética (diminuindo a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase) como da redução da absorção de oxigênio. Pistole et al. (2008) descreveram que aumentos no metabolismo decorrentes da exposição ao cobre por períodos maiores (96 h) ocorreram também nesta fase “choque inicial”, sugerindo que este incremento no metabolismo é decorrente de respostas celulares e mecanismos de compensação resultantes do início da exposição. Estes mecanismos incluem a produção de MTs (Kil et al., 2006; Wu et al., 2006), assim como, aumentos compensatórios na atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (Leena e Oommen, 2000; DeBoeck et al., 2007).

A Na⁺/K⁺-ATPase em mamíferos diminuiu consideravelmente em condições de hipóxia em estudos de Thevenod e Friedmann (1999) e Comellas et al. (2007). Comellas et al. (2007) avaliaram que a possível relação entre exposição à hipóxia e inibição desta enzima está correlacionada a um mecanismo sinalizador onde os EROs gerados no EO agem modulando ajustes metabólicos do consumo energético, diminuindo a produção de ATP. Este mesmo autor relata ainda haver relação entre os níveis de GHS-Px e SOD na prevenção da inibição da Na⁺/K⁺-ATPase, sugerindo que a exposição celular a concentrações destas enzimas foram efetivas em prevenir os danos decorrentes da exposição à hipóxia na atividade da Na⁺/K⁺-ATPase. Por outro lado, Bogdanova et al. (2003a; 2003b) avaliaram hepatócitos de truta arco-íris e eritrócitos de camundongos e afirmam que a inibição da Na⁺/K⁺-ATPase não é decorrente da diminuição nos níveis celulares de ATP.

e. Parâmetros Hematológicos

A qualidade da água é considerada importante fator responsável por variações na hematologia, resultado da íntima associação entre o sistema circulatório e o ambiente externo (Cassilas e Smith, 1977). Nas últimas décadas, as variáveis hematológicas vêm sendo aplicadas no diagnóstico clínico de peixes, auxiliando a avaliação dos efeitos de xenobióticos e substâncias tóxicas (Wendelaar Bonga, 1997). Assim, a hematologia pode ser considerada como parâmetro essencial para o estado geral da saúde em diversas espécies de peixe (Nussey et al., 1995). Pesquisadores relatam o uso de parâmetros hematológicos como indicador de estresse (Cassilas e Smith, 1977; Tomasso et al., 1983) e de exposição a substâncias tóxicas (Van Vuren, 1986) como metais (Christensen et al., 1972; Cryiac et al., 1989; Van der Merwe, 1992; Wepner et al., 1992).

Autores descrevem hipersecreção de muco nas brânquias de peixes expostos a metais. Este sistema de defesa busca diminuir a quelação e difusão dos metais do meio externo para a corrente sangüínea mas, por outro lado, pode dificultar ou impedir as trocas gasosas levando o organismo a uma hipóxia tecidual (Lichtenfels et al., 1996). Para Nussey et al. (1995), durante a exposição ao cobre o peixe parece desenvolver déficit na captação de oxigênio, gerando situação semelhante à da hipóxia ambiental. Além da secreção de muco, a exposição ao cobre pode causar danos morfológicos (Mazon et al., 2002a) e espessamento do epitélio branquial, incluindo proliferação celular e hipertrofia (Mallat, 1985; Dang, 2000). Estas alterações reduzem consideravelmente a eficiência da superfície respiratória como trocadora de gases. Mudanças na morfologia branquial em decorrência da exposição a metais pode ser uma resposta compensatória para dificultar a entrada dos metais nas células deste tecido (Mallat, 1985; Dang, 2000). Como conseqüência, os parâmetros sangüíneos são alterados de forma a otimizar o transporte de oxigênio no sangue e sua liberação nos tecidos (Heath, 1995).

Dentre os efeitos biológicos do cobre, as mudanças hematológicas são evidentes, variando, em muitos estudos, o número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito. Algumas destas mudanças são transientes e outras acontecem por maiores períodos. As diferenças que ocorrem entre os experimentos podem muitas vezes ser devidas aos níveis de cobre estudados, espécie e qualidade da água, dificultando muitas vezes a compreensão destes valores e a comparação entre os estudos. Alguns autores caracterizam como resposta de exposição ao cobre a hemoconcentração, com aumento do hematócrito, hemoglobina e eritrócito (Nussey et al., 1995; Cerqueira e Fernandes, 2002; Menezes, 2005). De

acordo com O'Connor e Fromm (1975), os íons metálicos são conhecidos por estimular a eritropoiese.

Nussey et al. (1995) expuseram a tilápia mossâmbica a concentrações de cobre de 0,16 e 0,40 mg.L⁻¹ por 96 h e por quatro semanas. Foram observados aumentos nos eritrócitos e na hemoglobina na exposição a 0,16 mg.L⁻¹ por 96 h, sendo estas respostas atribuídas ao cobre por estimular a eritropoiese e por meio do aumento da hemoglobina elevar a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos (Cyriac et al., 1989). Por outro lado, na exposição a 0,40 mg.L⁻¹, por 96 h, houve diminuição de eritrócitos indicando inibição na produção de células vermelhas. A destruição destas células ocorre em consequência da hemólise dos eritrócitos decorrentes da debilidade dos mecanismos de osmorregulação e dos danos branquiais (McLeay, 1973; Wedemeyer e Yasutake, 1977; Larsson et al., 1985). Estes achados também foram descritos por Strivastava e Narain (1985) em “stinging catfish” *Heteropneustes fossilis* submetidos ao estresse e por Van der Merwe (1992) no bagre africano, *Clarias gariepinus*, após exposição ao cobre. O acúmulo de cobre nas brânquias, fígado e rins causou hemorragia interna resultando na diminuição dos eritrócitos (Raj-Banshi e Gupta, 1986; Van der Merwe, 1992; Nussey, 1994).

Nussey et al. (1995) acreditam que, como resultado do aumento da respiração anaeróbica em decorrência da exposição ao cobre, os peixes aumentam a concentração de CO₂ no sangue, elevando a produção de ácido láctico como efeito tampão a esta elevação, diminuindo, portanto, o pH sangüíneo. Este aumento da acidez causa inchaço nas células vermelhas, gerando aumento do volume corpuscular médio (VCM) (Soivio et al., 1974). O VCM caracteriza o tamanho e condição dos eritrócitos, refletindo divisões celulares normais ou anormais durante a eritropoiese. Diminuições no VCM indicam que houve aumento de eritrócitos imaturos liberados dos tecidos eritropoiéticos (Larsson et al., 1985). Aumentos deste parâmetro, por outro lado, indicam que os eritrócitos sofreram turgescência devido à hipoxemia ou estresse osmótico como observado por Nussey et al. (1995) em tilápia mossâmbica em resposta à concentração de cobre de 0,40 mg.L⁻¹ (96 h). Irregularidades no tamanho celular têm sido correlacionadas a hemodiluição, alterações peroxidativas da membrana e distúrbios osmorregulatórios causados por metais pesados (Roncero et al., 1992).

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) é a taxa de concentração de hemoglobina (Hb) em relação ao hematócrito e não é influenciada pelo VCM ou pelo número de eritrócitos (Eri). No entanto, este parâmetro pode ser interpretado de maneira incorreta, quando há, por exemplo, a liberação na corrente sangüínea de células vermelhas imaturas, com menor VCM e diferente concentração de Hb (Soivio e Nikimaa, 1981).

Tavares-Dias et al. (2002) avaliaram os efeitos do cobre em pacu, aplicando duas doses de CuSO_4 nas concentrações de 0,50 e 1,00 mg.L^{-1} , com intervalo de dois dias entre cada aplicação. No primeiro dia após a segunda aplicação, nas duas concentrações de cobre avaliadas, houve redução do número de eritrócitos, da taxa de hemoglobina e do CHCM e aumento do VCM. Houve diminuição de hemoglobina na exposição a 0,50 mg.L^{-1} e aumento na glicemia na exposição a 1,00 mg.L^{-1} . A exposição a 1,00 mg.L^{-1} causou diminuição do VCM após 15 dias de exposição. Singh e Reddy (1990) avaliaram que em bagre indiano, *Heteropneustes fossilis*, o tratamento com cobre provocou hiperglicemia, redução de Eri e Hb até 30 dias após o tratamento. Similarmente, Singh (1995) observou decréscimo de Eri, Hb, Htc e CHCM e aumento do VCM em “murrel” de água doce, *Channa punctatus*.

A exposição ao cobre e ao pH ácido causa alterações hematológicas em peixes (Heath, 1995; Wood, 1989; Wang et al., 1998; Cerqueira e Fernandes, 2002). Muitas das mudanças nas células sanguíneas em baixo pH aquático são reflexos de distúrbios iônicos (Milligan e Wood, 1982; Wood, 2001). O estresse ácido é responsável por uma grande variedade de respostas hematológicas em peixes de água doce (McDonald et al., 1989), bem como, a exposição ao cobre (Nussey et al., 1995; Heath, 1995). O decréscimo do pH da água causa acidose sanguínea, em razão do aumento da pressão arterial de CO_2 . Esta acidose primeiramente diminui o oxigênio contido no sangue e, associado ao acréscimo nos níveis de catecolaminas circulantes, pode causar rápido aumento na taxa de ventilação branquial dos peixes. A elevação da hemoglobina, como também, do eritrócito, pode ser uma forma de compensar alguma deficiência que ocorra no processo de trocas gasosas no epitélio branquial. A elevação da concentração de Hb do tambaqui, observada por Menezes (2005) durante a exposição ao meio ácido, sugere um meio para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos.

Carvalho e Fernandes (2006) avaliaram a associação da exposição ao cobre, em pH 4,5 e pH 8,0; em temperatura 20 e 30°C, por 96 h no curimatá. Estes autores observaram interação entre cobre e pH somente em Hb e CHCM. As respostas hematológicas ao cobre em pH baixo e alto, a 20 e 30°C, indicaram distúrbios mais complexos que os decorrentes da exposição isolada ao meio ácido. Estes autores concluíram que as respostas à exposição ao cobre em diferentes pHs e temperaturas têm mostrado que a magnitude das respostas hematológicas parece depender das concentrações de cobre na água e a sensibilidade da espécie ao metal.

Barcarolli e Martinez (2003) avaliaram os efeitos da exposição do alumínio (15 $\mu\text{g.L}^{-1}$) em pH = 5,0 (24h e 96h) em piaussú, *Leporinus macrocephalus*, e observaram que os peixes expostos somente ao meio ácido não alteraram seus parâmetros hematológicos, iônicos e

metabólicos e concluíram que esta espécie é altamente tolerante à exposição ao meio ácido. Por outro lado, a exposição (24 h) à associação de meio ácido e Al³⁺ aumentou o Htc e a glicose, mas não modificou a Hb e a proteína plasmática (PP).

Muitos fatores interferem nas respostas hematológicas, dentre eles a hipóxia (Marcon e Wilhelm Filho, 1999; Affonso et al., 2002). Val e Almeida-Val (1995) compilaram trabalhos de diferentes autores e verificaram que, de modo geral, em condições de hipóxia foi observado aumento do hematócrito, da hemoglobina e do número de eritrócitos em diversas espécies de peixes amazônicos, tanto em condições ambientais como experimentais. Quando em condições de hipóxia, os peixes tendem a apresentar significativas mudanças adaptativas nas funções da hemoglobina (Wells, et al., 1989). Krogh e Leitch (1919) sugeriram que os peixes se adaptam à hipóxia por meio de aumentos na capacidade de transporte de oxigênio da hemoglobina e que normalmente animais nativos de ambientes hipóxicos apresentam altas concentrações de hemoglobina. Wells et al. (1989) expuseram o peixe antártico “borchs”, *Pagothenia borchgrevinki*, à hipóxia ambiental e observaram aumento do Htc, da Hb e do lactato.

Os peixes compensam a baixa tomada de oxigênio, na prevalência da condição hipóxica, com aumento no número de eritrócitos (Wepener et al., 1992). Este aumento é decorrente do estímulo adrenérgico nos tecidos hematopoiéticos, para contração esplênica e liberação dos eritrócitos armazenados para a circulação sanguínea (Nilsson e Grove, 1974). Moura et al. (1997) observaram aumento de eritrócitos circulantes resultantes da contração esplênica em tambaqui exposto à hipóxia. Affonso et al. (2002) estudando esta mesma espécie observaram, em resposta à hipóxia (12 h), aumento na hemoglobina, eritrócitos e MCHC, sugerindo aumento na capacidade do sangue em carrear oxigênio. De acordo com Weber e Jensen (1988) e Jensen et al. (1993), o aumento do hematócrito via liberação de eritrócitos presentes no baço muitas vezes, é decorrente de exposição aguda à hipóxia e o estímulo à eritropoiese ocorre em exposições crônicas. Mas indiferentes ao período de exposição, os eritrócitos liberados podem ser imaturos apresentando baixa concentração de Hb.

Aumentos no VCM têm sido associados com fatores como a hipóxia e estresse (Weber, 1982). A exposição à hipóxia aguda libera catecolaminas que interferem no equilíbrio osmótico das membranas eritrocitárias, causando inchaço nas células e aumento do VCM (Butler et al., 1978; Perry et al., 1989; Randall e Perry, 1992). As catecolaminas, por sua vez, elevam o volume dos eritrócitos assim como o pH intracelular, aumentando a afinidade da hemoglobina com o oxigênio (Spry e Wood, 1984).

Panepucci et al. (2001) avaliaram os efeitos da exposição do pacu à hipóxia por seis horas e não encontraram diferenças no hematócrito, na hemoglobina, e nos eritrócitos. Poucos estudos avaliaram os efeitos do cobre em meio hipóxico, dificultando a comparação dos parâmetros hematológicos nesta associação.

2.5 Considerações sobre a espécie a ser estudada

Os ecossistemas tropicais são susceptíveis à atividades humanas e à degradação ambiental. Entretanto, pouco tem sido feito para investigar o impacto de contaminantes nestes ambientes (Lacher e Goldstein, 1997) e muito poucas espécies de peixes tropicais têm sido utilizadas em estudos de toxicidade. O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Figura 3), peixe da família Characidae, é encontrado na América do Sul, com distribuição entre a região Amazônica e bacia Paraná-Paraguai (Severi, 1991). Na região central do Brasil, o pacu ocorre em locais pantanosos e planícies alagadas onde estão, freqüentemente, sujeitos à hipóxia temporária ou à anóxia (Rantin et al., 1998). Assim como outros serrasalmídeos, tais como o tambaqui, *Colossoma macropomum*, e a pirapitinga, *Piaractus brachypomum*, o pacu pode sobreviver em condições hipóxicas devido a padrões comportamentais e recursos anatômicos bem característicos, incluindo a formação do edema temporário no lábio inferior que facilita a respiração na superfície aquática (ASR). Este recurso favorece a captação da água mais oxigenada da camada superficial dirigindo-a para as brânquias para que ocorra a troca gasosa (Saint-Paul e Bernardino, 1988). De acordo com Rantin e Kalinin (1996) o pacu apresenta uma P_{cO_2} de 40 mmHg e respiração na superfície aquática (ASR) durante períodos de hipóxia severa (10 a 20 mmHg de O_2 dissolvido). A espécie, considerada uma boa oxirreguladora, aumenta a ventilação branquial em resposta a hipóxia, utilizando-se de um maior aumento no volume ventilatório do que na freqüência respiratória, o que é considerado um mecanismo de economia de energia metabólica por parte do aparato ventilatório quando em condições de hipóxia severa (Rantin et al., 1998). O pacu em testes de toxicidade mostrou-se tolerante à exposição ao cobre conforme os resultados da CL50 de 2,37 mg.L⁻¹ Cu²⁺ (J. Almeida, dados não publicados).

Em sistema intensivo de produção, o pacu alimentado com dietas formuladas apresenta boa conversão alimentar e atinge peso comercial em menos de um ano. Devido a estas características, o pacu tem sido intensivamente cultivado em diferentes regiões do Brasil (Borghetti e Canzi, 1993) e é uma das espécies de grande importância na aquicultura da América do Sul. O pacu é comumente encontrado em uma variedade de ambientes de água

doce, muitos deles submetidos a período de hipóxia aguda e moderada e baixo pH (Rantin et al., 1998). Esta espécie também é caracterizada, quando em sistema de cultivo, como susceptível à contaminação por íctio e helmintos como a monogenea (Tavares-Dias et al., 2001; Schalch e Moraes, 2005), sendo submetido a banhos terapêuticos de CuSO_4 , quando em sistema de cultivo.

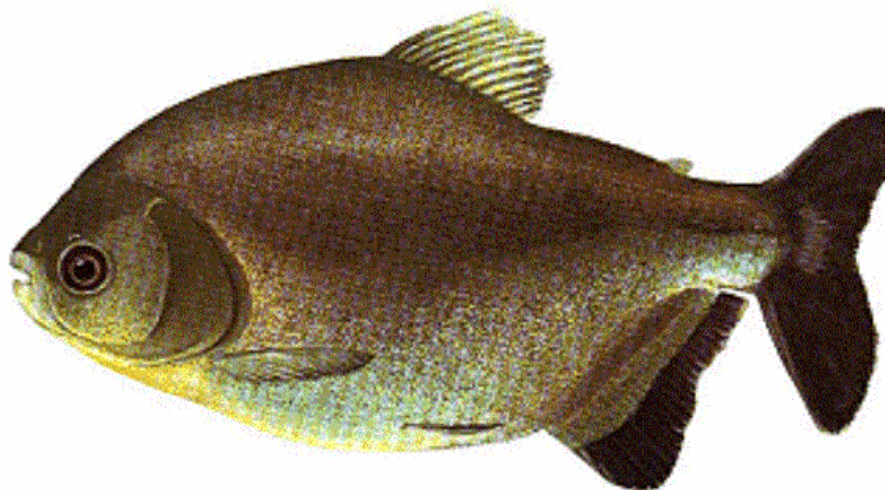


Figura 3: Exemplar de pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

3. JUSTIFICATIVA

No cultivo de peixes existem vários fatores que alteram a qualidade da água, como a presença excessiva de fitoplâncton, plantas aquáticas e algas, as quais causam redução da concentração de OD, aumento de CO_2 e conseqüentemente redução do pH. A grande quantidade de microalgas presente no meio consome oxigênio e libera dióxido de carbono, sendo que altas taxas de CO_2 acidificam a água, diminuindo o pH. Neste caso, a taxa de respiração muitas vezes excede a fotossíntese.

O limite superior estabelecido para o cobre, oxigênio dissolvido e pH pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2006) é 0.009 mg.L^{-1} de cobre, 5 mg.L^{-1} OD ($\cong 105 \text{ mmHg}$) e pH entre 6,0 e 9,0 (resolução vigente nº 020/1986) em ecossistemas aquáticos destinados para aquicultura (classe 2). De acordo com o relatório recente, publicado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, em muitos rios do estado de São Paulo, a concentração de cobre dissolvido excede o limite estabelecido, variando de 0.01 a 0.02 mg.L^{-1} de cobre. As variações de pH são menos corriqueiras mas as oscilações de OD são freqüentes (CETESB, 2007).

O uso de produtos com cobre no ambiente aquático é uma questão relevante na química ambiental. Produtos como o CuSO_4 , utilizados em diferentes concentrações na agricultura e aqüicultura, representam grande fonte de contaminação. Como descrito nesta revisão, as condições em que o CuSO_4 é aplicado na aqüicultura, geralmente, são caracterizadas por apresentarem baixa concentração de OD, pH ácido e excesso de CO_2 . Entretanto, a avaliação da toxicidade do cobre muitas vezes ocorre em condições controladas, o que poderá mascarar seus efeitos quando comparados às condições em que ele é utilizado.

A capacidade dos organismos para a biotransformação de substâncias exógenas é importante fator na determinação de efeitos de poluentes ambientais. Neste contexto, o estudo dos efeitos da exposição ao cobre em condições de hipóxia e meio ácido sobre biomarcadores em peixes pode, além de elucidar mecanismos de toxicidade do metal, indicar possíveis efeitos sobre o bem estar animal, levando ao uso racional deste composto em aqüicultura.

4. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos estudar a ação do cobre, do pH e do oxigênio dissolvido e possíveis interações na associação entre cobre e pH e entre cobre e oxigênio dissolvido nos biomarcadores oxidativos, metabólicos e hematológicos do pacu.

4.1 Os objetivos gerais foram testar as seguintes hipóteses:

Hipótese 1:

A exposição às concentrações de 0,4 e 2,0 mg de cobre alteram os biomarcadores oxidativos, metabólicos e hematológicos no pacu.

Hipótese 2:

A exposição ao meio ácido (pH = 5,0) altera os biomarcadores oxidativos, metabólicos e hematológicos do pacu.

Hipótese 3:

A exposição à hipóxia (50 mmHg) altera os biomarcadores oxidativos, metabólicos e hematológicos do pacu.

Hipótese 4:

Existe interação entre níveis de cobre aquático e pH (neutro e ácido) nos biomarcadores oxidativos, metabólicos e hematológicos do pacu. A associação de cobre e pH ácido modifica o comportamento destes biomarcadores.

Hipótese 5:

Existe interação entre níveis de cobre aquático e oxigênio dissolvido (normóxia e hipóxia) nos biomarcadores oxidativos, metabólicos e hematológicos do pacu. A associação de cobre e hipóxia modifica o comportamento destes biomarcadores.

4.2 Objetivos Específicos

As avaliações das hipóteses propostas foram realizadas por meio da determinação de parâmetros bioquímicos. Uma vez que exposições ao cobre, ao pH ácido e à hipóxia exigem respostas integradas que envolvem mecanismos regulatórios, foram investigados os efeitos da exposição às diferentes condições experimentais no:

- a) metabolismo oxidativo, avaliando a concentração de hidróperóxido de lipídeos e as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px no fígado, músculo vermelho e músculo branco;
- b) metabolismo intermediário, determinando as concentrações plasmáticas de glicose, lactato, piruvato, amônia, proteína e pH;
- c) dados bioquímicos da função branquial avaliando a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e concentração de metalotionina;
- d) respostas hematológicas, mensurando os parâmetros hematológicos e índices hematimétricos;
- e) absorção de cobre, avaliando a concentração de cobre no plasma.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Peixes

Exemplares juvenis do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, foram adquiridos da Aquicultura Aquapeixe (Conchal, SP, Brasil) e foram mantidos por dois meses em tanques (1000 L) equipados com sistema de recirculação e aeração mantendo o ambiente normóxico e temperatura constante ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 12-h luz: 12-h escuro, e pH ($7,2 \pm 0,06$). Os

peixes foram alimentados *ad libitum* diariamente com ração comercial peletizada. A alimentação foi suspensa 48 h antes do início do período experimental.

5.2. Exposição ao cobre, à hipóxia, ao meio ácido, isolados ou associados

Para determinar os efeitos do aumento das concentrações de cobre aquático, da exposição à hipóxia, ao meio ácido e das associações destes nos biomarcadores, grupos de peixe ($n = 10$; peso = $43,4 \pm 3,35$ g) foram randomicamente distribuídos em aquários experimentais (180 L; sistema estático, 2 aquários por grupo). Os peixes foram expostos ao aumento de cobre aquático isolado e associados a condições de meio ácido ou hipóxia, por 48 h perfazendo os seguintes grupos experimentais.

- **0Cu** = pH neutro e normóxico, sem adição de cobre (controle)
- **0.4Cu** = pH neutro e normóxico, com adição de 0.4 mg.L^{-1} de cobre
- **2.0Cu** = pH neutro e normóxico, com adição de 2.0 mg.L^{-1} de cobre
- **0Cu_{pH}** = meio ácido (pH = 5.0), sem adição de cobre
- **0.4Cu_{pH}** = meio ácido (pH = 5.0), com adição de 0.4 mg.L^{-1} de cobre
- **2.0Cu_{pH}** = meio ácido (pH = 5.0), com adição de 2.0 mg.L^{-1} de cobre
- **0Cu_{Hpx}** = hipóxia (50mmHg), sem adição de cobre
- **0.4Cu_{Hpx}** = hipóxia (50mmHg), com adição de cobre 0.4 mg.L^{-1} de cobre
- **2.0Cu_{Hpx}** = hipóxia (50mmHg), com adição de cobre 2.0 mg.L^{-1} de cobre

5.3 Cobre aquático

A fonte de cobre utilizada foi o sulfato de cobre pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Labsynth Ltd.). Uma solução-estoque foi preparada pela diluição de 5,0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1 L de água destilada e utilizada para obter as soluções-teste através da dissolução destas na água dos aquários experimentais nas concentrações desejadas. A concentração de cobre na água foi medida ao início das exposições e após 48 h em todos os aquários experimentais. As concentrações de cobre na água foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (AA 6800) no CEAQUIM – Departamento de Química e Bioquímica do IB/UNESP - Botucatu.

5.4 Características do meio aquático

Os níveis de pH dos aquários do “sistema ácido” foram gradualmente diminuídos de neutro a ácido. Estes níveis foram alcançados utilizando-se H_2SO_4 puro e/ou NaOH com ajustes, quando necessário. Os níveis de pH do “sistema ácido” se mantiveram próximos de 5.04 ± 0.04 e no “sistema neutro” próximo a $7,20 \pm 0,06$. Os dois sistemas foram monitorados continuamente durante o teste de toxicidade com um microeletrodo de pH (Quimis Scientific Apparatus, Mod. 400A).

Os níveis de OD dos aquários do “sistema hipóxico” foram gradualmente diminuídos de normóxia para hipóxia. Os níveis de OD foram alcançados borbulhando mistura N_2 na água, diminuindo para $49 \pm 1,29$ mmHg e se mantiveram nestes valores. Nos “sistemas normóxicos”, os níveis de O_2 se mantiveram em $132 \pm 5,74$ mmHg durante o período experimental. A pressão parcial de O_2 em ambos os sistemas foi monitorada constantemente por eletrodo de O_2 FAC 001 conectado ao analisador de O_2 FAC 204A (FAC Electronics, São Carlos, SP, Brasil).

Os parâmetros de qualidade da água nos aquários foram mensurados em 0 e 48 h do período experimental (**Tabela 1**).

5.5 Obtenção dos tecidos e determinações dos parâmetros

Ao término do período experimental, os peixes foram coletados dos aquários e anestesiados com benzocaína a 0,01% (Synth). O sangue foi coletado por punção caudal com seringa heparizada (1 mL). Posteriormente, os animais foram sacrificados com secção medular. Os tecidos (fígado, Músculo vermelho, músculo branco e brânquias) foram coletados, lavados em solução salina (0,9% NaCl), secos em papel filtro, identificados, e posteriormente congelados em biofreezer (-80°C).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Spectronic Genesys 5. Quando as leituras foram realizadas em microplaca, o equipamento utilizado foi o leitor de microplaca Dynex MRXTC 250 (Dynex Technologies Inc., UK). As centrifugações foram realizadas em centrífuga refrigerada Hernle-Z323K.

a. Metabolismo oxidativo

Amostras individuais congeladas de fígado, músculo vermelho e músculo branco foram pesadas e homogeneizadas utilizando homogeneizador de tecido Turratec TE 102 (Tecnal, SP,

Brasil) a 18000 rpm, por 1 min e tampão gelado contendo 0,1 M fosfato de sódio tampão pH 7,4 em uma proporção de 1:10. O homogenado foi centrifugado a 12500 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado para os ensaios enzimáticos. Alíquotas de 10 µL das amostras foram tomadas para determinação da proteína total, de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976) adaptado por Kruger (1994) para leitor de microplaca, utilizando albumina sérica bovina como padrão, determinada a 595 nm.

Um ensaio da oxidação do ferro pelo alaranjado de xilenol (FOX) foi utilizado para determinar os hidroperóxidos de lipídeos, como proposto por Jiang et al. (1991). Foram tomados 100 µL de amostras de tecido (previamente desproteïnizados com TCA 10%), adicionados 900 µL de reagente de FOX contendo 250 µM de sulfato ferroso de amônia, 100 µM alaranjado de xilenol, 25 mM H₂SO₄, e 4 mM BHT em metanol 90 % (v/v). Os níveis de HP foram detectados espectrofotometricamente a 560 nm, e apresentados como nmol.g⁻¹ de tecido.

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi baseada na sua habilidade em inibir a redução do “nitro blue tetrazolium” (NBT) por radicais superóxido (Crouch et al., 1981), gerados por 37,5 mM de hidroxilamina em solução alcalina (Otero et al., 1983). O ensaio foi realizado em 0,5 M Na₂CO₃, pH 10,2, com 2 mM EDTA e 1,2 mM NBT. A reação do NBT foi determinada espectrofotometricamente a 560 nm. Um ensaio-controle com ausência de tecido foi realizado. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária para diminuir a taxa de 50% da inibição máxima. Os dados foram expressos em unidades de SOD.mg⁻¹ de proteína.

A atividade da GSH-Px (EC 1.11.1.9) foi determinada de acordo com o método descrito por Mills (1959) e modificado por Hafeman et al. (1974). Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C contendo 10 µL do homogenado de tecido, 150 µL de água destilada, 0,4 M de tampão fosfato de sódio, pH 7,0, EDTA 80 mM, GSH 2 mM, e NaN₃ 0,01 M. Após 5 min de incubação prévia a 37°C, 100 µL de H₂O₂ 0,4 mM foram adicionados. Após 3 min, alíquotas desta mistura foram retiradas e tratadas com solução de precipitação contendo ácido metafosfórico glacial. O GSH no filtrado livre de proteína foi determinado com um tampão fosfato de sódio 0,4 M e ácido 5,5'-ditio di-2- nitrobenzóico - DTNB) 1 mM em 1% de solução C₆H₅Na₃O₇.2H₂O. A redução do H₂O₂ pela GSH-Px diminuiu as concentrações de GSH. Esta concentração foi medida espectrofotometricamente a 412 nm. Uma unidade de atividade da GSH-Px foi definida como 1 µg de GSH.min⁻¹. A atividade da GSH-Px foi apresentada em nmol.mg de proteína⁻¹.

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada pela diminuição das concentrações de H₂O₂, em 15 seg, lendo a absorbância em 240 nm de acordo com Aebi (1974). O volume da reação foi de 1 mL contendo 500 µL da amostra de homogenado de tecido e 500µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 15 mM. O ensaio do controle foi realizado sem a adição de H₂O₂. Os dados foram expressos em nmol.mg de proteína⁻¹.

b. Parâmetros hematológicos

O sangue foi retirado por punção caudal com seringa heparinizada (1 mL). A proteína plasmática (PP) foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976) adaptado por Kruger (1994) para leitor de microplaca como descrito acima. Os valores foram expressos em mg de proteína.mL⁻¹ de plasma. A concentração plasmática de cobre, [Cu_p], foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica (standard methods AA 6800) e apresentada como µg.L⁻¹. O pH do sangue foi medido com microeletrodo de pH (Quimis Scientific Apparatus, Mod. 400A) imediatamente após a retirada do sangue.

O hematócrito (Htc) foi determinado pela técnica de centrifugação de microcapilares. A contagem de eritrócitos (Eri) foi determinada opticamente em câmara de Neubauer. A hemoglobina (Hb) foi determinada utilizando o reagente de Drabkin em absorbância de 540 nm. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados utilizando-se os valores de Htc, Hb e Eri.

c. Intermediários metabólicos no plasma

Para as determinações das concentrações plasmáticas de glicose, lactato, piruvato e amônia, o plasma foi inicialmente desproteínizado em 100 µL de plasma em 900 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 3 minutos a 4 T°C, utilizando-se o sobrenadante nas determinações.

a) As concentrações de glicose foram determinadas com base no método descrito por Dubois et al. (1956). Esta análise consistiu no emprego de 100 µL da amostra, adicionando água destilada até completar 500 µL, seguido da adição de 500 µL de fenol 4,1% e 2,0 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, rapidamente adicionado ao meio de reação. Os tubos de reação foram imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada em 480 nm. A concentração de glicose foi estimada contra um padrão de glicose e expressa em µmol de glicose.mL⁻¹ de plasma.

b) O lactato foi estimado segundo metodologia descrita por Harrower e Brown (1972) baseada na formação de um complexo entre lactato e sulfato de cobre (CuSO_4), sendo o lactato revelado pelo *p*-fenilfenol e H_2SO_4 . Para a determinação da concentração de lactato, 50 μL da amostra foram diluídos em água até completar 500 μL , em seguida foram adicionados 20 μL de CuSO_4 a 4 % e 3,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. A solução foi, então, fervida durante 5 minutos e após resfriamento foram adicionados 80 μL de solução de *p*-fenilfenol (1,5 g de *p*-fenilfenol em solução aquosa de NaOH, 2 %) lentamente adicionado e agitado em vórtex. Após uma hora em repouso, os tubos foram novamente fervidos por 90 segundos, imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada em 570 nm. A concentração de lactato foi estimada contra um padrão de lactato (Sigma) e foi expressa em μmol de lactato. mL^{-1} de plasma.

c) O piruvato foi estimado segundo método de Lu (1939) pela reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) em que 400 μL de amostra de plasma foram diluídos em água destilada até completar 500 μL seguidos da adição de 250 μL de DNPH (0,1% em HCl 2,0 N). Após 30 minutos de banho-maria à 37°C, foi adicionado à mistura de reação 3,0 mL de NaOH 1,3 N e a leitura óptica foi realizada em 440 nm. A concentração de piruvato foi determinada contra um padrão de piruvato de sódio (Sigma) e expressa em μmol de piruvato. mL^{-1} de plasma .

d) A concentração de amônia foi determinada segundo método de nesslerização, adaptado por Gentzkon e Masen (1942), que consiste em adicionar 500 μL do reagente de Nessler (Imbralab) aos tubos contendo 300 μL de amostra de plasma diluídas em água destilada até completar 2000 μL . Posteriormente, as amostras do ensaio permaneceram em repouso de 20 minutos. A leitura óptica foi realizada em 420 nm e a concentração estimada contra um padrão de cloreto de amônio (NH_4Cl), expressa em μmol . mL^{-1} de plasma.

d. Concentração de Metalotionina e atividade da Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias

A Metalotionina (MT) nas brânquias foi determinada pela concentração de grupamento SH de acordo com Viarengo et al. (1997), usando como padrão a glutathiona reduzida (GSH). Aproximadamente 200 mg de filamentos branquiais foram homogeneizados em 3 mL de tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,6), contendo sucrose 0,05 M e β -mercaptoethanol 2mM. O homogenado foi centrifugado a 30.000-g por 20 min a 4°C. O supernatante foi coletado e uma solução de clorofórmio/etanol foi utilizada para a fração-MT, parcialmente purificada. As amostras foram secas em *speed vac* por aproximadamente quatro a seis horas e ressuspensos em

solução de 0,25 M NaCl, HCl 1 N e 4mM EDTA. A concentração de MT foi quantificada, utilizando-se reagente de Ellman's contendo NaCl 2M, DTNB 0,43 em tampão fosfato 0,2 M (pH 8,0) e determinada espectrofotometricamente a 412 nm e apresentada como MT.g tecido⁻¹.

A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (EC 3.6.1.3) foi determinada como descrito por Quarbius et al. (1997) e previamente adaptada para a espécie. Em resumo, a atividade específica foi determinada pela diferença da hidrólise do ATP. As amostras de tecido foram previamente homogeneizadas em tampão SI (0,3 M sacarose, 30 mM imidazol) e centrifugadas a 4°C, 10 000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi pipetado em seis poços de uma microplaca e pipetado, em cada poço, 100 µL da mistura de reação contendo 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM imidazol, 3 mM Na²⁺ ATP (livre de vanadium), 70 µL β - mercaptoetanol, pH 7,6. Triplicatas de tecido contendo KCl (5 mM) e outras três contendo ouabaina (2,5 mM) foram incubadas a 25°C, por 30 min em ambiente escuro. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de solução TCA 8,6% (1:1) e reagente de cor contendo 0,66 mM H₂SO₄, 9,2 mM heptamolibidato de amônia e 0,33 mM FeSO₄.6 H₂O. A absorbância foi lida a 595nm em leitor de microplaca Dynex MRXTC 250 (Dynex Technologies Inc., UK). A quantidade de Pi foi estimada nos meios que continham KCl e nos meios que continham ouabaína e as diferenças entre estes meios indicam a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, sendo expressa em µM Pi.mg proteína⁻¹.h⁻¹.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para se verificar a curva de distribuição dos parâmetros avaliados, foi utilizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, seguindo os conceitos de tamanho amostral. Os resultados das variáveis avaliadas estão apresentados como média ± desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas com os softwares GraphPad InStat (versão 3.00, GraphPad Software), SigmaStat (versão 2.0, Jandel Corporation) e Minitab 15 (versão 15.1.30.0, Minitab Brasil).

Para avaliação dos efeitos simples dos fatores, foram realizadas análises de variância (Anova), aplicando os pós-testes de Dunnet (na avaliação dos níveis de cobre) ou teste t de Student (na avaliação da exposição ao meio ácido e à hipóxia) a fim de verificar em quais grupos as diferenças foram significativas para $p < 0,05$.

Para verificar as possíveis interações entre os fatores, foi realizada Anova em Modelo Linear Generalizado (GLM), para dados não balanceados. Quando diferenças entre os grupos experimentais foram verificadas ($p < 0,05$), utilizou-se o pós-teste de Tukey identificando as

diferenças entre os grupos experimentais. Para verificar o efeito da associação dos fatores, em relação ao grupo controle, aplicou-se o pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$).

7. RESULTADOS

7.1 Parâmetros aquáticos

Os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se dentro da normalidade para os protocolos experimentais (Tabela 1) e estão de acordo com os padrões de cultivo (Boyd, 1990) e com características determinadas nas águas estaduais da região de São Carlos, SP. Conforme descrito por Aragão et al. (2003), a maioria das águas interiores brasileiras é de baixa dureza (água mole), constatação esta que permite a realização de testes de toxicidade.

A concentração de cobre aquático ($\mu\text{g.L}^{-1}$) variou, em relação à concentração nominal, em cerca de 2% ao início e cerca de 48% ao final do período experimental. Esta diminuição também foi descrita por Dias (2003), que observou redução drástica nas concentrações de cobre dissolvido 24 horas após a aplicação de CuSO_4 , atingindo valores similares aos encontrados no início do experimento. Esta rápida diminuição pode ser decorrente da transferência do cátion para outros compartimentos do sistema, como o sedimento, e também, pelo baixo tempo de residência do CuSO_4 na coluna d'água (Button et al., 1977; Mastin e Rogers, 2000).

A Figura 4 apresenta a relação entre a concentração nominal e a concentração de cobre determinada na água ao início (0 h) do período experimental, mostrando correlação ($r^2 = 0,89$) entre a concentração de cobre na água nominal e determinada.

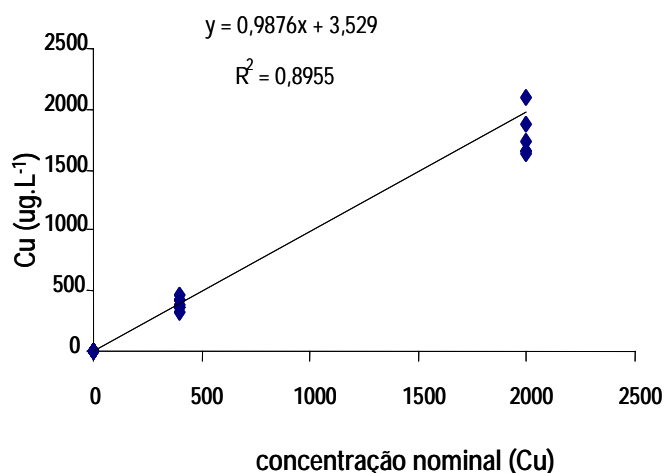


Figura 4. Concentração nominal versus concentração mensurada ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nos diferentes aquários experimentais, determinado ao início (0 h) do período experimental.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos de temperatura (°C), alcalinidade (CaCO₃; mg L⁻¹), dureza (CaCO₃; mg L⁻¹), concentração de Na⁺ (mEq L⁻¹), concentração de K⁺ (mEq L⁻¹), e de amônia (mg L⁻¹), da água dos aquários experimentais coletados ao início (0 h) e término do período experimental (48 h).

| grupos | horas | T (°C) | Alcalinidade CaCO ₃ (mg.L ⁻¹) | Dureza CaCO ₃ (mg.L ⁻¹) | Na ⁺ mEq.L ⁻¹ | K ⁺ mEq.L ⁻¹ | Amônia (mg.L ⁻¹) |
|----------------------|-------|--------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| controle | 0 | 22,0 | 9,5 | 35,0 | 1,6 | 3,4 | 0,018 |
| | 48 | 22,0 | 11,4 | 40,0 | 2,0 | 3,7 | 0,037 |
| 0.4Cu | 0 | 21,0 | 10,1 | 35,0 | 1,6 | 3,5 | 0,016 |
| | 48 | 21,1 | 11,1 | 34,0 | 1,8 | 3,8 | 0,037 |
| 2.0Cu | 0 | 21,6 | 9,0 | 39,0 | 1,6 | 3,7 | 0,020 |
| | 48 | 21,0 | 10,4 | 38,0 | 1,9 | 4,0 | 0,039 |
| 0Cu _{pH} | 0 | 21,9 | 9,8 | 36,0 | 1,6 | 3,8 | 0,018 |
| | 48 | 21,7 | 10,5 | 30,7 | 2,4 | 3,7 | 0,025 |
| 0.4Cu _{pH} | 0 | 21,0 | 10,4 | 36,0 | 1,7 | 3,5 | 0,020 |
| | 48 | 21,5 | 11,0 | 30,0 | 1,6 | 3,9 | 0,034 |
| 2.0Cu _{pH} | 0 | 21,6 | 9,0 | 40,0 | 1,6 | 3,7 | 0,015 |
| | 48 | 21,7 | 11,0 | 33,0 | 3,6 | 2,6 | 0,034 |
| 0Cu _{Hpx} | 0 | 22,1 | 9,8 | 38,3 | 1,6 | 3,7 | 0,020 |
| | 48 | 21,8 | 10,4 | 35,3 | 1,7 | 3,8 | 0,052 |
| 0.4Cu _{Hpx} | 0 | 21,0 | 10,1 | 35,0 | 1,6 | 3,5 | 0,015 |
| | 48 | 22,0 | 10,0 | 30,0 | 1,7 | 3,6 | 0,041 |
| 2.0Cu _{Hpx} | 0 | 21,8 | 9,0 | 38,0 | 1,6 | 3,7 | 0,011 |
| | 48 | 21,8 | 11,2 | 33,0 | 2,0 | 4,1 | 0,040 |

7.2 Observações comportamentais

A saúde geral dos peixes foi normal durante os experimentos, exceto para os peixes dos grupos expostos a 2.0mgCu, tanto nas formas de exposição isoladas e associadas do cobre com pH e hipóxia. Os peixes destes grupos estavam extremamente agitados, aumentando a natação nas primeiras 24 horas. Após este período apresentaram perda de equilíbrio, letargia e hipersecreção de muco.

As observações de hipersecreção de muco nas exposições à concentração de 2.0mgCu (2.0mg.L⁻¹ de cobre) estão de acordo com o constatado por outros pesquisadores. Estas mesmas respostas em exposição ao cobre foram avaliadas em *Prochilodus scrofa* (Mazon et al., 2002a; Takasusuki et al., 2004; Carvalho e Fernandes, 2006), em *Piaractus mesopotamicus* (Tavares-Dias et al., 2002) e em *Colossoma macropomum* (Menezes, 2005). A exposição aguda a metais ativa a hipersecreção de muco branquial, servindo como importante mecanismo de proteção contra a absorção dos metais (McDonald e Wood, 1993) por meio da quelação e inibição da difusão.

Houve diminuição da atividade natatória nos grupos experimentais expostos às concentrações de 2.0Cu, após 24 horas de exposição. Esta diminuição foi ainda mais acentuada nos grupos onde esta concentração foi associada à hipóxia (2.0CuHpx) e ao meio ácido (2.0CupH). Almeida-Val et al. (1993) caracterizaram a supressão metabólica via redução da atividade natatória como mecanismo de redução da demanda de oxigênio e ATP em condições de estresse. A truta marrom exposta a concentrações sub-letais de cobre e pH ácido, separados ou associados, também apresentou redução na habilidade natatória (Butler et al., 1992; Beaumont et al., 1995a).

Não houve mortalidade em nenhum dos grupos experimentais. O pacu se mostrou resistente à exposição a condições isoladas de cobre, de pH = 5,0, de hipóxia (50 mmHg) e da associação destas. A PO₂ experimental (50 mmHg) está acima da PcO₂ da espécie (40 mmHg; Rantin et al., 1998). Rantin e Kalinin (1996) observaram comportamento de respiração na superfície aquática (ASR) em pacus expostos à hipóxia aguda entre 20 a 10 mmHg. Este comportamento não foi observado nos peixes expostos aos níveis de cobre, ao meio ácido e à hipóxia, isolados ou associados, demonstrando que este mecanismo não foi acionado.

7.3 Avaliação dos efeitos simples dos fatores

7.3.1. Efeitos do incremento do cobre aquático em pH neutro e normóxia

a. Metabolismo oxidativo

Os parâmetros oxidativos avaliados no fígado dos peixes expostos ao incremento de cobre aquático estão apresentados na Figura 5. Os peixes expostos a 0.4Cu aumentaram em 12% a concentração de HP hepático, em relação ao grupo controle. Neste mesmo grupo de peixes, verificamos que houve aumento de 40% da atividade da SOD e diminuição de 30% da atividade da CAT. A exposição à condição de 2.0Cu, por outro lado, diminuiu a concentração de HP hepático em 20%. Verificando o comportamento da DAs neste mesmo grupo de peixes,

observou-se que houve um aumento de 37% na atividade da SOD e aumento de 30% na atividade da CAT. Os peixes expostos às diferentes concentrações de cobre não apresentaram diferenças na atividade hepática da GSH-Px.

No músculo vermelho, as respostas do metabolismo oxidativo decorrentes do incremento de cobre aquático mostraram que comparados ao grupo controle, os peixes expostos a 0.4Cu apresentaram valores semelhantes de HP e das atividades da SOD e GSH-Px com diminuição de 39% na atividade da CAT (Figura 6). A exposição a 2.0Cu, comparada aos peixes do grupo controle, resultou em diminuição de 20% na concentração de HP neste tecido. Os peixes expostos a este grupo apresentaram diminuição nas atividades da SOD e da CAT em 47% e 70%, respectivamente, mas mostraram um aumento de 155% na atividade da GSH-Px.

Os parâmetros do metabolismo oxidativo avaliados no músculo branco estão apresentados na Figura 7. Nos peixes expostos a 0.4Cu houve aumento de 90% na concentração de HP quando comparados aos peixes do grupo controle. Este mesmo grupo de animais apresentou uma diminuição nas atividades das enzimas SOD e CAT da ordem de 35 e 50%, respectivamente. Comparado ao grupo controle, os peixes do grupo 2.0Cu mostraram um aumento de 86% na concentração de HP e de 44% na atividade da SOD, sem diferenças nas atividades da GSH-Px e CAT. Os peixes expostos às diferentes concentrações de cobre não apresentaram diferenças na atividade da GSH-Px no músculo branco.

No intuito de se avaliar a relação existente entre as peroxidases GSH-Px e CAT foi feita a razão destas enzimas nas diferentes condições experimentais e nos diferentes tecidos (Tabela 2), utilizando-se a seguinte equação: $R_{px} = \text{GSH-Px} \div \text{CAT}$. Observou-se que os valores desta razão no fígado são menores que no músculo vermelho que, por sua vez, são menores que no músculo branco (fígado < músculo vermelho < músculo branco). As diferenças em decorrência das condições experimentais também são diferentes entre os tecidos. Os animais do grupo 0.4Cu, quando comparados aos do grupo controle, aumentaram esta razão em 20, 33 e 36% no fígado, músculo vermelho e músculo branco, respectivamente. Os peixes do grupo 2.0Cu diminuíram em 20% e 27% a R_{px} no fígado e músculo branco, respectivamente e aumentaram em 793% esta razão no músculo vermelho.

Tabela 2. Razão R_{px} (GSH-Px/CAT) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre, pH neutro e normóxia), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ cobre, pH neutro e normóxia), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, pH neutro e normóxia), por 48 horas.

| | fígado | m. vermelho | m. branco |
|----------|--------|-------------|-----------|
| controle | 10 | 70 | 529 |
| 0.4Cu | 12 | 93 | 720 |
| 2.0Cu | 8 | 625 | 384 |

Para melhor compreendermos as diferenças tecido-específicas no metabolismo oxidativo, relacionadas às condições experimentais, foi realizada a razão entre a concentração de HP e a ação das peroxidases, utilizando-se a seguinte equação: $R_{EO} = HP / (GSH-Px + CAT)$. Observamos que a R_{EO} (Tabela 3) foi fígado > músculo vermelho > músculo branco. Comparados aos peixes do grupo controle, os do grupo 0.4Cu aumentaram em 35, 20 e 167% a R_{EO} do fígado, músculo vermelho e músculo branco, respectivamente. Os do grupo 2.0Cu diminuíram em 30% e 37% a R_{EO} hepática e do músculo vermelho e aumentaram em 133% a R_{EO} do músculo branco.

Tabela 3. Razão R_{EO} (HP/(GSH-Px+CAT)) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre, pH neutro e normóxia), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ cobre, pH neutro e normóxia), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, pH neutro e normóxia), por 48 horas.

| | fígado | m. vermelho | m. branco |
|----------|--------|-------------|-----------|
| controle | 20 | 15 | 3 |
| 0.4Cu | 27 | 18 | 8 |
| 2.0Cu | 14 | 5 | 7 |

b. Intermediários metabólicos

A Tabela 4 apresenta os valores dos intermediários metabólicos plasmáticos de glicose, lactato, piruvato, amônia e proteína dos peixes expostos ao incremento de cobre em águas normóxicas e pH neutro. Avaliando-se os dados obtidos, observamos que não houve diferença em nenhum metabólito ao compararmos os peixes do grupo 0.4Cu aos do grupo controle. Os peixes do grupo 2.0Cu diferiram dos do grupo controle, com um aumento de 68% no piruvato.

Tabela 4. Concentrações plasmáticas de glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), amônia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) e proteína (mg.mL^{-1}) no pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao grupo 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L^{-1} de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L^{-1} de cobre); por 48 horas. Valores são média \pm DP.

| grupos | Glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Amônia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Proteína (mg.mL^{-1}) | n |
|----------|----------------------------------------|---|----------------------------------------|---|-----------------------------------------|---|---------------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| controle | 1,23 \pm 0,04 | 5 | 1,28 \pm 0,10 | 5 | 0,130 \pm 0,01 | 5 | 0,230 \pm 0,01 | 5 | 9,09 \pm 0,32 | 5 |
| 0.4Cu | 1,17 \pm 0,33 | 7 | 1,27 \pm 0,44 | 7 | 0,140 \pm 0,03 | 7 | 0,214 \pm 0,04 | 7 | 9,02 \pm 1,74 | 6 |
| 2.0Cu | 1,29 \pm 0,22 | 6 | 1,68 \pm 0,26 | 5 | 0,218 \pm 0,02* | 5 | 0,260 \pm 0,03 | 5 | 8,75 \pm 1,43 | 6 |

* diferente do controle (0Cu). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

c. Atividade da Na^+/K^+ -ATPase e concentração de Metalotionina branquial

A Figura 8 apresenta os valores de Na^+/K^+ -ATPase e metalotionina expostos às concentrações crescentes de cobre. Avaliando-se a atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial, observa-se que houve uma diminuição de 35 e 41% da atividade desta enzima nos peixes dos grupos 0.4Cu e 2.0Cu, respectivamente. Nestas mesmas condições, a MT branquial aumentou com o incremento de cobre na água, elevando sua concentração em 84 e 317% quando comparado os animais dos grupos 0.4Cu e 2.0Cu aos do grupo controle.

d. Concentração de cobre plasmático [Cu_p] e pH sanguíneo

A Figura 9 apresenta os resultados da [Cu_p] e do pH_{sg} . Os peixes do grupo 0.4Cu apresentaram valores de [Cu_p] superiores a 145%, quando comparados aos do grupo controle. Os peixes do grupo 2.0Cu apresentaram [Cu_p] semelhante ao do grupo controle. O pH_{sg} dos peixes do grupo 0.4Cu foi semelhante aos do grupo controle. Os peixes do grupo 2.0Cu apresentaram uma diminuição de 4% no pH_{sg} .

e. Parâmetros Hematológicos

A Tabela 5 apresenta os valores hematológicos de Eri, Htc, Hb, CHCM e VCM dos peixes expostos ao incremento de cobre em pH neutro e normóxia. Verificando-se estes dados observa-se que, comparado ao controle, os peixes do grupo 0.4Cu apresentaram um aumento de 30% no Eri, havendo semelhança nos demais parâmetros. Os peixes do grupo 2.0Cu aumentaram em 21% o Eri, em 47% a Hb e em 53% a CHCM e diminuíram em 23% o VCM em relação aos do grupo controle.

Tabela 5. Eri ($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$), Htc (%), Hb ($\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$), CHCM (%) e VCM (fL) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao grupo 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de cobre), 2.0Cu ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de cobre), por 48 horas. Valores são média \pm DP.

| grupos | Eri ($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) | n | Htc (%) | n | Hb ($\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$) | n | CHCM (%) | n | VCM (fL) | n |
|----------|-------------------------------------------------|----|------------------|----|-------------------------------------------|----|-------------------|----|---------------------|----|
| controle | 1,55 \pm 0,34 | 10 | 33,60 \pm 2,77 | 10 | 7,88 \pm 1,27 | 10 | 23,64 \pm 4,53 | 10 | 225,64 \pm 49,66 | 10 |
| 0.4Cu | 2,01 \pm 0,32* | 10 | 38,10 \pm 8,70 | 10 | 9,21 \pm 1,56 | 10 | 25,06 \pm 5,82 | 10 | 193,81 \pm 55,37 | 10 |
| 2.0Cu | 1,88 \pm 0,13* | 10 | 32,31 \pm 2,95 | 10 | 11,61 \pm 1,54* | 10 | 36,07 \pm 4,49* | 10 | 172,73 \pm 20,90* | 10 |

* diferente do controle (0Cu). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

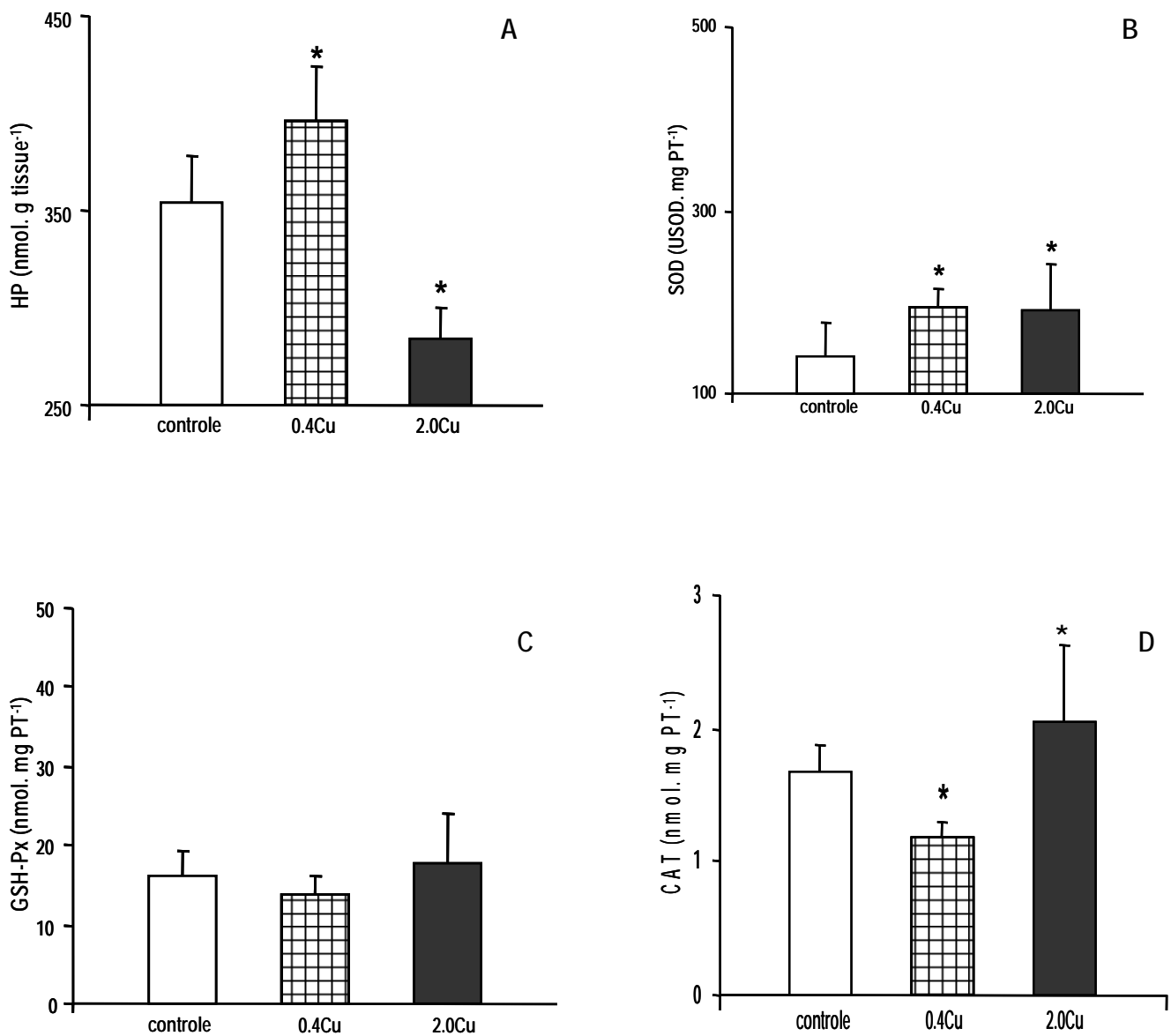


Figura 5. Concentração de HP (nmol.g tecido⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína⁻¹) (D) no fígado do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre); 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle ($p < 0,05$).

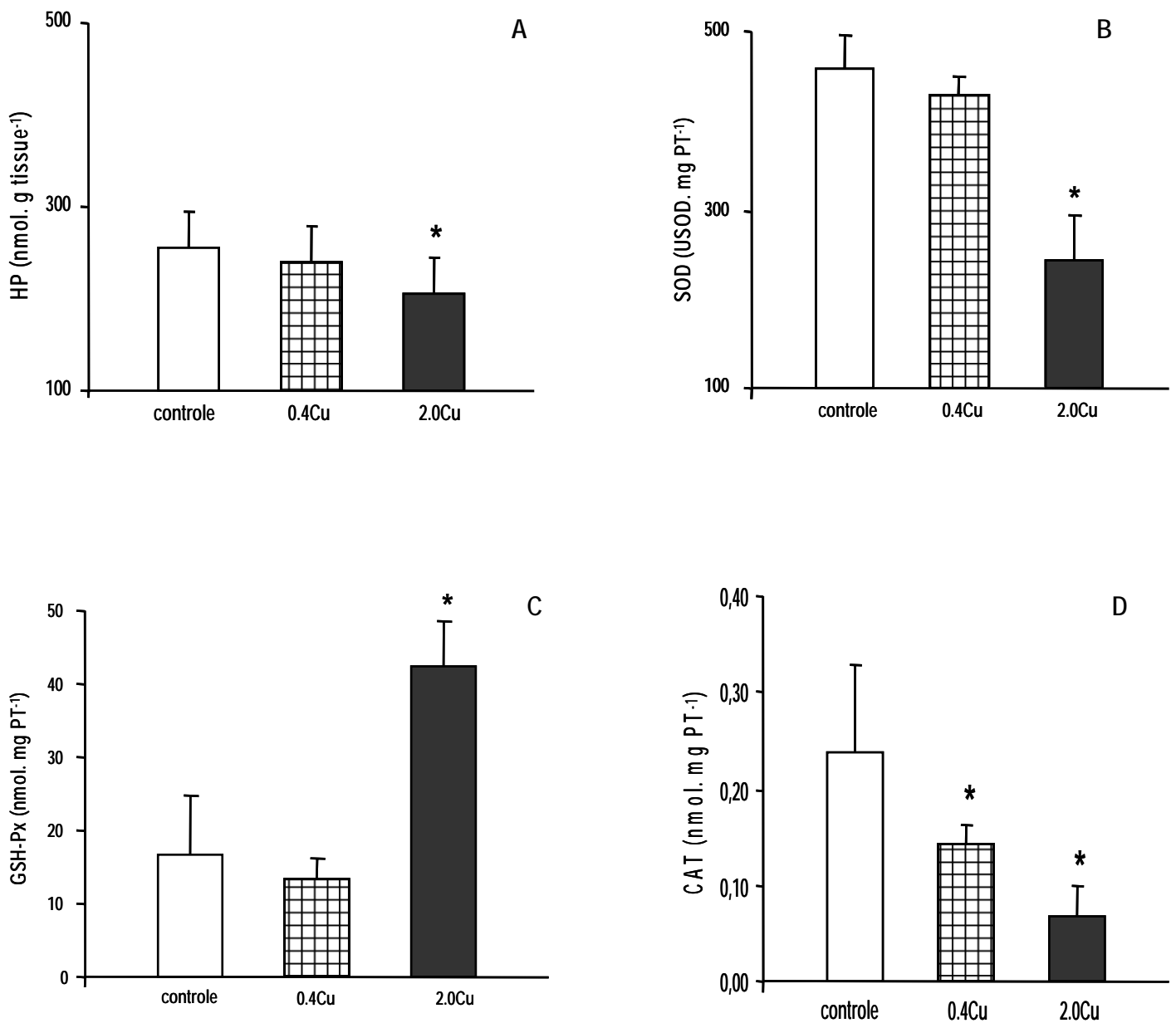


Figura 6. Concentração de HP (nmol.g tecido⁻¹) (**A**), SOD (USOD.mg proteína⁻¹) (**B**), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) (**C**) e CAT (UB.mg proteína⁻¹) (**D**) no músculo vermelho de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre); 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle ($p < 0,05$).

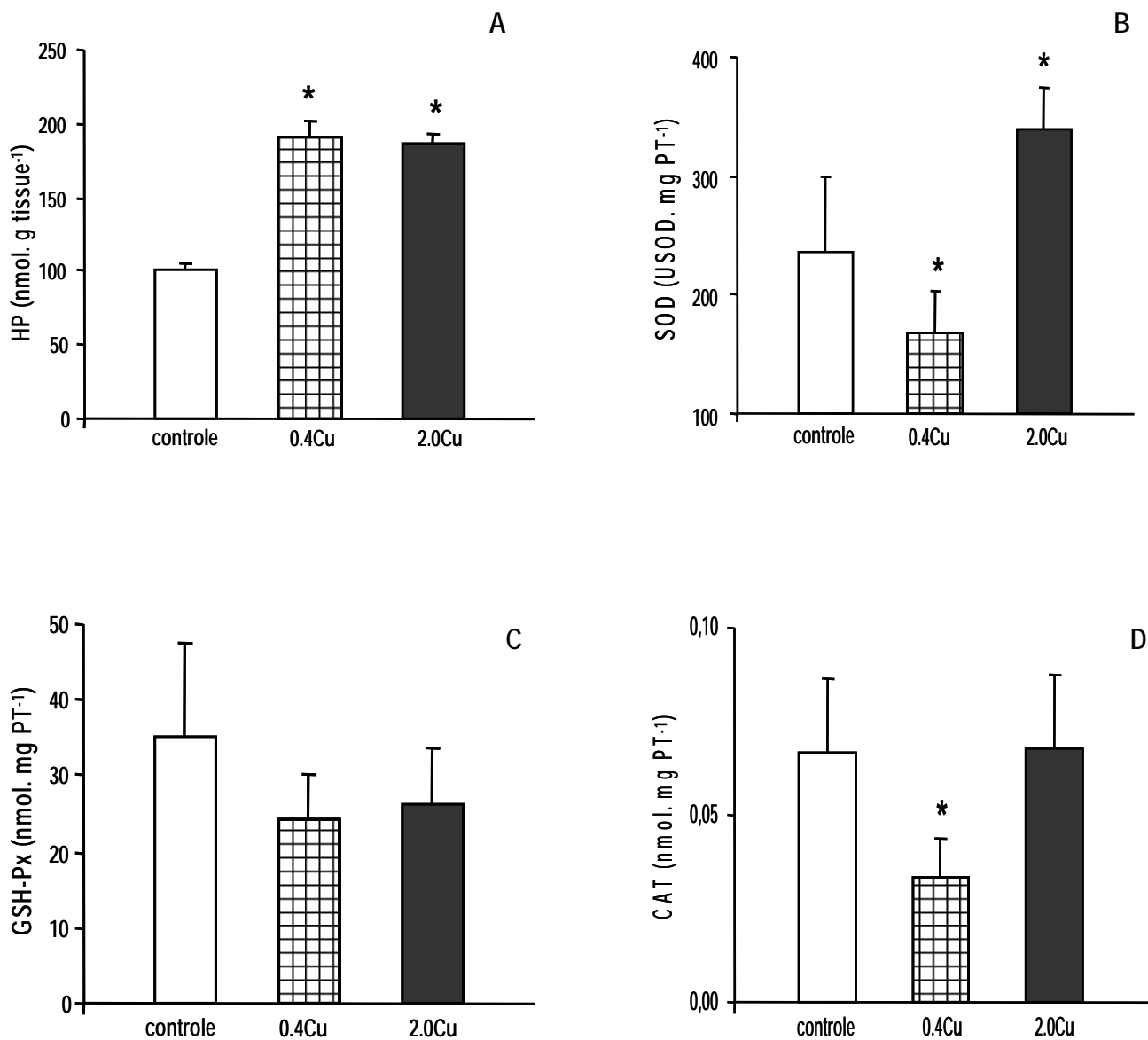


Figura 7. Concentração de HP (nmol.g tecido⁻¹) (**A**), SOD (USOD.mg proteína⁻¹) (**B**), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) (**C**) e CAT (UB.mg proteína⁻¹) (**D**) no músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre); 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle ($p < 0,05$).

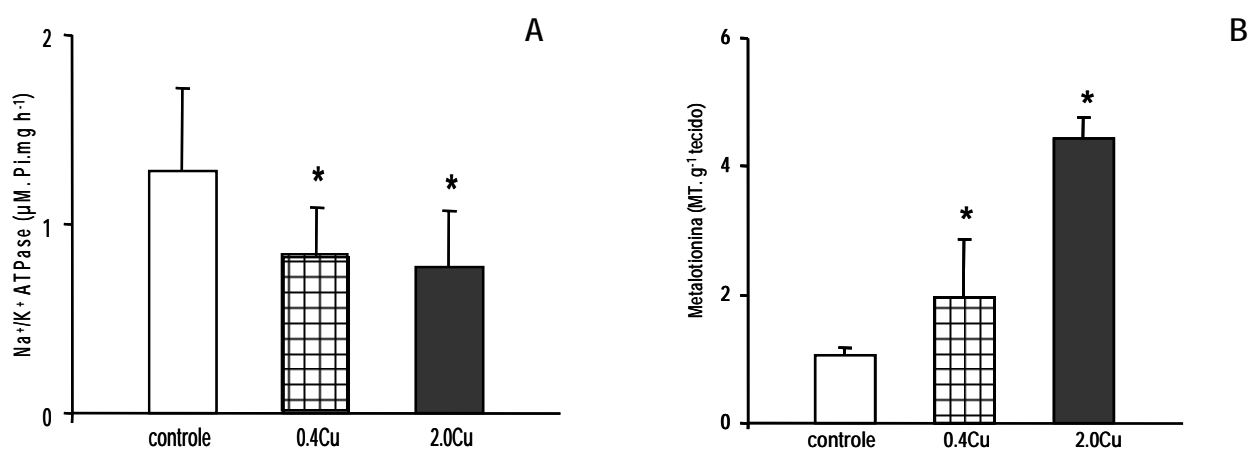


Figura 8. Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial (µM Pi.mg. h⁻¹) (A) e da concentração de Metalotionina branquial (MT.g⁻¹ tecido) (B) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao grupo controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle (p < 0,05).

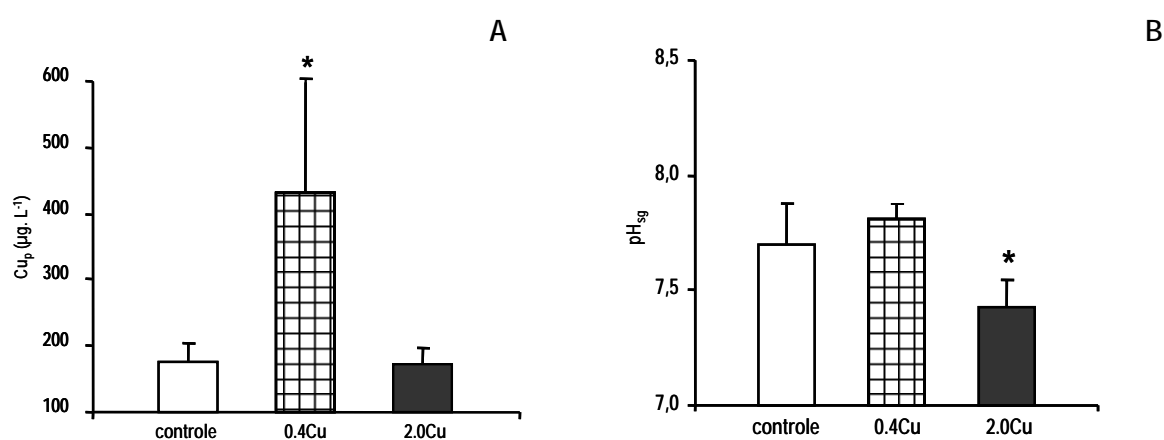


Figura 9. Concentração de cobre no plasma [Cu_p] (µg.L⁻¹) (A) e do pH do sangue (pH_{sg}) (B) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao grupo controle (sem adição de cobre), (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias dos grupos experimentais com as do grupo controle (p < 0,05).

7.3.2. Efeitos da exposição ao meio ácido

Para verificarmos os efeitos da exposição do pacu ao meio ácido, foram comparados os peixes do grupo experimental 0CupH aos do grupo controle. Avaliando o metabolismo oxidativo nesta condição, verificou-se que no fígado houve um aumento de 93% na atividade da SOD e uma diminuição de 27% na atividade da CAT (Figura 10). No músculo vermelho (Figura 11), a exposição do pacu ao meio ácido causou uma diminuição na concentração de HP e nas atividades da SOD e CAT em 17, 50 e 46%, respectivamente. No músculo branco (Figura 12), os peixes expostos ao meio ácido mostraram um aumento na concentração de HP (71%) e diminuição de 32% da atividade da CAT. Observou-se uma sensível diminuição da atividade da CAT nos três tecidos e semelhanças na atividade da GSH-Px frente a estas modificações de pH aquático.

No metabolismo intermediário (Figura 13), a exposição ao meio ácido causou uma diminuição das concentrações plasmáticas de glicose e lactato nas proporções de 28 e 33%, respectivamente. Houve um aumento de 66% na atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial e neste mesmo tecido não houve diferença na concentração branquial de MT nos peixes expostos ao pH ácido (Figura 14). Não houve diferença na $[\text{Cu}_p]$ quando o pacu foi exposto ao pH = 5,0, porém o pH_{sg} dos peixes expostos ao meio ácido diminuiu 2%, em relação aos peixes do grupo controle (Figura 15).

Os parâmetros hematológicos avaliados após a exposição ao meio ácido são apresentados na Figura 16. Os peixes do grupo 0CupH demonstraram aumento de 25% no Eri, de 24% na Hb e de 32% na CHCM. Por outro lado, houve diminuição de 26% no VCM, sem diferenças no Htc.

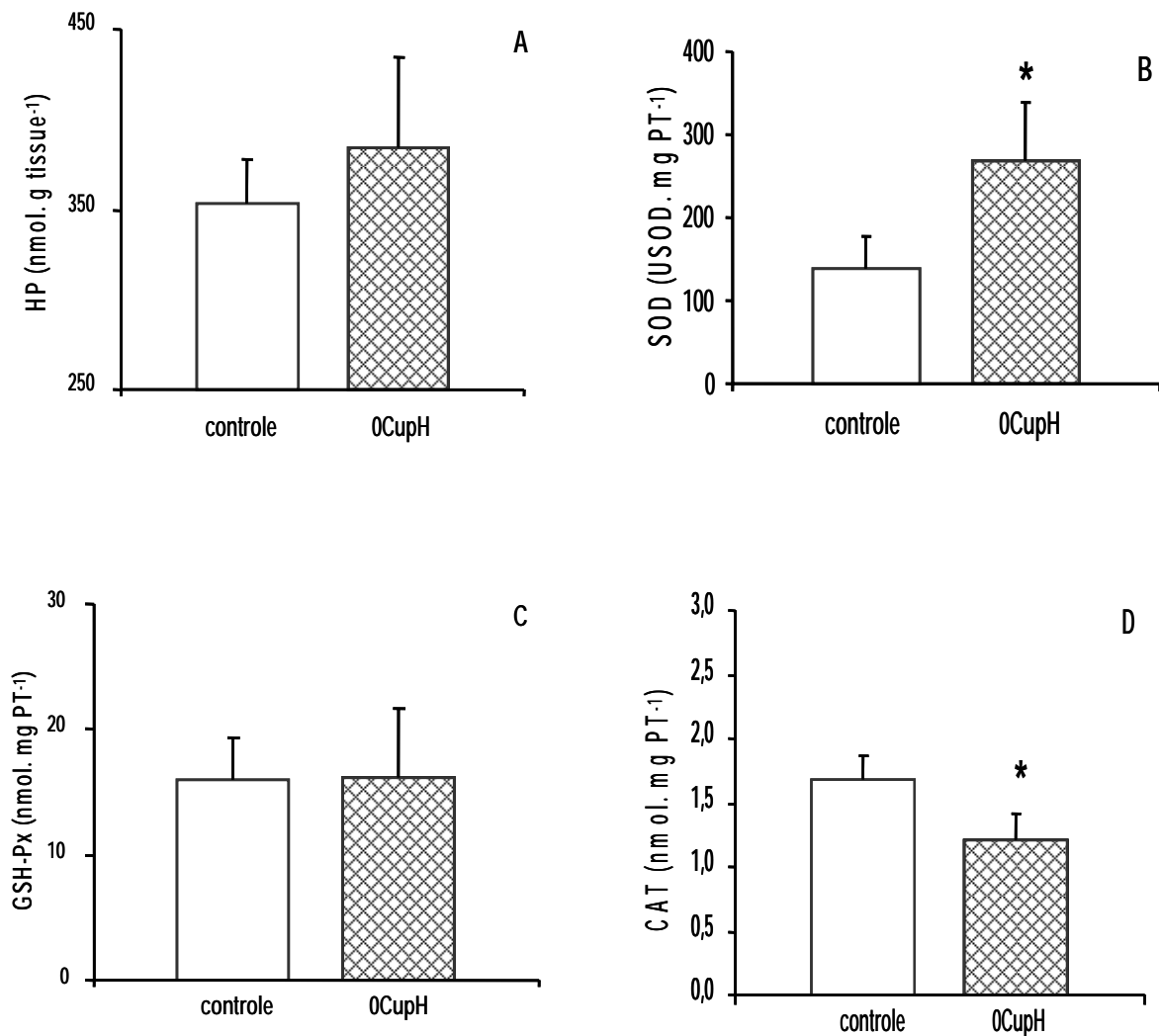


Figura 10. Concentração de HP (nmol.g tecido⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína⁻¹) (D) no fígado de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias (p < 0,05).

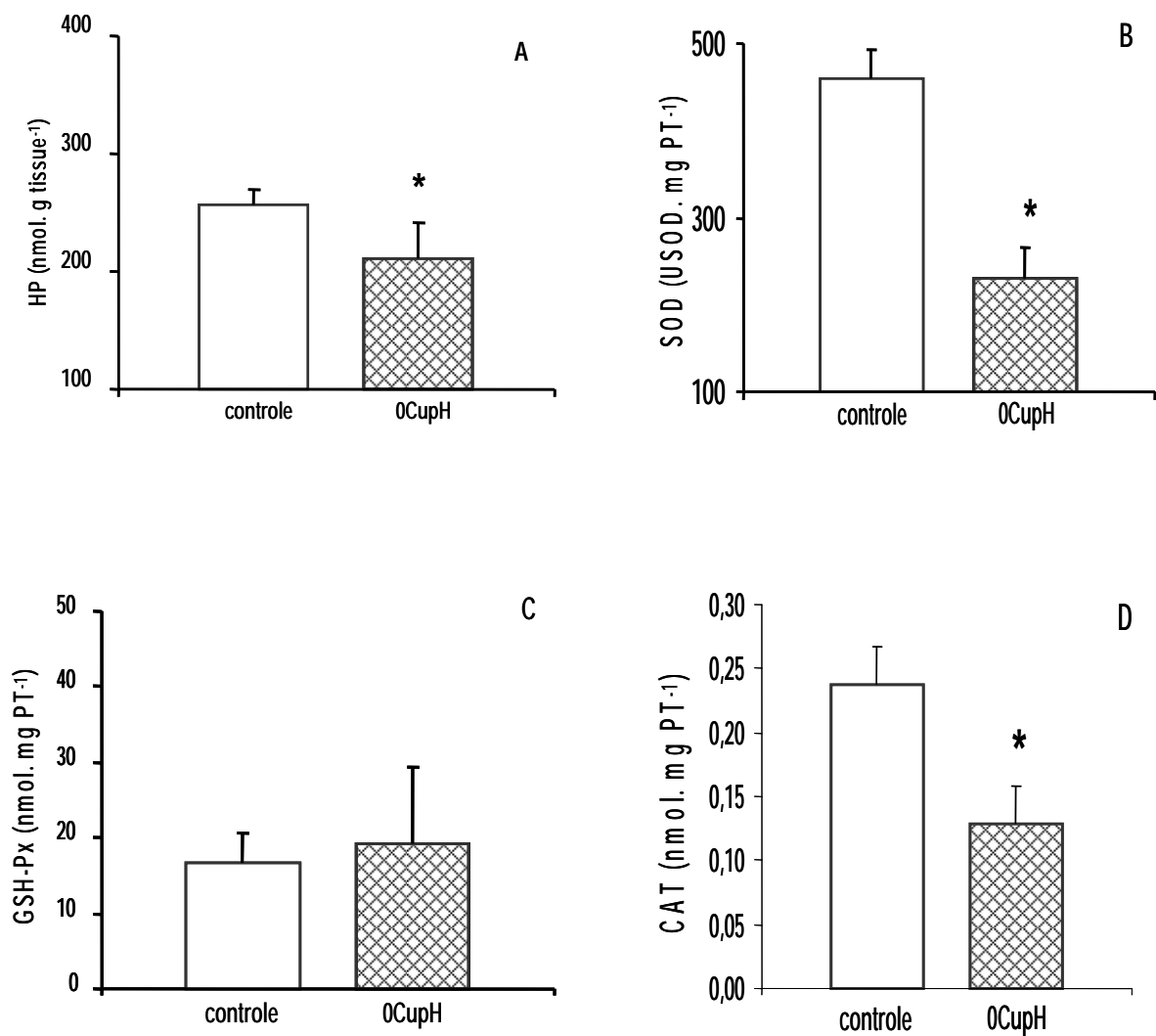


Figura 11. Concentração de HP (nmol.g tecido⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína⁻¹) (D) no músculo vermelho de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias (p < 0,05).

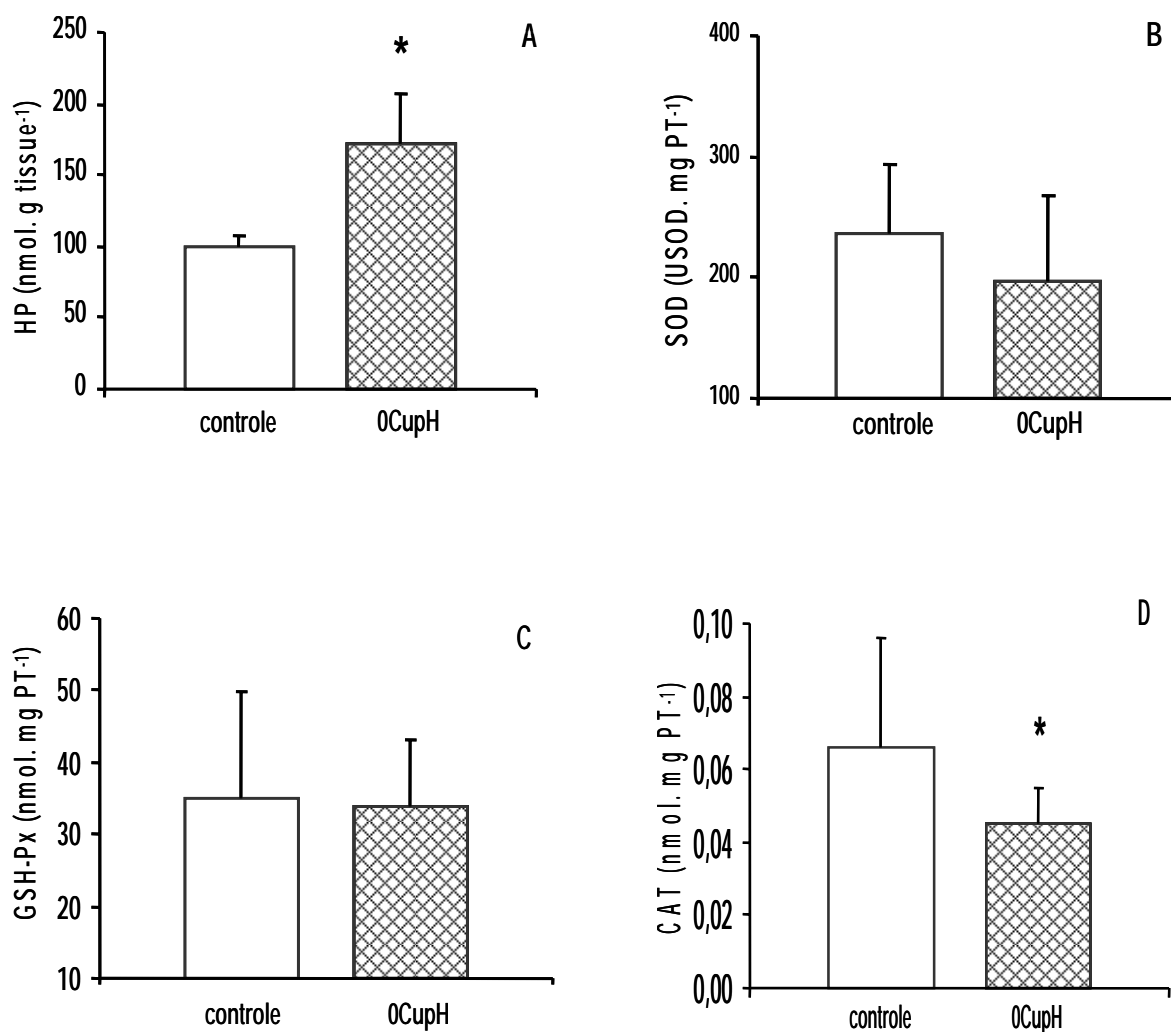


Figura 12. Concentração de HP (nmol.g tecido⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína⁻¹) (D) no músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias (p < 0,05).

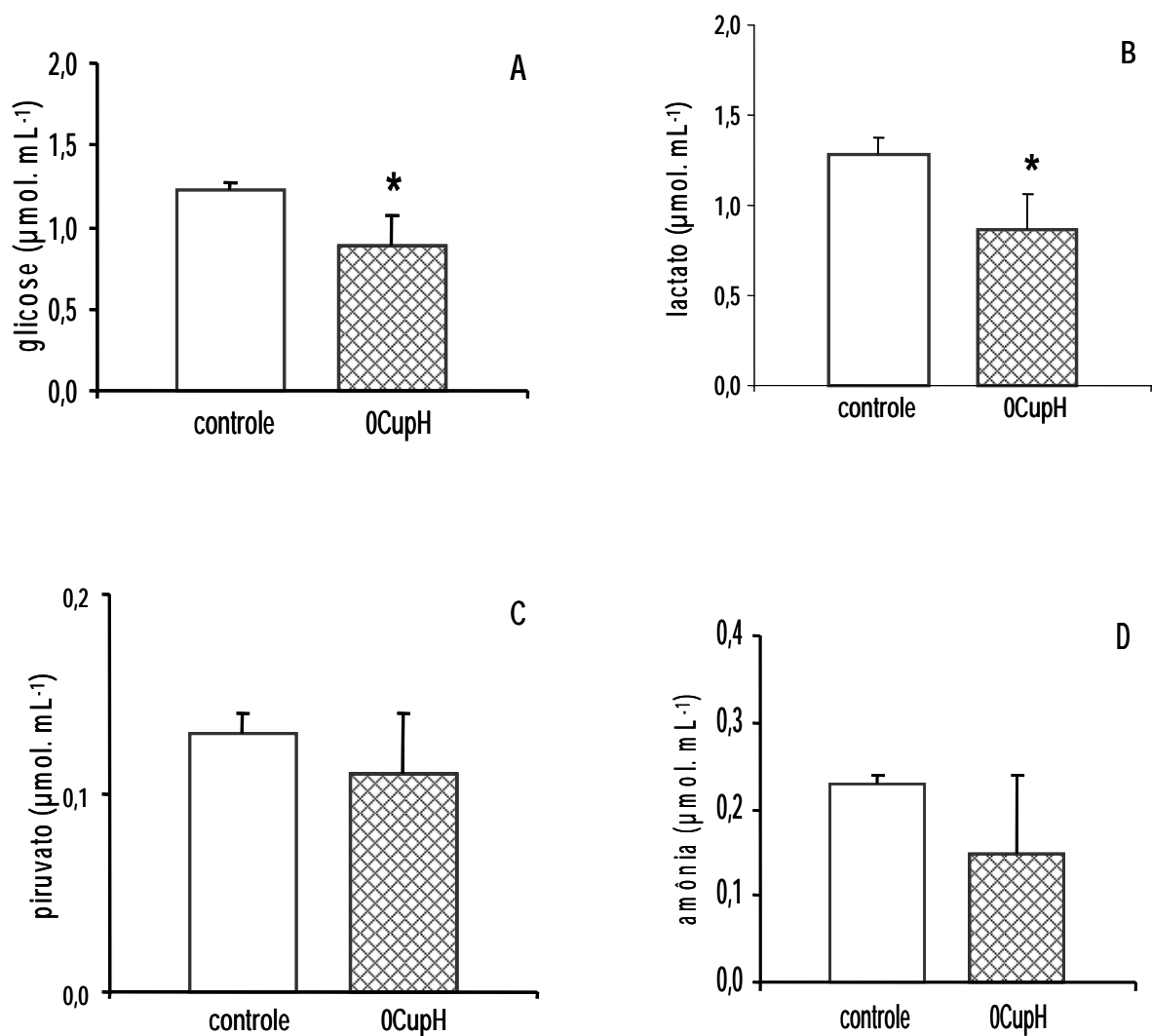


Figura 13. Concentrações plasmáticas de glicose ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) (A), lactato ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) (B), piruvato ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) (C), amônia ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) (D) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias ($p < 0,05$).

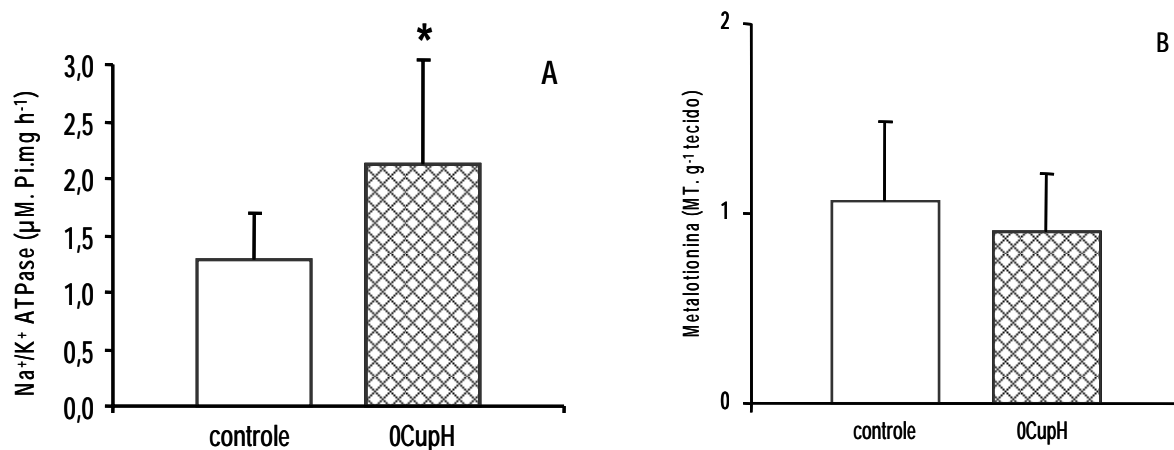


Figura 14. Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial (µM Pi.mg. h⁻¹) (**A**) e da concentração de Metalotionina branquial (MT.g⁻¹ tecido) (**B**) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias (p < 0,05).

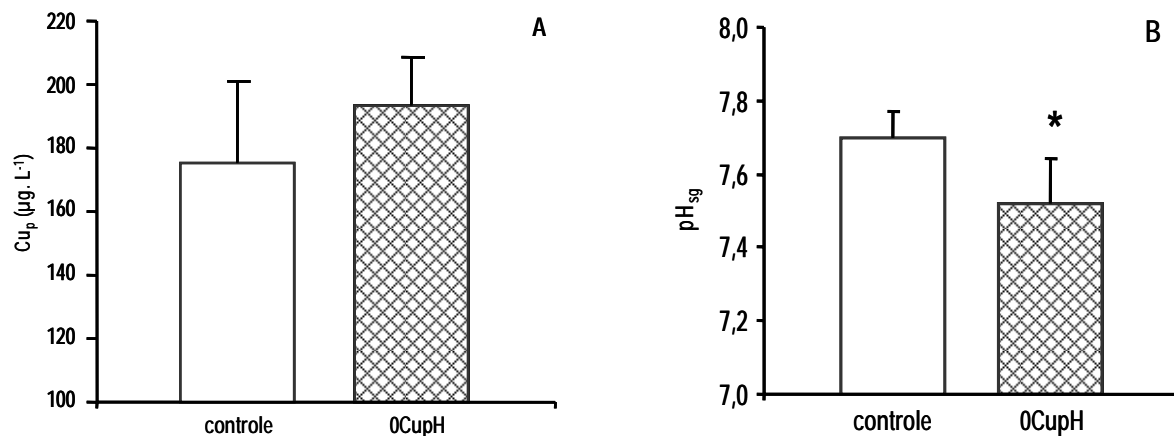


Figura 15. Concentração de cobre no plasma [Cu_p] (µg.L⁻¹) (**A**) e do pH do sangue (pH_{sg}) (**B**) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias (p < 0,05).

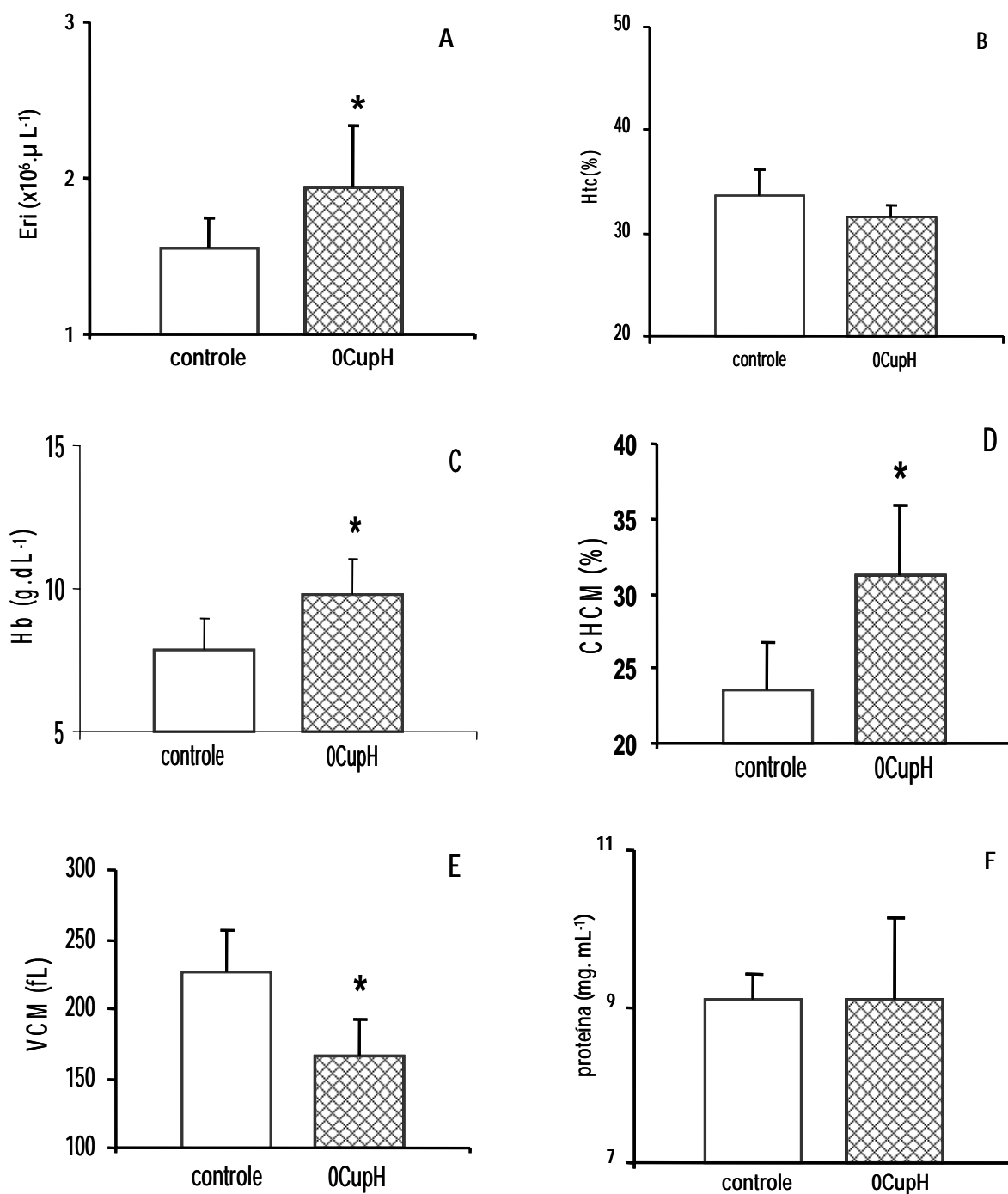


Figura 16. Eritrócito (Eri; $\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (A), hematócrito (Htc; %) (B), concentração de hemoglobina (Hb; $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$) (C), MCHC (%) (D) e MCV (fL) (E) e proteína plasmática ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) (F) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias ($p < 0,05$).

7.3.3. Efeitos da exposição à hipóxia

Os efeitos da exposição à hipóxia no pacu foram verificados após comparação dos dados dos peixes do grupo 0CuHpx com os do grupo controle. As respostas do metabolismo oxidativo no fígado (Figura 17) demonstram que os peixes expostos à hipóxia diminuíram as atividades da GSH-Px e CAT em 32 e 22%, respectivamente, sem diferenças na concentração de HP e na atividade da SOD. No músculo vermelho (Figura 18), os peixes expostos à hipóxia não diferiram nas concentrações de HP e na atividade da GSH-Px. Porém, houve diminuição das atividades da SOD e da CAT em 47 e 55%, respectivamente. No músculo branco (Figura 19) houve um aumento de 87% na concentração de HP, sem diferenças nas atividades das enzimas de DAs.

No metabolismo intermediário do pacu, após exposição à hipóxia houve, uma diminuição das concentrações plasmáticas de glicose (19%), de lactato (41%), de piruvato (22%) e de amônia (47%) (Figura 20). A exposição do pacu à hipóxia aumentou em 66% a atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial (Figura 21). Neste mesmo tecido, não houve diferença nas concentrações de MT em decorrência das concentrações de OD no meio. Também não houve diferença na $[\text{Cu}_p]$. Verificou-se diminuição de 2% do pH_{sg} nos peixes expostos à hipóxia comparados aos do grupo controle. Os parâmetros hematológicos dos peixes expostos à condição de hipóxia estão na Figura 22. Verificamos que houve aumento de 41% no Eri, de 18% no Htc e de 20% na Hb e diminuição de 18% no VCM, quando comparados aos peixes do grupo controle (Figura 23).

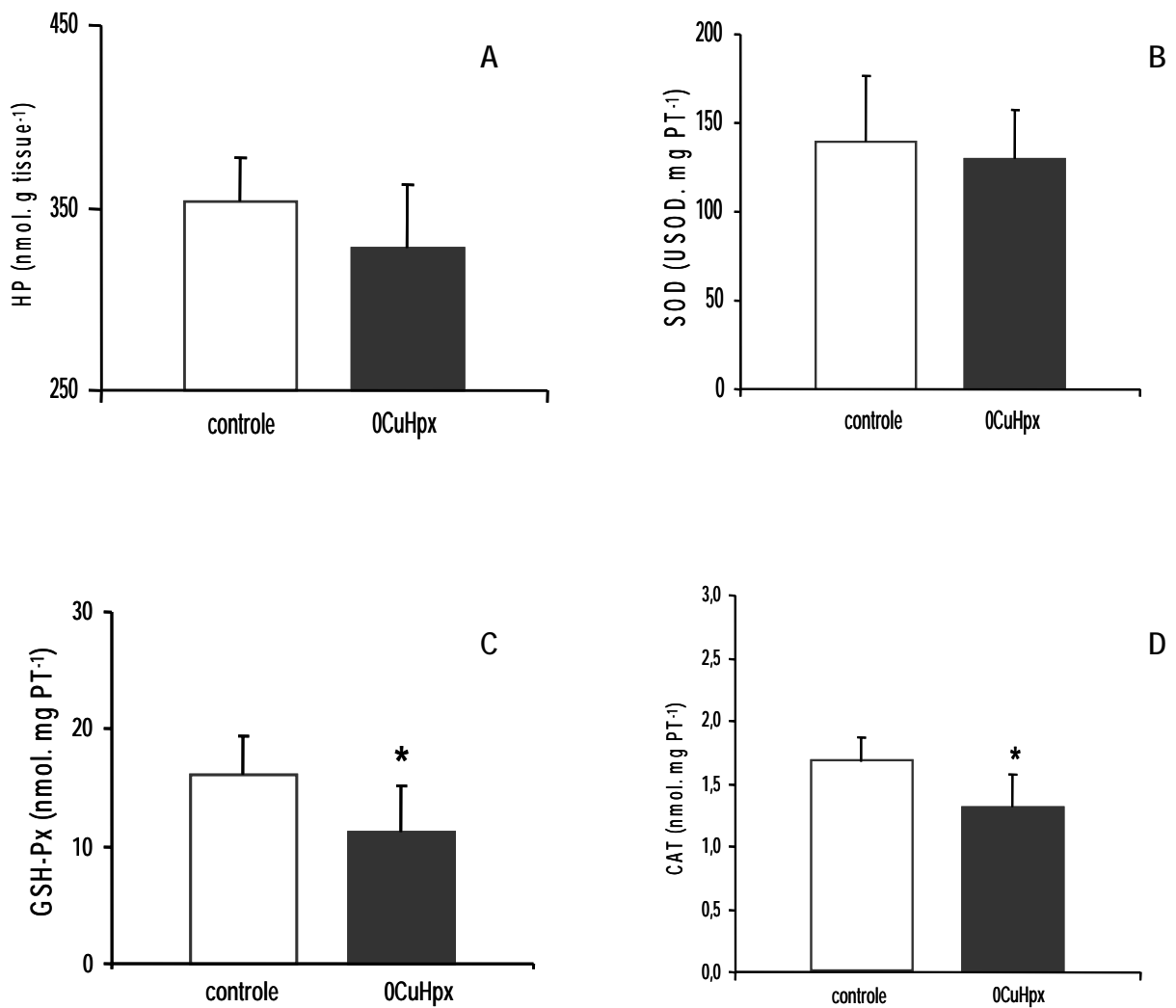


Figura 17. Concentração de HP (nmol.g tecido⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína⁻¹) (D) no fígado de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias (p < 0,05).

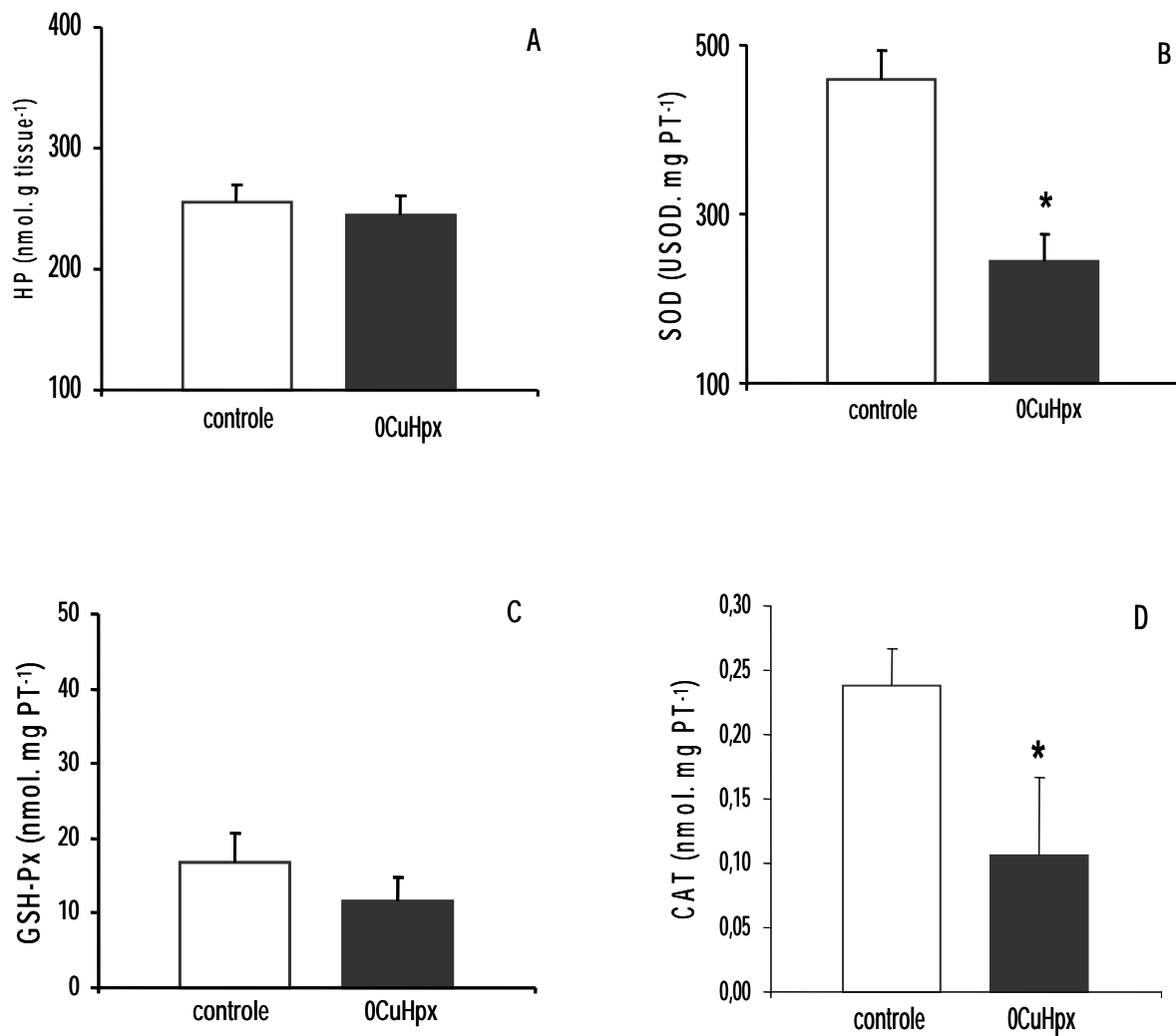


Figura 18. Concentração de HP (nmol.g tecido⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína⁻¹) (D) no músculo vermelho de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias (p < 0,05).

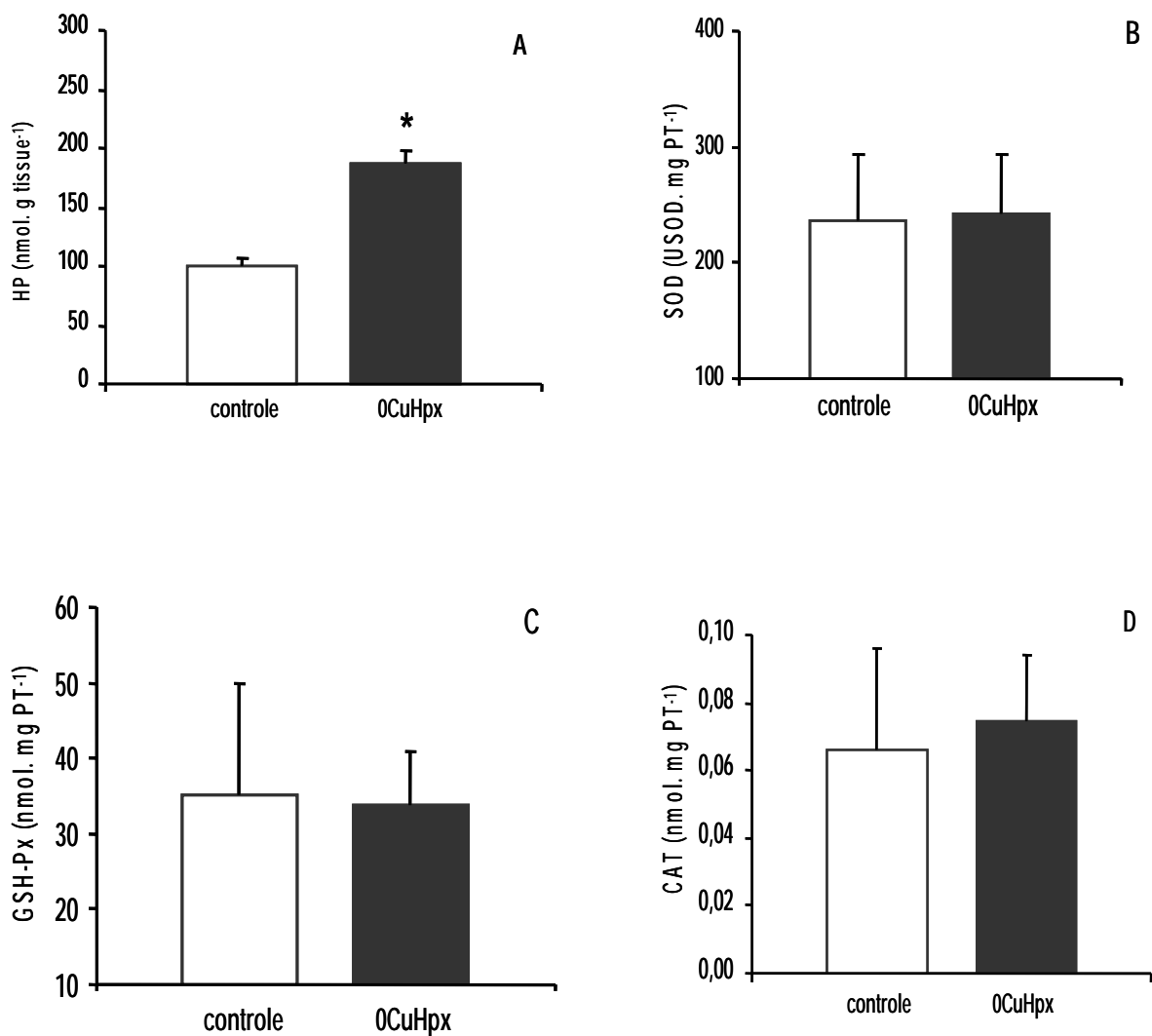


Figura 19. Concentração de HP (nmol.g tecido⁻¹) (A), SOD (USOD.mg proteína⁻¹) (B), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) (C) e CAT (UB.mg proteína⁻¹) (D) no músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias ($p < 0,05$).

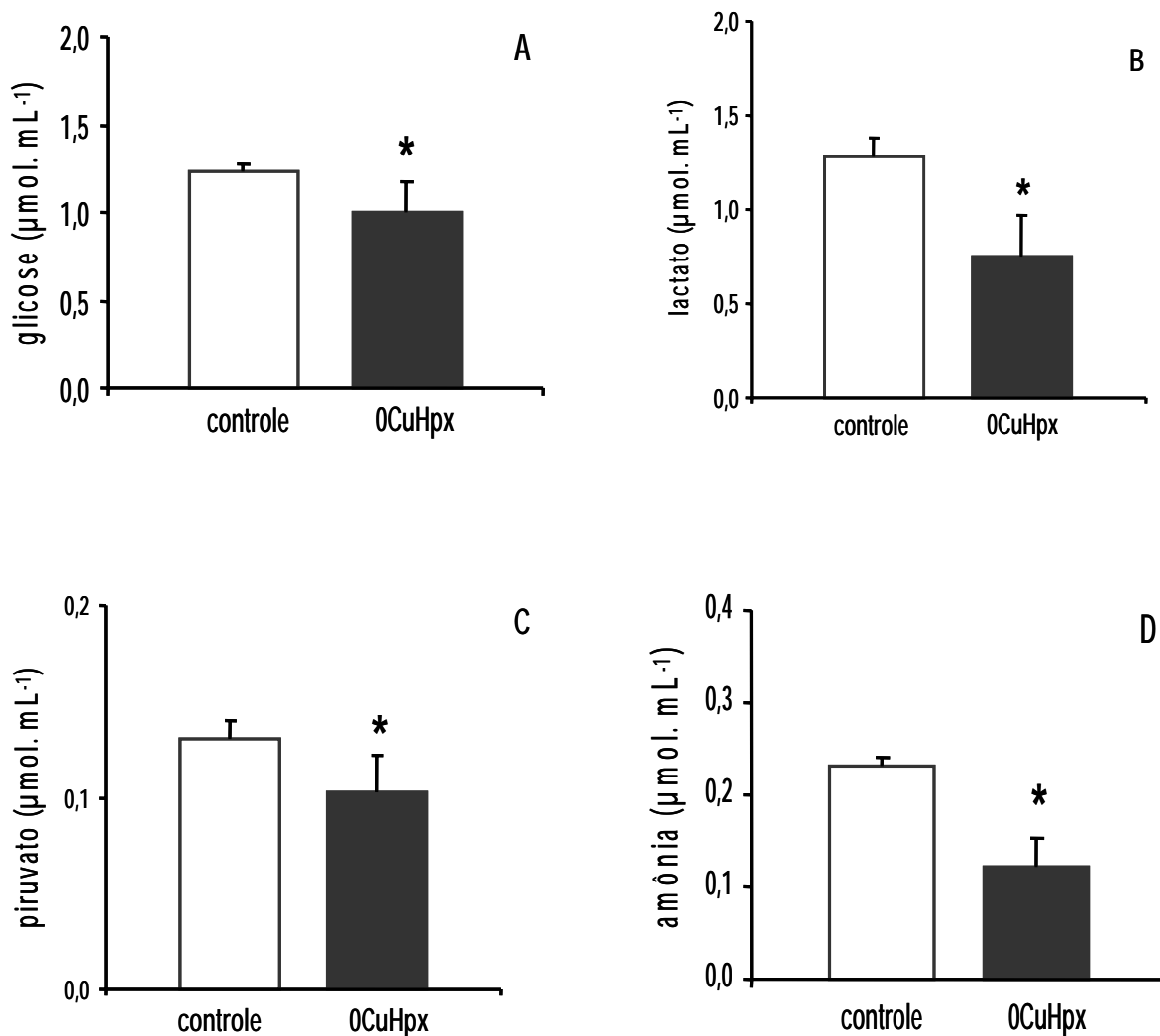


Figura 20. Concentrações plasmáticas de glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (A), lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (B), piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (C), amônia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) (D) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias ($p < 0,05$).

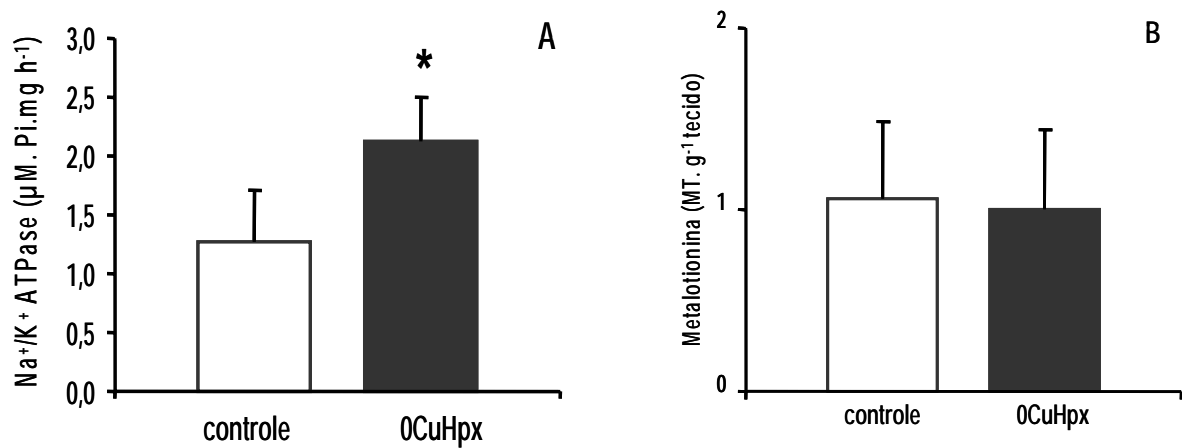


Figura 21. Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial (µM Pi.mg. h⁻¹) (A) e da concentração de Metalotionina branquial (MT.g⁻¹ tecido) (B) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias (p < 0,05).

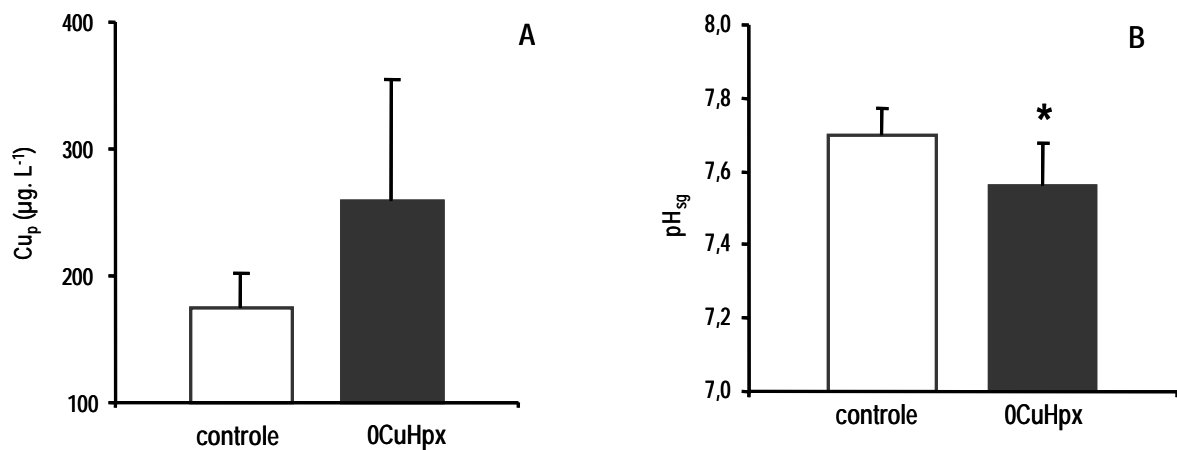


Figura 22. Concentração de cobre no plasma [Cu_p] (µg.L⁻¹) (A) e do PH do sangue (pH_{sg}) (B) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), por 48 horas. Valores são média ± DP. * representa diferença entre as médias (p < 0,05).

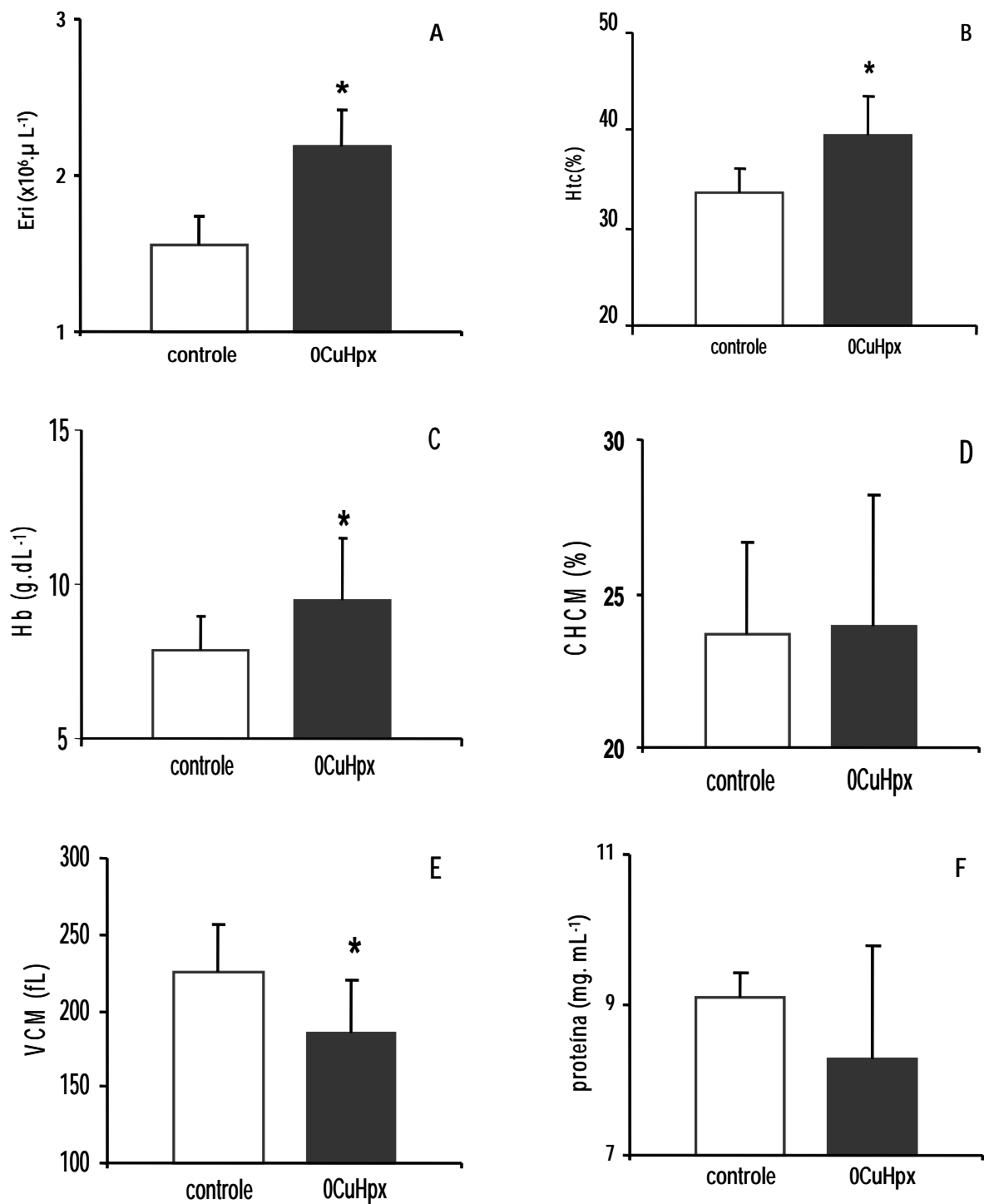


Figura 23. Eritrócito (Eri; $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) (A), hematócrito (Htc; %) (B), concentração de hemoglobina (Hb; g.dL^{-1}) (C), MCHC (%) (D) e MCV (fL) (E) e proteína plasmática (mg.mL^{-1}) (F) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao controle (sem adição de cobre) e 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), por 48 horas. Valores são média \pm DP. * representa diferença entre as médias ($p < 0,05$).

7.4 Efeito da interação entre os fatores

7.4.1 Efeito da interação dos níveis de cobre e dos níveis de pH

a. Metabolismo oxidativo

A Tabela 6 mostra o resultado da Anova GLM realizada entre os fatores cobre e pH no metabolismo oxidativo do fígado do pacu e do teste de Dunnet comparado os grupos experimentais com o grupo controle. Houve interação significativa dos níveis de cobre e pH na concentração hepática de HP ($p = 0,008$) e nas atividades da SOD ($p < 0,001$) e da CAT ($p < 0,001$). A atividade da GSH-Px, por outro lado, não foi influenciada por interação entre os fatores cobre e pH ($p = 0,610$). A concentração de HP hepática em resposta à adição de cobre depende do pH do meio. Na ausência de cobre o pH não teve efeito na concentração de HP, mas na presença de cobre houve diferença de padrão de resposta entre os dois níveis de cobre adicionados na água nos diferentes pHs experimentais. A atividade hepática da SOD, em resposta aos níveis de cobre, é dependente do pH aquático, havendo diferença no padrão de resposta na presença de cobre quando comparado às atividades em pH neutro e pH ácido. O efeito do cobre sobre a atividade da CAT depende do pH do meio, de maneira que o aumento da atividade da CAT em resposta ao incremento de cobre foi abolido em meio ácido. Comparados aos peixes do grupo controle, a concentração de HP foi maior nos peixes do grupo 0.4Cu. A atividade da SOD aumentou nos peixes do grupo 0CupH e 2.0CupH e a atividade da CAT diminuiu nos peixes do grupo 0.4Cu, 0CupH, 0.4CupH e 2.0CupH e aumentou no grupo 2.0Cu.

Os resultados da interação no músculo vermelho estão apresentados na Tabela 7. Houve efeito da interação entre cobre e pH na concentração de HP deste tecido ($p < 0,001$) e nas atividades da SOD, GSH-Px e CAT ($p < 0,001$). Quando associados os fatores, foram observadas diferenças nos padrões enzimáticos de resposta ao incremento de cobre, comparados às respostas dos fatores isolados, ocorrendo, em sua maioria, diminuição das atividades enzimáticas como resultado da exposição aos fatores associados. Na comparação com os peixes do grupo controle, a concentração de HP foi menor nos peixes dos grupos 2.0Cu, 0CupH e 2.0CupH. A atividade da SOD diminuiu nos peixes dos grupos 0CupH, 0.4CupH e 2.0CupH. A atividade da GSH-Px aumentou no grupo 2.0Cu e a atividade da CAT diminuiu nos peixes dos grupos 0.4Cu, 2.0Cu, 0CupH, 0.4CupH e 2.0CupH.

No músculo branco (Tabela 8) houve efeito dos fatores cobre e pH na concentração de HP ($p < 0,001$), com aumento de concentração de HP neste tecido, em decorrência da

exposição dos peixes às associações de cobre e pH ácido. Não houve interação entre cobre e pH nas atividades da SOD ($p = 0,266$), da GSH-Px ($p = 0,224$) e da CAT ($p = 0,074$). Assim sendo, no músculo branco as atividades destas enzimas em resposta às concentrações de cobre são semelhantes em pH neutro e ácido. Comparado aos peixes do grupo controle a concentração de HP foi maior nos peixes dos grupos 0.4Cu, 2.0Cu, 0CupH, 0.4CupH e 2.0CupH. A atividade da SOD aumentou nos peixes do grupo 2.0Cu. A atividade da CAT diminuiu nos peixes dos grupos 0.4Cu, 0CupH e 0.4CupH.

A fim de verificarmos possíveis variações na R_{px} e R_{EO} , decorrentes da associação do cobre e meio ácido, estas razões foram realizadas no fígado, músculo vermelho e músculo branco (Tabela 9 e 10).

Tabela 9. Razão R_{px} (GSH-Px/CAT) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), 0.4CupH 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5,0), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5,0) por 48 horas.

| | fígado | m. vermelho | m. branco |
|---------|--------|-------------|-----------|
| 0CupH | 13 | 150 | 747 |
| 0.4CupH | 11 | 101 | 827 |
| 2.0CupH | 17 | 414 | 425 |

Tabela 10. Razão R_{EO} (HP/(GSH-Px+CAT)) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao grupo 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5,0), 0.4CupH 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5,0), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5,0) por 48 horas.

| | fígado | m. vermelho | m. branco |
|---------|--------|-------------|-----------|
| 0CupH | 22 | 11 | 5 |
| 0.4CupH | 28 | 15 | 10 |
| 2.0CupH | 16 | 10 | 5 |

b. Intermediários metabólicos

As concentrações de glicose ($p < 0,001$), lactato ($p < 0,001$), piruvato ($p = 0,035$) e amônia plasmática ($p < 0,001$), em resposta ao incremento de cobre aquático, dependem do pH do meio (Tabela 11). A concentração de glicose e lactato não foram responsivas ao incremento de cobre aquático em pH neutro, porém, em meio ácido estas concentrações foram elevadas nos diferentes níveis de cobre. Nas concentrações de piruvato e amônia plasmática foram verificados os efeitos de interação, principalmente, no maior nível de inclusão de cobre que teve seu padrão de resposta diferente em pH neutro e ácido. Não houve efeito de interação cobre e pH na concentração de proteína plasmática ($p = 0,239$). Comparado aos peixes do grupo controle a concentração de glicose no plasma foi menor nos peixes do grupo 0CupH e maior nos do grupo 2.0CupH. A concentração de lactato e amônia plasmática foram maiores nos peixes do grupo 2.0CupH e a de piruvato foi maior nos do grupo 2.0Cu.

c. Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e concentração de Metalotionina branquial

A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial (Tabela 12) em resposta ao incremento de cobre aquático mostrou-se dependente do pH do meio, pois houve interação positiva entre estes fatores na atividade desta enzima ($p < 0,012$), havendo diminuição de sua atividade com o aumento de cobre aquático nos dois níveis de pH, porém, com intensidades diferentes. Não houve interação entre cobre e pH ($p = 0,861$) na concentração de MT branquial. Em decorrência do efeito significativo do fator cobre ($p < 0,001$) e não significância do fator pH ($p = 0,134$), verificou-se que os aumentos são provenientes exclusivamente da resposta da inclusão de cobre na água e que, indiferentemente das condições de pH do meio, a MT branquial elevou-se em resposta ao aumento de cobre. Na comparação com os peixes do grupo controle a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial foi maior nos peixes do grupo 0CupH e menor nos do grupo 2.0CupH. A concentração de MT foi maior nos peixes dos grupos 0.4Cu, 2.0Cu e 2.0CupH.

d. Concentração de cobre plasmático [Cu_p] e pH sanguíneo

Não houve interação entre cobre e pH ($p = 0,089$) nas concentrações [Cu_p] (Tabela 12). Ocorreu interação cobre e pH ($p < 0,001$) no pH_{sg}, havendo diferença no padrão de resposta em todos os níveis de inclusão de cobre quando comparados em meio neutro e ácido. Na

comparação com os peixes do grupo controle a $[Cu_p]$ foi maior nos peixes dos grupos 0.4Cu e 0.4CupH. O pH_{sg} foi menor nos peixes dos grupos 2.0Cu, 0CupH, 0.4CupH e 2.0CupH.

e. Parâmetros Hematológicos

Avaliando os efeitos dos fatores nos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos, verificamos que houve interação significativa do cobre e pH (Tabela 13) para Htc ($p < 0,001$), CHCM ($p < 0,001$) e VCM ($p = 0,004$) havendo inversão de padrão de resposta nos peixes, aumentando o Htc e o CHCM e diminuindo o VCM, quando expostos à associação dos fatores, sendo que não houve efeito cobre e pH no Eri ($p = 0,641$) e na Hb ($p = 0,719$). Para estas duas variáveis verificou-se o mesmo padrão e intensidade de resposta às concentrações de cobre em pH neutro e ácido. Comparado aos peixes do grupo controle o Eri e Hb foram maiores nos peixes dos grupos 0.4Cu, 2.0Cu, 0CupH, 0.4CupH e 2.0CupH. O Htc foi maior nos peixes do grupo 2.0CupH. O CHCM foi maior nos grupos 2.0Cu, 0CupH, 0.4CupH e 2.0CupH. O VCM foi menor nos grupos 2.0Cu, 0CupH e 0.4CupH.

Tabela 6. HP (nmol.g tecido⁻¹), SOD (USOD.mg proteína⁻¹), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) e CAT (nmol.mg proteína⁻¹) no fígado de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média ± DP.

| | cobre | HP (nmol.g) tecido ⁻¹ | n | SOD USOD.mgPT ⁻¹ | n | GSH-Px nmol.mgPT ⁻¹ | n | CAT nmol.mgPT ⁻¹ | n |
|------------------------|-------|-------------------------------------|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|----|
| neutro | 0 | 353,69±23,88 ^{bA} | 6 | 139,30±37,03 ^{aA} | 5 | 16,50±3,19 | 7 | 1,678±0,19 ^{bB} | 4 |
| neutro | 0.4 | 396,37±27,68 ^{bB*} | 9 | 194,91±18,83 ^{aA} | 9 | 13,67±2,28 | 9 | 1,177±0,13 ^{aA*} | 8 |
| neutro | 2.0 | 283,09±17,32 ^{aA} | 6 | 191,51±50,78 ^{aA} | 6 | 17,65±6,37 | 6 | 2,204±0,47 ^{cB*} | 5 |
| ácido | 0 | 383,72±51,05 ^{bA} | 18 | 269,07±69,19 ^{bB*} | 11 | 16,18±5,39 | 13 | 1,213±0,21 ^{aA*} | 14 |
| ácido | 0.4 | 359,13±17,09 ^{abA} | 8 | 172,35±22,51 ^{aA} | 8 | 11,79±3,22 | 6 | 1,114±0,24 ^{aA*} | 8 |
| ácido | 2.0 | 323,04±27,73 ^{aA} | 6 | 357,47±24,71 ^{cB*} | 6 | 18,94±1,23 | 6 | 1,141±0,12 ^{aA*} | 5 |
| Efeito pH ¹ | | p = 0,311 | | p < 0,001 | | p = 0,906 | | p < 0,001 | |
| neutro | | 344,38 | | 175,24 ^a | | 15,79 | | 1,686 ^b | |
| ácido | | 355,29 | | 266,29 ^b | | 15,64 | | 1,156 ^a | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,005 | | p < 0,001 | |
| 0 | | 368,71 ^b | | 204,19 ^a | | 16,12 ^{ab} | | 1,445 ^b | |
| 0.4 | | 377,75 ^b | | 183,63 ^a | | 12,73 ^a | | 1,146 ^a | |
| 2.0 | | 303,06 ^a | | 274,49 ^b | | 18,30 ^b | | 1,672 ^b | |
| Cu x pH ³ | | p = 0,008 | | p < 0,001 | | p = 0,610 | | p < 0,001 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de pH, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de pH.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator pH; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator pH e cobre.

Tabela 7. HP (nmol.g tecido⁻¹), SOD (USOD.mg proteína⁻¹), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) e CAT (nmol.mg proteína⁻¹) no músculo vermelho de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média ± DP.

| | cobre | HP (nmol.g tecido ⁻¹) | n | SOD USOD.mgPT ⁻¹ | n | GSH-Px nmol.mg | n | CAT nmol.mgPT ⁻¹ | n |
|------------------------|-------|--------------------------------------|----|--------------------------------|----|---------------------------|----|--------------------------------|----|
| neutro | 0 | 255,57±17,40 ^{bB} | 7 | 459,99±39,06 ^{bB} | 7 | 16,65±7,92 ^{aA} | 6 | 0,237±0,09 ^{cB} | 7 |
| neutro | 0.4 | 240,59±7,69 ^{bA} | 9 | 429,50±37,52 ^{bB} | 8 | 13,44±2,72 ^{aA} | 8 | 0,144±0,02 ^{bA*} | 9 |
| neutro | 2.0 | 204,21±14,85 ^{aA*} | 6 | 242,36±41,66 ^{aA*} | 6 | 42,47±6,32 ^{bB*} | 6 | 0,068±0,03 ^{aA*} | 5 |
| ácido | 0 | 211,65±29,94 ^{aA*} | 20 | 230,06±35,76 ^{aA*} | 20 | 19,29±10,15 ^{aA} | 20 | 0,129±0,03 ^{bA*} | 11 |
| ácido | 0.4 | 234,02±13,92 ^{bA} | 8 | 241,11±39,47 ^{abA*} | 8 | 15,27±6,43 ^{aA} | 8 | 0,152±0,02 ^{bA*} | 8 |
| ácido | 2.0 | 221,61±9,60 ^{bA*} | 6 | 289,94±35,46 ^{bB*} | 6 | 21,70±4,64 ^{aA} | 6 | 0,052±0,03 ^{aA*} | 5 |
| Efeito pH ¹ | | p < 0,078 | | p < 0,001 | | p < 0,024 | | p < 0,007 | |
| neutro | | 233,46 | | 377,28 ^b | | 24,19 ^b | | 0,150 ^b | |
| ácido | | 222,43 | | 253,71 ^a | | 18,75 ^a | | 0,111 ^a | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,008 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | |
| 0 | | 233,61 ^b | | 345,03 ^b | | 17,97 ^a | | 0,183 ^b | |
| 0.4 | | 237,30 ^b | | 335,31 ^b | | 14,35 ^a | | 0,148 ^b | |
| 2.0 | | 212,91 ^a | | 266,15 ^a | | 32,09 ^b | | 0,060 ^a | |
| Cu x pH ³ | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de pH, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de pH.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator pH; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator pH e cobre.

Tabela 8. HP (nmol.g tecido⁻¹), SOD (USOD.mg proteína⁻¹), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) e CAT (nmol.mg proteína⁻¹) no músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média ± DP.

| | cobre | HP (nmol.g) tecido ⁻¹ | n | SOD USOD.mgPT ⁻¹ | n | GSH-Px nmol.mgPT ⁻¹ | n | CAT nmol.mgPT ⁻¹ | n |
|------------------------|-------|-------------------------------------|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|----|
| neutro | 0 | 100,34±4,31 ^{aA} | 7 | 235,27±64,58 | 7 | 35,00±12,38 | 4 | 0,066±0,02 | 6 |
| neutro | 0.4 | 190,27±12,10 ^{bA*} | 8 | 168,12±35,32 | 9 | 24,12±6,20 | 9 | 0,033±0,01* | 9 |
| neutro | 2.0 | 186,59±5,85 ^{bA*} | 6 | 338,94±36,18* | 6 | 26,04±7,41 | 6 | 0,068±0,02 | 5 |
| ácido | 0 | 171,37±36,22 ^{aB*} | 20 | 195,85±72,18 | 20 | 33,77±9,36 | 19 | 0,045±0,01* | 18 |
| ácido | 0.4 | 211,38±30,28 ^{bA*} | 7 | 187,83±30,71 | 8 | 20,13±3,02 | 6 | 0,024±0,01* | 8 |
| ácido | 2.0 | 176,82±12,12 ^{abA*} | 5 | 303,07±17,14 | 5 | 34,45±13,26 | 5 | 0,081±0,02 | 4 |
| Efeito pH ¹ | | p < 0,001 | | p = 0,263 | | p = 0,706 | | p = 0,337 | |
| neutro | | 159,07 ^a | | 247,44 | | 28,39 | | 0,056 | |
| ácido | | 186,52 ^b | | 228,92 | | 29,45 | | 0,050 | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | |
| 0 | | 135,86 ^a | | 215,56 ^a | | 34,39 ^b | | 0,056 ^b | |
| 0.4 | | 200,83 ^b | | 177,98 ^a | | 22,13 ^a | | 0,029 ^a | |
| 2.0 | | 181,70 ^b | | 321,00 ^b | | 30,24 ^{ab} | | 0,074 ^c | |
| Cu x pH ³ | | p < 0,001 | | p = 0,266 | | p = 0,224 | | p = 0,074 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de pH, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de pH.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator pH; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator pH e cobre.

Tabela 11. Concentrações plasmáticas de glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), amônia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) e proteína (mg.mL^{-1}) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L^{-1} de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L^{-1} de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L^{-1} de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L^{-1} de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média \pm DP.

| | cobre | Glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Amônia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Proteína (mg.mL^{-1}) | n |
|------------------------|-------|----------------------------------------|----|----------------------------------------|----|-----------------------------------------|----|---------------------------------------|----|-------------------------------------|----|
| neutro | 0 | 1,23 \pm 0,04 ^{ab} | 5 | 1,28 \pm 0,10 ^{ab} | 5 | 0,130 \pm 0,01 ^{aA} | 5 | 0,230 \pm 0,01 ^{ab} | 5 | 9,09 \pm 0,32 | 5 |
| neutro | 0.4 | 1,17 \pm 0,33 ^{aA} | 7 | 1,27 \pm 0,44 ^{aA} | 7 | 0,140 \pm 0,03 ^{aA} | 7 | 0,214 \pm 0,04 ^{aA} | 7 | 9,02 \pm 1,74 | 6 |
| neutro | 2.0 | 1,29 \pm 0,22 ^{aA} | 6 | 1,68 \pm 0,26 ^{aA} | 5 | 0,218 \pm 0,02 ^{bb*} | 5 | 0,260 \pm 0,03 ^{aA} | 5 | 8,75 \pm 1,43 | 6 |
| ácido | 0 | 0,88 \pm 0,19 ^{aA*} | 15 | 0,86 \pm 0,20 ^{aA} | 15 | 0,110 \pm 0,03 ^{aA} | 15 | 0,147 \pm 0,09 ^{aA} | 16 | 9,09 \pm 1,03 | 16 |
| ácido | 0.4 | 1,15 \pm 0,41 ^{aA} | 6 | 1,80 \pm 0,42 ^{bb} | 6 | 0,112 \pm 0,02 ^{aA} | 6 | 0,223 \pm 0,06 ^{aA} | 6 | 7,78 \pm 1,10 | 5 |
| ácido | 2.0 | 1,88 \pm 0,15 ^{bb*} | 5 | 2,58 \pm 0,31 ^{cb*} | 5 | 0,142 \pm 0,02 ^{aA} | 5 | 0,460 \pm 0,13 ^{bb*} | 5 | 9,76 \pm 2,92 | 7 |
| Efeito pH ¹ | | p = 0,374 | | p < 0,002 | | p < 0,001 | | p = 0,104 | | p = 0,876 | |
| neutro | | 1,23 | | 1,41 ^a | | 0,163 ^b | | 0,235 | | 8,95 | |
| ácido | | 1,30 | | 1,74 ^b | | 0,121 ^a | | 0,277 | | 8,87 | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p = 0,395 | |
| 0 | | 1,05 ^a | | 1,07 ^a | | 0,120 ^a | | 0,188 ^a | | 9,09 | |
| 0.4 | | 1,16 ^a | | 1,54 ^b | | 0,126 ^a | | 0,219 ^a | | 8,40 | |
| 2.0 | | 1,59 ^b | | 2,13 ^c | | 0,180 ^b | | 0,360 ^b | | 9,25 | |
| Cu x pH ³ | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p = 0,035 | | p < 0,001 | | p = 0,239 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de pH, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de pH.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator pH; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator pH e cobre.

Tabela 12. Na⁺/K⁺-ATPase ($\mu\text{M Pi.mg prot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), Metalotionina (MT.g^{-1} tecido), [Cu_p] ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e pH sanguíneo de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média \pm DP.

| | cobre | Na+/K+-ATPase ($\mu\text{M Pi.mg prot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) | n | Metalotionina (MT.g^{-1} tecido) | n | [Cu _p] ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | n | pH _{sg} | n | |
|------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------|----------------------|------------------|--------------------------------|----|
| | neutro | 0 | 1,28 \pm 0,44 ^{aA} | 10 | 1,06 \pm 0,12 | 6 | 175,43 \pm 27,90 | 7 | 7,70 \pm 0,18 ^{bB} | 9 |
| | neutro | 0.4 | 0,83 \pm 0,25 ^{aA} | 10 | 1,95 \pm 0,90* | 9 | 430,60 \pm 173,07* | 10 | 7,81 \pm 0,07 ^{bB} | 10 |
| | neutro | 2.0 | 0,76 \pm 0,30 ^{aA} | 6 | 4,42 \pm 0,36* | 5 | 173,12 \pm 24,27 | 8 | 7,43 \pm 0,12 ^{aA*} | 10 |
| | ácido | 0 | 2,12 \pm 0,92 ^{bB*} | 16 | 0,91 \pm 0,30 | 20 | 193,00 \pm 15,39 | 11 | 7,52 \pm 0,12 ^{aA*} | 20 |
| | ácido | 0.4 | 0,90 \pm 0,30 ^{aA} | 10 | 1,68 \pm 0,28 | 10 | 612,50 \pm 90,76* | 4 | 7,46 \pm 0,19 ^{aA*} | 9 |
| | ácido | 2.0 | 0,53 \pm 0,23 ^{aA*} | 10 | 4,02 \pm 1,37* | 5 | 253,75 \pm 109,61 | 4 | 7,50 \pm 0,14 ^{aA*} | 7 |
| Efeito pH ¹ | | | p = 0,144 | | p = 0,134 | | p = 0,005 | | p < 0,001 | |
| | neutro | | 0,96 | | 2,48 | | 259,72 ^a | | 7,65 ^b | |
| | ácido | | 1,18 | | 2,20 | | 353,08 ^b | | 7,49 ^a | |
| Efeito Cu ² | | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | |
| | 0 | | 1,70 ^b | | 0,98 ^a | | 186,49 ^a | | 7,61 ^b | |
| | 0.4 | | 0,87 ^a | | 1,82 ^b | | 521,55 ^b | | 7,63 ^b | |
| | 2.0 | | 0,64 ^a | | 4,22 ^c | | 213,44 ^a | | 7,46 ^a | |
| Cu x pH ³ | | | p = 0,012 | | p = 0,861 | | p = 0,089 | | p < 0,001 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de pH, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de pH.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator pH; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator pH e cobre.

Tabela 13. Eri ($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$), Htc (%), Hb ($\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$), CHCM (%) e VCM (fL) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de cobre), 2.0Cu ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de cobre), 0CupH (sem adição de cobre, pH = 5.0), 0.4CupH ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de cobre, pH = 5.0), 2.0CupH ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de cobre, pH = 5.0) por 48 horas. Valores são média \pm DP.

| | cobre | Eri ($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) | n | Htc (%) | n | Hb ($\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$) | n | CHCM (%) | n | VCM (fL) | n |
|------------------------|-------|-------------------------------------------------|----|---------------------------------|----|-------------------------------------------|----|---------------------------------|----|-----------------------------------|----|
| neutro | 0 | 1,55 \pm 0,34 | 10 | 33,60 \pm 2,77 ^{abA} | 10 | 7,88 \pm 1,27 | 10 | 23,64 \pm 4,53 ^{aA} | 10 | 225,64 \pm 49,66 ^{bB} | 10 |
| neutro | 0.4 | 2,01 \pm 0,32* | 10 | 38,10 \pm 8,70 ^{bA} | 10 | 9,21 \pm 1,56 | 10 | 25,06 \pm 5,82 ^{aA} | 10 | 193,81 \pm 55,37 ^{abB} | 10 |
| neutro | 2.0 | 1,88 \pm 0,13* | 10 | 32,31 \pm 2,95 ^{aA} | 10 | 11,61 \pm 1,54* | 10 | 36,07 \pm 4,49 ^{bB*} | 10 | 172,73 \pm 20,90 ^{aA*} | 10 |
| ácido | 0 | 1,94 \pm 0,40* | 30 | 31,48 \pm 3,82 ^{aA} | 30 | 9,77 \pm 1,25* | 30 | 31,30 \pm 4,62 ^{aB*} | 30 | 166,30 \pm 26,49 ^{aA*} | 30 |
| ácido | 0.4 | 2,23 \pm 0,23* | 9 | 34,20 \pm 4,10 ^{aA} | 10 | 10,41 \pm 1,47* | 10 | 30,62 \pm 4,33 ^{aB*} | 10 | 154,12 \pm 36,63 ^{aA*} | 9 |
| ácido | 2.0 | 2,33 \pm 0,63* | 10 | 40,94 \pm 4,70 ^{bB*} | 9 | 12,88 \pm 3,09* | 10 | 30,36 \pm 8,14 ^{aA*} | 9 | 187,59 \pm 39,70 ^{aA} | 9 |
| Efeito pH ¹ | | p < 0,001 | | p = 0,449 | | p < 0,001 | | p = 0,055 | | p = 0,003 | |
| neutro | | 1,81 ^a | | 34,67 | | 9,57 ^a | | 28,26 | | 197,39 ^b | |
| ácido | | 2,17 ^b | | 35,54 | | 11,02 ^b | | 30,76 | | 169,34 ^a | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,001 | | p < 0,005 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p = 0,103 | |
| 0 | | 1,74 ^a | | 32,54 ^a | | 8,83 ^a | | 27,47 ^a | | 195,47 | |
| 0.4 | | 2,12 ^b | | 36,15 ^b | | 9,81 ^a | | 27,84 ^a | | 173,97 | |
| 2.0 | | 2,11 ^b | | 36,63 ^b | | 12,25 ^b | | 33,22 ^b | | 180,16 | |
| Cu x pH ³ | | p = 0,641 | | p < 0,001 | | p = 0,719 | | p < 0,001 | | p = 0,004 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de pH, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de pH.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator pH; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator pH e cobre.

7.4.2 efeito da interação dos níveis de cobre e dos níveis de oxigênio dissolvido

a. Metabolismo oxidativo

Os resultados do teste Anova GLM no metabolismo oxidativo de pacus submetidos a variações de níveis de cobre e OD estão nas Tabelas 14, 15 e 16. No fígado (Tabela 14), houve interação cobre e OD na concentração de HP ($p < 0,049$) e nas atividades da SOD e GSH-Px ($p < 0,001$), onde ambos mudaram as respostas frente aos níveis de cobre aquático nos diferentes níveis de OD. Comparados aos peixes do grupo controle a concentração de HP foi maior nos peixes dos grupos 0.4Cu e 0.4CuHpx e menor nos peixes do grupo 2.0Cu. A atividade da SOD aumentou nos peixes dos grupos 0.4Cu, 2.0Cu, 0.4CuHpx e 2.0CuHpx. A atividade da GSH-Px foi maior nos peixes do grupo 2.0CuHpx. A atividade da CAT diminuiu nos peixes do grupo 0CuHpx.

Avaliando os efeitos dos fatores no metabolismo oxidativo do músculo vermelho, os dados apresentados na Tabela 15 mostram que houve efeito da interação cobre e OD na concentração de HP ($p < 0,001$) e nas atividades da SOD ($p < 0,001$), GSH-Px ($p = 0,019$) e CAT ($p = 0,002$). Ressalta-se, neste tecido, o efeito da diminuição do OD no aumento da concentração de HP e na diminuição das atividades das DAs, mostrando interferir no padrão das respostas aos níveis de cobre nas diferentes concentrações de OD. Na comparação com os peixes do grupo controle, a concentração de HP foi maior nos peixes do grupo 0.4CuHpx e menor nos peixes dos grupos 2.0Cu e 2.0CuHpx. A atividade da SOD diminuiu nos peixes dos grupos 2.0Cu, 0CuHpx, 0.4CuHpx e 2.0CuHpx. A atividade da GSH-Px aumentou nos peixes dos grupos 2.0Cu e 2.0CuHpx e a atividade da CAT diminuiu nos peixes dos grupos 0.4Cu, 2.0Cu, 0CuHpx, 0.4CuHpx e 2.0CuHpx.

No músculo branco, Tabela 16, houve interação cobre e OD na concentração de HP ($p < 0,001$) com aumento na concentração de HP em resposta à associação dos fatores. As atividades das DAs apresentaram mesmo padrão de resposta frente aos níveis de cobre em normóxia e hipóxia. Na comparação com os peixes do grupo controle a concentração de HP foi maior nos peixes dos grupos 0.4Cu, 2.0Cu, 0CuHpx, 0.4CuHpx e 2.0CuHpx. A atividade da SOD aumentou nos peixes dos grupos 2.0Cu e 2.0CuHpx.

A fim de verificarmos possíveis variações na R_{px} e R_{EO} , decorrentes da associação do cobre e hipóxia estas razões foram realizadas no fígado, músculo vermelho e músculo branco (Tabela 17 e 18).

Tabela 17. Razão R_{px} (GSH-Px/CAT) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao grupo 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia) e 2.0CuHpx (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia) por 48 horas.

| | fígado | m. vermelho | m. branco |
|----------|--------|-------------|-----------|
| 0CuHpx | 9 | 109 | 456 |
| 0.4CuHpx | 9 | 70 | 858 |
| 2.0CuHpx | 15 | 503 | 413 |

Tabela 18. Razão R_{EO} (HP/(GSH-Px+CAT)) no fígado, músculo vermelho e músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto ao grupo 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia) e 2.0CuHpx (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia) por 48 horas.

| | Fígado | m. vermelho | m. branco |
|----------|--------|-------------|-----------|
| 0CuHpx | 26 | 21 | 6 |
| 0.4CuHpx | 33 | 30 | 7 |
| 2.0CuHpx | 11 | 9 | 5 |

b. Intermediários metabólicos

Observando a Tabela 19, verificamos que houve interação entre cobre e OD na concentração de glicose ($p < 0,001$), lactato ($p = 0,005$), piruvato ($p = 0,009$) e amônia ($p < 0,001$), pois os peixes expostos aos fatores associados apresentaram padrões de resposta diferentes dos expostos aos fatores isolados. Não houve efeito de interação cobre e OD na concentração plasmática de proteína ($p = 0,648$). Comparado aos peixes do grupo controle, a concentração de glicose no plasma foi maior nos peixes do grupo 2.0CuHpx. A concentração de lactato e amônia plasmática foram menores nos peixes do grupo 0CuHpx e maiores nos peixes do grupo 2.0CuHpx e a concentração de piruvato foi maior nos do grupo 2.0Cu.

c. Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e concentração de Metalotionina branquial

A Tabela 20 apresenta os dados das variações de Na⁺/K⁺-ATPase branquial em decorrência da exposição a diferentes concentrações de cobre em normóxia e hipóxia. Observa-se que houve interação OD e cobre na atividade desta enzima ($p = 0,003$), havendo diferença na intensidade de resposta frente aos níveis de cobre em normóxia e hipóxia. Não houve interação entre os fatores cobre e OD na concentração de MT branquial ($p = 0,141$). Não houve efeito do OD ($p = 0,110$) e houve efeito do fator cobre ($p < 0,001$), evidenciando que as diferenças na concentração da MT são decorrentes, exclusivamente, da influência dos níveis de cobre adicionados na água dos aquários experimentais. Na comparação com os peixes do grupo controle a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial foi maior nos peixes do grupo 0CuHpx e menor nos do grupo 2.0CuHpx. A concentração de MT foi maior nos peixes dos grupos 0.4Cu, 2.0Cu, 0.4CuHpx e 2.0CuHpx.

d. Concentração de cobre plasmático [Cu_p] e pH sanguíneo

As diferenças no [Cu_p] foram decorrentes da interação cobre e OD ($p = 0,033$) havendo diferença nas concentrações em resposta aos níveis de cobre em normóxia e hipóxia (Tabela 20). Verificou-se maior [Cu_p] nos peixes expostos aos fatores associados. Houve interação cobre e OD no pH_{sg} ($p < 0,001$), ocorrendo diferenças no padrão de resposta nos três níveis nas duas condições de OD. Na comparação com os peixes do grupo controle a [Cu_p] foi maior nos peixes dos grupos 0.4Cu, 0.4CuHpx e 2.0CuHpx. O pH_{sg} foi menor nos peixes dos grupos 2.0Cu, 0CuHpx e 0.4CuHpx.

e. Parâmetros Hematológicos

A Tabela 21 nos permite avaliar os efeitos principais de cada fator e os efeitos das interações cobre e OD na hematologia dos peixes. Os fatores cobre e OD tiveram interação positiva no comportamento do Eri ($p = 0,001$), no Htc ($p = 0,003$), Hb ($p < 0,001$) e CHCM ($p = 0,014$), apresentando diferentes parâmetros hematológicos nos peixes expostos ao incremento de cobre aquático nas condições de normóxia e hipóxia. Comparado aos peixes do grupo controle o Eri foi maior nos peixes dos grupos 0.4Cu, 0CuHpx e 0.4CuHpx. A Hb foi maior nos peixes dos grupos 2.0Cu e 0.4CuHpx. O Htc foi maior nos peixes do grupo

0CuHpx. O CHCM foi maior nos peixes dos grupos 2.0Cu, 0.4CuHpx e 2.0CuHpx. O VCM foi menor nos grupos 2.0Cu e 2.0CuHpx.

Tabela 14. HP (nmol.g tecido⁻¹), SOD (USOD.mg proteína⁻¹), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) e CAT (nmol.mg proteína⁻¹) no fígado de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia) por 48 horas. Valores são média ± DP.

| | cobre | HP (nmol.g tecido ⁻¹) | n | SOD USOD.mgPT ⁻¹ | n | GSH-Px nmol.mgPT ⁻¹ | n | CAT nmol.mgPT ⁻¹ | n |
|------------------------|-------|--------------------------------------|---|--------------------------------|---|-----------------------------------|---|--------------------------------|----|
| normóxia | 0 | 353,69±23,88 ^{bA} | 6 | 139,30±37,03 ^{aA} | 5 | 16,50±3,19 ^{aB} | 7 | 1,678±0,19 ^{bB} | 4 |
| normóxia | 0.4 | 396,37±27,68 ^{cA*} | 9 | 194,91±18,83 ^{bA*} | 9 | 13,67±2,28 ^{aA} | 9 | 1,177±0,13 ^{aA} | 8 |
| normóxia | 2.0 | 283,09±17,32 ^{aA*} | 6 | 191,51±50,78 ^{bA*} | 6 | 17,65±6,37 ^{aA} | 6 | 2,204±0,77 ^{cB} | 5 |
| hipóxia | 0 | 327,83±35,01 ^{aA} | 8 | 129,67±26,08 ^{aA} | 8 | 11,15±4,35 ^{aA} | 7 | 1,307±0,27 ^{aA*} | 19 |
| hipóxia | 0.4 | 406,70±37,93 ^{bA*} | 6 | 197,37±15,72 ^{bA*} | 7 | 11,19±1,99 ^{aA} | 6 | 1,242±0,18 ^{aA} | 7 |
| hipóxia | 2.0 | 315,55±27,21 ^{aA} | 6 | 419,91±43,16 ^{cB*} | 5 | 26,37±5,13 ^{bA} | 6 | 1,801±0,26 ^{bA} | 6 |
| Efeito OD ¹ | | p = 0,546 | | p < 0,001 | | p = 0,728 | | p = 0,007 | |
| normóxia | | 344,38 | | 175,24 ^a | | 15,79 | | 1,686 ^b | |
| hipóxia | | 350,03 | | 248,98 ^b | | 16,24 | | 1,449 ^a | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | |
| 0 | | 340,76 ^b | | 134,49 ^a | | 13,60 ^a | | 1,492 ^b | |
| 0.4 | | 401,54 ^c | | 196,14 ^b | | 12,43 ^a | | 1,209 ^a | |
| 2.0 | | 299,32 ^a | | 305,71 ^c | | 22,01 ^b | | 2,002 ^c | |
| Cu x OD ³ | | p = 0,049 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p = 0,043 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de oxigênio dissolvido, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de oxigênio dissolvido.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator oxigênio dissolvido; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator oxigênio dissolvido e cobre.

Tabela 15. HP (nmol.g tecido⁻¹), SOD (USOD.mg proteína⁻¹), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) e CAT (nmol.mg proteína⁻¹) no músculo vermelho de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia) por 48 horas. Valores são média ± DP.

| | cobre | HP (nmol.g tecido ⁻¹) | n | SOD USOD.mgPT ⁻¹ | n | GSH-Px nmol.mgPT ⁻¹ | n | CAT nmol.mgPT ⁻¹ | n |
|------------------------|-------|--------------------------------------|---|--------------------------------|---|-----------------------------------|---|--------------------------------|----|
| normóxia | 0 | 255,57±17,40 ^{bA} | 7 | 459,99±39,06 ^{bB} | 7 | 16,65±7,92 ^{aA} | 6 | 0,237±0,09 ^{cB} | 7 |
| normóxia | 0.4 | 240,59±7,69 ^{bA} | 9 | 429,50±37,52 ^{bB} | 8 | 13,44±2,72 ^{aA} | 8 | 0,144±0,02 ^{bA*} | 9 |
| normóxia | 2.0 | 204,21±14,85 ^{aA*} | 6 | 242,36±41,66 ^{aA*} | 6 | 42,47±6,32 ^{bB*} | 6 | 0,068±0,03 ^{aA*} | 5 |
| hipóxia | 0 | 245,51±24,51 ^{bA} | 6 | 244,49±36,93 ^{bA*} | 8 | 11,59±3,30 ^{aA} | 7 | 0,106±0,05 ^{abA*} | 17 |
| hipóxia | 0.4 | 296,45±19,18 ^{cB*} | 6 | 183,45±45,12 ^{aA*} | 7 | 9,81±3,64 ^{aA} | 6 | 0,140±0,03 ^{bA*} | 7 |
| hipóxia | 2.0 | 208,30±12,14 ^{aA*} | 6 | 325,40±68,86 ^{cB*} | 6 | 26,63±7,64 ^{bA*} | 6 | 0,048±0,02 ^{aA*} | 6 |
| Efeito OD ¹ | | p = 0,003 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p = 0,003 | |
| normóxia | | 233,45 a | | 377,28 b | | 24,19 b | | 0,150 b | |
| hipóxia | | 250,09 b | | 251,11 a | | 16,00 a | | 0,098 a | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | |
| 0 | | 250,53 b | | 352,24 b | | 14,11 a | | 0,172 b | |
| 0.4 | | 268,52 c | | 306,47 a | | 11,62 a | | 0,142 b | |
| 2.0 | | 206,26 a | | 283,88 a | | 34,55 b | | 0,058 a | |
| Cu x OD ³ | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,019 | | p = 0,002 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de oxigênio dissolvido, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de oxigênio dissolvido.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator oxigênio dissolvido; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator oxigênio dissolvido e cobre.

Tabela 16. HP (nmol.g tecido⁻¹), SOD (USOD.mg proteína⁻¹), GSH-Px (nmol.mg proteína⁻¹) e CAT (nmol.mg proteína⁻¹) no músculo branco de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia) por 48 horas. Valores são média ± DP.

| | cobre | HP (nmol.g tecido ⁻¹) | n | SOD USOD.mgPT ⁻¹ | n | GSH-Px nmol.mgPT ⁻¹ | n | CAT nmol.mgPT ⁻¹ | n |
|------------------------|-------|--------------------------------------|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|---|
| normóxia | 0 | 100,34±4,31 ^{aA} | 7 | 235,27±64,58 | 7 | 35,00±12,38 | 4 | 0,066±0,02 | 6 |
| normóxia | 0.4 | 190,27±12,10 ^{bA*} | 8 | 168,12±35,32 | 9 | 24,12±6,20 | 9 | 0,033±0,01* | 9 |
| normóxia | 2.0 | 186,59±5,85 ^{bA*} | 6 | 338,94±36,18* | 6 | 26,04±7,41 | 6 | 0,068±0,02 | 5 |
| hipóxia | 0 | 187,34±19,41 ^{aB*} | 16 | 241,96±68,56 | 17 | 33,88±10,61 | 14 | 0,074±0,04 | 8 |
| hipóxia | 0.4 | 189,99±8,82 ^{aA*} | 7 | 185,13±37,52 | 7 | 28,35±7,20 | 7 | 0,033±0,02 | 6 |
| hipóxia | 2.0 | 182,48±5,73 ^{aA*} | 6 | 327,05±56,91* | 6 | 33,98±6,90 | 6 | 0,082±0,04 | 8 |
| Efeito OD ¹ | | p < 0,01 | | p = 0,812 | | p = 0,180 | | p = 0,478 | |
| normóxia | | 159,07 ^a | | 247,44 | | 28,39 | | 0,056 | |
| hipóxia | | 186,61 ^b | | 251,38 | | 32,07 | | 0,063 | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p = 0,038 | | p = 0,003 | |
| 0 | | 143,84 ^a | | 238,61 ^b | | 34,44 ^b | | 0,070 ^b | |
| 0.4 | | 190,13 ^b | | 176,63 ^a | | 26,23 ^a | | 0,033 ^a | |
| 2.0 | | 184,54 ^b | | 332,99 ^c | | 30,01 ^{ab} | | 0,075 ^b | |
| Cu x OD ³ | | p < 0,001 | | p = 0,793 | | p = 0,388 | | p = 0,840 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de oxigênio dissolvido, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de oxigênio dissolvido.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator oxigênio dissolvido; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator oxigênio dissolvido e cobre.

Tabela 19. Concentrações plasmáticas de glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), amônia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) e proteína (mg.mL^{-1}) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L^{-1} de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L^{-1} de cobre), 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L^{-1} de cobre, hipóxia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L^{-1} de cobre, hipóxia) por 48 horas. Valores são média \pm DP.

| | cobre | Glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Lactato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Piruvato ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Amônia ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | n | Proteína (mg.mL^{-1}) | n |
|------------------------|-------|----------------------------------------|----|----------------------------------------|----|-----------------------------------------|----|---------------------------------------|----|-------------------------------------|----|
| normóxia | 0 | 1,23 \pm 0,04 ^{aA} | 5 | 1,28 \pm 0,10 ^{aB} | 5 | 0,130 \pm 0,01 ^{aB} | 5 | 0,230 \pm 0,01 ^{aA} | 5 | 9,09 \pm 0,32 | 5 |
| normóxia | 0.4 | 1,17 \pm 0,33 ^{aA} | 7 | 1,27 \pm 0,44 ^{aA} | 7 | 0,140 \pm 0,03 ^{aB} | 7 | 0,214 \pm 0,04 ^{aA} | 7 | 9,02 \pm 1,74 | 6 |
| normóxia | 2.0 | 1,29 \pm 0,22 ^{aA} | 6 | 1,68 \pm 0,26 ^{aA} | 5 | 0,218 \pm 0,02 ^{bB*} | 5 | 0,260 \pm 0,03 ^{aA} | 5 | 8,75 \pm 1,43 | 6 |
| hipóxia | 0 | 1,00 \pm 0,17 ^{aA} | 18 | 0,75 \pm 0,22 ^{aA*} | 15 | 0,102 \pm 0,02 ^{aA} | 16 | 0,123 \pm 0,03 ^{aB*} | 15 | 8,29 \pm 1,48 | 17 |
| hipóxia | 0.4 | 1,16 \pm 0,26 ^{aA} | 6 | 1,60 \pm 0,23 ^{bA} | 5 | 0,108 \pm 0,04 ^{aA} | 6 | 0,194 \pm 0,03 ^{bA} | 5 | 7,54 \pm 1,44 | 5 |
| hipóxia | 2.0 | 1,87 \pm 0,32 ^{bB*} | 6 | 1,91 \pm 0,63 ^{bA*} | 6 | 0,130 \pm 0,01 ^{aA} | 6 | 0,322 \pm 0,11 ^{cA*} | 6 | 8,34 \pm 1,16 | 7 |
| Efeito OD ¹ | | p = 0,137 | | p = 0,933 | | p < 0,001 | | p = 0,201 | | p = 0,052 | |
| normóxia | | 1,23 | | 1,41 | | 0,163 ^b | | 0,235 | | 8,95 | |
| hipóxia | | 1,34 | | 1,42 | | 0,113 ^a | | 0,213 | | 8,06 | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p = 0,760 | |
| 0 | | 1,11 ^a | | 1,01 ^a | | 0,116 ^a | | 0,176 | | 9,09 | |
| 0.4 | | 1,16 ^a | | 1,44 ^b | | 0,124 ^a | | 0,204 | | 8,69 | |
| 2.0 | | 1,58 ^b | | 1,79 ^c | | 0,174 ^b | | 0,299 | | 8,28 | |
| Cu x OD ³ | | p < 0,001 | | p = 0,005 | | p = 0,009 | | p < 0,001 | | p = 0,648 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de oxigênio dissolvido, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de oxigênio dissolvido.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator oxigênio dissolvido; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator oxigênio dissolvido e cobre.

Tabela 20. Na⁺/K⁺-ATPase ($\mu\text{M Pi.mg proteína}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), Metalotionina (MT.g^{-1} tecido), [Cu_p] ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e pH sanguíneo de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L⁻¹ de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L⁻¹ de cobre), 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L⁻¹ de cobre, hipóxia) por 48 horas. Valores são média \pm DP.

| | cobre | Na ⁺ /K ⁺ - ATPase ($\mu\text{M Pi.mg prot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) | n | Metalotionina (MT.g^{-1} tecido) | n | [Cu _p] ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | n | pH _{sg} | n |
|------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------|----|------------------------------------------------|----|---------------------------------|----|
| normóxia | 0 | 1,28 \pm 0,44 ^{aA} | 10 | 1,06 \pm 0,12 | 6 | 175,43 \pm 27,90 ^{aA} | 7 | 7,70 \pm 0,18 ^{bB} | 9 |
| normóxia | 0.4 | 0,83 \pm 0,25 ^{aA} | 10 | 1,95 \pm 0,90* | 9 | 430,60 \pm 173,07 ^{bA*} | 10 | 7,81 \pm 0,07 ^{bB} | 10 |
| normóxia | 2.0 | 0,76 \pm 0,30 ^{aA} | 6 | 4,42 \pm 0,36* | 5 | 173,12 \pm 24,27 ^{aA} | 8 | 7,43 \pm 0,12 ^{aA*} | 10 |
| hipóxia | 0 | 2,12 \pm 0,58 ^{bB*} | 20 | 1,00 \pm 0,44 | 20 | 258,14 \pm 106,06 ^{aA} | 7 | 7,56 \pm 0,12 ^{abA*} | 29 |
| hipóxia | 0.4 | 0,90 \pm 0,22 ^{aA} | 10 | 2,59 \pm 0,54* | 10 | 553,60 \pm 98,82 ^{bB*} | 5 | 7,48 \pm 0,15 ^{aA*} | 10 |
| hipóxia | 2.0 | 0,68 \pm 0,34 ^{aA*} | 10 | 4,62 \pm 0,35* | 5 | 466,80 \pm 23,44 ^{bB*} | 5 | 7,65 \pm 0,04 ^{bB} | 10 |
| Efeito OD ¹ | | p = 0,024 | | p = 0,110 | | p < 0,001 | | p = 0,007 | |
| normóxia | | 0,96 ^a | | 2,48 | | 259,72 ^a | | 7,65 ^b | |
| hipóxia | | 1,23 ^b | | 2,80 | | 426,18 ^b | | 7,56 ^a | |
| Efeito Cu ² | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p < 0,001 | | p = 0,016 | |
| 0 | | 1,70 ^b | | 1,03 ^a | | 216,78 ^a | | 7,63 ^b | |
| 0.4 | | 0,86 ^a | | 2,27 ^b | | 492,10 ^c | | 7,64 ^b | |
| 2.0 | | 0,72 ^a | | 4,52 ^c | | 319,96 ^b | | 7,54 ^a | |
| Cu x OD ³ | | p = 0,003 | | p = 0,141 | | p = 0,033 | | p < 0,001 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de oxigênio dissolvido, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de oxigênio dissolvido.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator oxigênio dissolvido; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator oxigênio dissolvido e cobre.

Tabela 21. Eri ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), Htc (%), Hb (g.dL^{-1}), CHCM (%) e VCM (fL) de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, exposto a 0Cu controle (sem adição de cobre), 0.4Cu (0.4 mg.L^{-1} de cobre), 2.0Cu (2.0 mg.L^{-1} de cobre), 0CuHpx (sem adição de cobre, hipóxia), 0.4CuHpx (0.4 mg.L^{-1} de cobre, hipóxia), e 2.0CuHpx (2.0 mg.L^{-1} de cobre, hipóxia) por 48 horas. Valores são média \pm DP.

| | cobre | Eri ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) | n | Htc (%) | n | Hb (g.dL^{-1}) | n | CHCM (%) | n | VCM (fL) | n |
|------------------------|-------|-------------------------------------------|----|---------------------------------|----|---------------------------------|----|---------------------------------|----|----------------------|----|
| normóxia | 0 | 1,55 \pm 0,34 ^{aA} | 10 | 33,60 \pm 2,77 ^{abA} | 10 | 7,88 \pm 1,27 ^{aA} | 10 | 23,64 \pm 4,53 ^{aA} | 10 | 225,64 \pm 49,66 | 10 |
| normóxia | 0.4 | 2,01 \pm 0,32 ^{ba*} | 10 | 38,10 \pm 8,70 ^{ba} | 10 | 9,21 \pm 1,56 ^{aA} | 10 | 25,06 \pm 5,82 ^{aA} | 10 | 193,81 \pm 55,37 | 10 |
| normóxia | 2.0 | 1,88 \pm 0,13 ^{ba} | 10 | 32,31 \pm 2,95 ^{ab} | 10 | 11,61 \pm 1,54 ^{bb*} | 10 | 36,07 \pm 4,49 ^{bb*} | 10 | 172,73 \pm 20,90* | 10 |
| hipóxia | 0 | 2,18 \pm 0,24 ^{bb*} | 10 | 39,60 \pm 3,96 ^{aA*} | 10 | 9,47 \pm 2,03 ^{ab} | 10 | 23,93 \pm 4,30 ^{ba} | 10 | 184,35 \pm 34,58 | 10 |
| hipóxia | 0.4 | 1,95 \pm 0,40 ^{abA*} | 10 | 34,55 \pm 1,30 ^{aA} | 10 | 10,21 \pm 1,77 ^{aA*} | 10 | 29,51 \pm 4,69 ^{ab*} | 10 | 182,46 \pm 29,52 | 10 |
| hipóxia | 2.0 | 1,72 \pm 0,34 ^{aA} | 9 | 29,00 \pm 5,53 ^{ba} | 10 | 8,91 \pm 1,20 ^{aA} | 10 | 31,33 \pm 4,73 ^{aA*} | 10 | 161,98 \pm 16,18* | 8 |
| Efeito OD ¹ | | p = 0,090 | | p = 0,819 | | p = 931 | | p = 1,0 | | p = 0,039 | |
| normóxia | | 1,81 | | 34,67 | | 9,57 | | 28,26 | | 197,39 ^b | |
| hipóxia | | 1,95 | | 34,38 | | 9,53 | | 28,26 | | 176,26 ^a | |
| Efeito Cu ² | | p = 0,188 | | p < 0,001 | | p = 0,009 | | p < 0,001 | | p = 0,014 | |
| 0 | | 1,86 | | 36,60 ^b | | 8,68 ^a | | 23,79 ^a | | 204,99 ^b | |
| 0.4 | | 1,98 | | 36,32 ^b | | 9,71 ^{ab} | | 27,28 ^a | | 188,13 ^{ab} | |
| 2.0 | | 1,80 | | 30,65 ^a | | 10,26 ^b | | 33,70 ^b | | 167,36 ^a | |
| Cu x OD ³ | | p < 0,001 | | p = 0,003 | | p < 0,001 | | p = 0,014 | | p = 0,359 | |

Letras minúsculas diferem grupos em mesma condição de oxigênio dissolvido, diferentes níveis de cobre.

Letras maiúsculas diferem os grupos expostos às mesmas concentrações de cobre em diferentes condições de oxigênio dissolvido.

Letras iguais e ausência de letra não diferem os grupos.

* Difere os grupos experimentais contra o grupo controle (teste Dunnet; p < 0,05).

¹ Valores de p para o fator oxigênio dissolvido; ² Valores de p para o fator cobre; ³ Valores de p para interação entre fator oxigênio dissolvido e cobre.

8. DISCUSSÃO

8.1 Avaliação dos efeitos simples dos fatores

8.1.1 efeitos do incremento do cobre aquático em pH neutro e normóxia

a. Metabolismo oxidativo

As EROs são produzidas em todos os organismos aeróbicos e ocorrem normalmente nas células. Quando produzidas em equilíbrio, reagem com os mecanismos de DAs. Caso este ténue equilíbrio seja rompido devido à redução das DAs, ou por acúmulo excessivo de EROs, ou ambos, é caracterizado o estresse oxidativo (EO). A determinação de danos oxidativos em tecidos expostos ao EO é de difícil avaliação por meio de determinações diretas de alterações oxidativas (Halliwell e Grotveld, 1987). A formação de hidroperóxidos de lipídeo (HP) tem sido proposta como principal agente causador de danos celulares em resposta ao aumento de EROs (Halliwell e Gutteridge, 1989). No presente estudo, os danos teciduais relacionados ao estresse oxidativo foram mensurados pela formação de HP por meio da reação de FOX. Este método é sensível à formação de HP produzido pela oxidação do Fe^{2+} na presença de alaranjado de xilenol (Jiang et al., 1991). A formação de EROs pode ser acelerada por várias condições de estresse ambiental, incluindo a exposição a herbicidas, metais e xenobióticos (Winston e DiGiulio, 1991; Scandalios, 2005). Parte significativa da toxicidade do cobre resulta da habilidade em aceitar ou doar elétrons, modificando seu estado oxidativo, catalisando a produção de EROs como o $\bullet OH$ na reação de Fenton (Harris e Gitlin 1996; Winzerling e Low 1997).

Avaliando o metabolismo oxidativo hepático dos peixes (Figura 5) expostos ao grupo 0.4Cu, verificamos que, comparados aos peixes do grupo controle, houve aumento da concentração de HP e da atividade da SOD. Estes dados mostram a possível influência do cobre no aumento do HP hepático e do estímulo deste metal na atividade da SOD por ser uma enzima cobre dependente (Yim et al., 1993). Por outro lado, verificamos que a CAT diminuiu significativamente nesta mesma comparação e que não houve diferença na atividade da GSH-Px. A diminuição ou a baixa atividade destas enzimas pode justificar as altas concentrações de HP no fígado, uma vez que as enzimas não intermediaram o processo oxidativo, permitindo a peroxidação, caracterizando EO, pois as atividades da CAT e GSH-Px não foram efetivas em combater o H_2O_2 produzido em excesso pelo aumento da atividade da SOD. A CAT decompõe o H_2O_2 formado durante o estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1989). Em animais quimicamente estressados, o aumento ou diminuição da atividade da CAT é possível

dependendo da natureza do químico, tempo e dose de exposição (Jemec et al., 2008). A CAT é uma das enzimas catalíticas mais efetivas na natureza e decompõe o H_2O_2 rapidamente. Tem sido proposto que a CAT pode ser exclusivamente apropriada para regular a homeostase do H_2O_2 na célula. Neste modelo catalítico, a CAT tem uma alta constante de Michaelis e, portanto, não é facilmente saturada com o substrato. Assim, a atividade da enzima aumenta linearmente sobre uma extensa variação de concentração de H_2O_2 . Se sua atividade for inibida, a concentração de H_2O_2 aumenta no fígado (Scandalios, 2005).

O efeito de tóxicos sobre atividade enzimática é um dos parâmetros bioquímicos mais importantes afetados durante situações de estresse. Quando o organismo está sob efeito de uma substância tóxica as atividades enzimáticas parecem ser elevadas ou podem até ser inibidas. O aumento ou diminuição nos seus níveis pode ser suficiente para prover informações de diagnóstico (Valarmathi e Azariah, 2003). A SOD é a enzima que destoxifica os ânions de radicais superóxido (Borković et al., 2005). A CAT, uma importante enzima do sistema de DA, é a principal enzima que trabalha para catalisar a decomposição de H_2O_2 em H_2O , compartilhando esta função com a GSH-Px. Na presença de baixos níveis de H_2O_2 , os peróxidos são os substratos preferenciais da GSH-Px, mas em altas concentrações de H_2O_2 , eles são metabolizados pela CAT (Yu, 1994). Sabe-se que qualquer aumento significativo na atividade da SOD pode ser acompanhado por um aumento de atividade da CAT e/ou GSH-Px (Warner, 1994).

A exposição dos peixes a concentrações mais elevadas de cobre, como no grupo 2.0Cu, causou diminuição na concentração hepática de HP. A SOD neste grupo de peixes também foi elevada em resposta ao aumento de cobre aquático, confirmando o estímulo do cobre na atividade desta enzima no fígado, conforme constatado anteriormente por Sanchez et al. (2005). Os peixes do grupo 2.0Cu apresentaram aumento na atividade hepática da CAT. Houve uma variabilidade da resposta frente aos diferentes níveis de cobre neste estudo avaliados. A toxicidade do cobre inicialmente afeta o fígado, por ser este o primeiro local de deposição deste metal depois de entrar na corrente sanguínea (Kadiiska et al., 1993; Gaetke e Chow, 2003). A interação de xenobióticos com vários sistemas enzimáticos, incluindo as enzimas de destoxificação, tem sido descrita por aumentar a formação de EROs (Machala et al., 1997). DAs, incluindo a CAT, são induzidas por condições que aumentem o fluxo de EROs (Di Giulio et al., 1993). Aumento na atividade hepática da CAT foi observado em peixes de ambientes poluídos (Livingstone et al., 1995; Wilhelm Filho et al., 2001). Verificamos que as

concentrações de cobre às quais o pacu foi exposto, por 48 h, não alteraram a atividade da GSH-Px hepática.

Os mecanismos oxidativos no músculo vermelho parecem se comportar de maneira diferente do fígado em resposta ao cobre (Figura 6). Nos pacus do grupo 0.4Cu somente a atividade da CAT neste tecido foi alterada, demonstrando que, mesmo sendo um tecido altamente oxidativo, esta concentração de cobre não alterou o status oxidativo. A diminuição da atividade da CAT parece ser um processo inibitório do cobre na atividade desta enzima. De acordo com Taylor et al. (1988), o cobre pode inibir a atividade da CAT em ratos.

A SOD é uma metaloenzima que possui papel chave na defesa contra EROs, através da transformação de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio (Yim et al., 1993). Para compreender a relação entre a concentração de HP e o estímulo aos mecanismos de defesa, verificamos que, a SOD do músculo vermelho foi inibida nos peixes expostos a 2.0Cu. Existem relatos de indução e inibição das DAs pelo cobre, dependendo da dose, da espécie e/ou da via de exposição (Sanchez et al., 2005). A inibição da SOD foi descrita em carpas após 48 h de exposição de cobre por injeção intra-peritoneal (Varanka et al., 2001), enquanto esta enzima foi rapidamente induzida em “gilthead seabream”, *Sparus aurata*, exposto ao cobre aquático (Pedrajas et al., 1995).

Ainda no músculo vermelho, houve estímulo da GSH-Px no grupo 2.0Cu entretanto a CAT foi inibida em decorrência do incremento de cobre aquático. A capacidade de atuação da GSH-Px caracteriza esta enzima como importante protetor tecidual contra os danos oxidativos da peroxidação (Fehér et al., 1987). Os níveis de GSH-Px podem aumentar nas células de peixes expostos ao cobre (Freedman et al., 1989). Baixos níveis de H₂O₂ são os substratos preferenciais da GSH-Px mas, em altas concentrações de H₂O₂, eles são metabolizados pela CAT (Yu, 1994). Assim, os dados do presente estudo demonstram que os altos níveis de cobre utilizados no grupo 2.0Cu inibiram a SOD e que as concentrações baixas de H₂O₂ permitiram maior atividade da GSH-Px. As DAs atuam como mecanismos de defesa contra ambientes oxidantes, permitindo a adaptação a novas condições. Rodriguez-Ariza et al. (1993) também verificaram maior atividade da GSH-Px em *Mugil sp.* coletada de áreas poluídas. Sabe-se que a GSH-Px previne a peroxidação lipídica em peixes (Steadman et al., 1991). Winston e Di Giulio (1991) acreditam que aumentos da atividade da GSH-Px protegem o organismo da peroxidação lipídica.

No músculo branco houve aumento na concentração de HP na exposição aos grupos 0.4Cu e 2.0Cu (Figura 7). A SOD foi inibida no músculo branco dos peixes do grupo 0.4Cu. A

atividade das enzimas peroxidases GSH-Px e CAT no músculo branco não foi suficiente para prevenir os danos oxidativos. A GSH-Px foi semelhante nos peixes dos diferentes grupos experimentais e a CAT foi inibida nos peixes expostos a 0.4Cu. O músculo branco, apesar de menos oxidativo, justificado pelas menores concentrações de HP nele determinados, não apresentou mecanismos de defesa suficientes no combate às EROs formadas após exposição ao cobre, permitindo o aumento da concentração de HP neste tecido.

Existe uma relação interessante entre a GSH-Px e CAT, visto que as duas são peroxidase e competem pelo mesmo substrato para combater o estresse oxidativo. Porém, a razão entre elas depende diretamente dos fatores ambientais nos quais o animal foi exposto e com a produção do substrato no tecido avaliado. Com o intuito de avaliar o comportamento tecido-específico e a razão existente entre estes dois mecanismos de defesa, foram avaliados as R_{px} de cada tecido (Tabela 2). Enquanto a atividade da GSH-Px foi fígado < músculo vermelho < músculo branco, a atividade da CAT é fígado > músculo vermelho > músculo branco, mostrando clara relação entre estas enzimas. O principal fator da existência desta relação é o fato de estas enzimas competirem pelo mesmo substrato e apresentarem K_m diferentes. Diferenças entre tecidos já foram relatadas por Wdzieczak et al. (1982), Radie et al. (1985a; 1985b), Wilhelm Filho et al. (1993) e Otto e Moon (1996). Tem sido descrito que o fígado e os eritrócitos normalmente apresentam maiores atividades das DAs, o que pode ser devido às altas taxas de EROs produzidas nestes tecidos (Mazeaud et al., 1979). Avaliando-se o R_{px} do fígado do pacu nota-se um equilíbrio entre as peroxidases, o que leva a menores valores nesta razão. Os aumentos no músculo vermelho e músculo branco foram decorrentes, principalmente, da diminuição da atividade da CAT nas diferentes condições experimentais. Isto demonstra que a CAT responde de forma mais pronunciada às adversidades impostas, provavelmente justificada por seu baixo K_m (Scandalios, 2005), agindo somente em altas concentrações de substrato.

Outra ferramenta que nos permite avaliar o metabolismo oxidativo de forma mais correlacionada é a relação entre a concentração de HP e a atuação das peroxidases. Avaliando a R_{EO} dos grupos expostos ao incremento de cobre (Tabela 3), verificamos que existem diferentes razões entre os tecidos. A R_{EO} diminui do fígado para o músculo vermelho e deste para o músculo branco. Uma vez que a R_{EO} faz a razão entre a concentração de HP e a atividade das peroxidases, o tecido com maior razão entre estes parâmetros provavelmente é o mais oxidativo. Isto nos permite concluir que existe tênue diferença oxidativa entre o fígado e músculo vermelho e que estes tecidos são mais oxidativos que o músculo branco, pois a concentração de HP nos dois primeiros foi maior. Notamos que, quanto mais oxidativo for o

tecido, maior a atividade da CAT e menor a da GSH-Px, confirmando os achados de Scandalios (2005). Aksne e Njaa (1981), em diversas espécies de peixes, encontraram maior atividade da CAT no fígado do que em outros tecidos. Estes dados são sustentados por Atli et al. (2006), na tilápia do Nilo, por Hidalgo et al. (2002) para truta arco-íris e Gül et al. (2004) para os ciprinídeos.

b. Intermediários metabólicos

Os valores dos intermediários metabólicos no presente trabalho estão quantitativamente de acordo com os de Moraes et al. (1997b) e Panepucci et al. (2001) para a mesma espécie e mantidas em condições de laboratório semelhantes. De acordo com Heath (1995), a exposição ao cobre causa mobilização do glicogênio no fígado aumentando a glicemia. Quando comparados aos peixes do grupo controle (Tabela 4), pacus expostos a 0.4Cu não mostraram diferenças nas concentrações plasmáticas de glicose, lactato, piruvato, amônia e proteína, evidenciando que não houve estímulo aos mecanismos de redução ou aumento do metabolismo glicolítico para sobreviver na concentração de 0.4Cu. Dethloff et al. (1999) expuseram truta arco íris à concentração de 16 $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ e também não verificaram alterações nas concentrações de glicose e lactato plasmáticos. Griffin et al. (1999) não encontraram alterações nas concentrações de lactato plasmático de bagre do canal exposto ao cobre.

Por outro lado, os peixes do grupo 2.0Cu apresentaram aumento significativo na concentração plasmática de piruvato. Este aumento, apesar de não acompanhado por elevação da glicose plasmática, pode ter ocorrido como mecanismo de aumento na via glicolítica aeróbica, uma vez que não houve alterações nas concentrações de lactato. McKim et al. (1970) e Christensen et al. (1972) não verificaram alterações do metabolismo glicolítico quando avaliaram a exposição a concentrações baixas de cobre. Porém, modificações foram evidenciadas com o aumento nas concentrações de cobre aquático. No presente trabalho, verificamos que a menor concentração de cobre ao qual os peixes foram expostos não causou alterações no metabolismo glicolítico. Entretanto, a exposição à concentração 2.0Cu, por apresentar aumento significativo somente na concentração do piruvato plasmático, sugere um possível aumento no metabolismo glicolítico disponibilizando mais energia para os organismos, de modo a enfrentar as alterações no ambiente em que se encontram.

Pelgrom et al. (1995) expuseram a tilápia mossâmbica a níveis de cobre e somente na maior concentração deste metal houve diminuição do pH sanguíneo, sugerindo uma alteração

na regulação do equilíbrio ácido-base. Os dados desta pesquisa corroboram estes achados, pois o pH_{sg} dos peixes expostos a 0.4Cu foi semelhante ao do grupo controle, ao contrário dos expostos ao grupo 2.0Cu, que apresentaram pH_{sg} significativamente menor (Figura 9). Diminuições no pH do sangue podem resultar em queda do pH nas células vermelhas, interferindo na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e diminuindo a capacidade de transporte de oxigênio do sangue para os tecidos (Jobling, 1994).

c. Atividade da Na^+/K^+ -ATPase, concentração de Metalotionina branquial e $[\text{Cu}_p]$

Grande parte do cobre que entra pelas brânquias é transportado pelo plasma sangüíneo (Pelgrom et al., 1995). Carbonell e Tarazona (1994), estudando a toxicidade do cobre em truta arco-íris, concluíram que as concentrações plasmáticas do cobre atingem uma situação limite após poucas horas ou dias de exposição. Nos presente estudo, houve aumento significativo da $[\text{Cu}_p]$ nos peixes do grupo 0.4Cu e diminuição nos peixes expostos a 2.0Cu (Figura 9). Nossos dados mostram a influência do cobre aquático nas concentrações plasmáticas de cobre, evidenciando ainda que esta relação não é linear, de modo que as concentrações de cobre dissolvido não necessariamente correspondem às concentrações do cobre absorvido. Alguns autores verificaram que não há linearidade entre as concentrações de cobre na água e a bioconcentração deste metal nos tecidos de peixes (Segner e Branubeck, 1990; Paris-Palacios et al., 2000).

As brânquias são órgãos multifuncionais, responsáveis pela respiração, equilíbrio ácido-base, regulação iônica e osmótica, excreção de restos nitrogenados e metabolismo de hormônios circulantes. Devido ao fluxo contínuo de água através das brânquias e pela ampla superfície em contato com o ambiente externo, estes órgãos são particularmente sensíveis a mudanças físicas e químicas do ambiente aquático e são o principal alvo de poluentes carregados pela água (Mallatt, 1985; Sathe et al., 1997; Mazon et al., 2002a; Evans 2005). Sendo o primeiro contato com os contaminantes da água, as brânquias podem acumular altas concentrações de metais (Cogun et al., 2003). Acredita-se que a toxicidade aguda do cobre pode resultar em distúrbios na regulação iônica branquial (Wood, 2001; Grosell et al., 2002). O cobre também afeta a morfologia das brânquias, induzindo à necrose, hipertrofia, hiperplasia, espessamento do epitélio, vacuolização e hipersecreção de muco (Mazon et al., 2002a; Beaumont et al., 2003; Fernandes e Mazon, 2003). Este metal também estimula a proliferação de células cloreto na lamela secundária, via cortisol (Wendelaar Bonga, 1997). Estes efeitos

resultam em uma redução da efetividade da superfície respiratória e, conseqüentemente, na eficiência respiratória.

Elevadas concentrações de muco branquial em peixes durante a exposição a metais tem sido sugerida por apresentar importante papel no processo de destoxificação (Shephard, 1994; Handy et al., 2002). Compostos mucosos, em particular as glicoproteínas e os proteoglicanos, apresentam alta afinidade por metais pesados e podem se ligar ao cobre (Van de Winkel et al., 1986). Assim, o muco que recobre as brânquias pode, portanto, representar o primeiro mecanismo de defesa contra a exposição ao cobre (Dang et al., 1999). Entretanto, o espessamento da camada de muco que recobre as brânquias, associado com os danos morfológicos citados acima, aumenta a barreira sangue/água na lamela secundária, causando considerável redução da difusão do oxigênio para o sangue (Playle, 1998; Beaumont et al., 2003). Deste modo, um dos maiores efeitos tóxicos do contaminante pode ser a redução da capacidade das brânquias de desempenharem eficientemente suas funções de órgão de trocas gasosas. O pacu apresentou diversos mecanismos de defesa em resposta ao aumento de cobre no sentido de se evitar sua absorção, confirmando sua resistência à exposição ao cobre demonstrada pela sua alta CL50.

A diminuição da $[Cu_p]$ nos peixes expostos a 2.0Cu pode ainda estar relacionada com o aumento na concentração de MT. O potencial papel das MTs como biomarcadores em organismos aquáticos está especificamente envolvido na exposição a metais pesados, devendo as MTs serem consideradas potenciais biomarcadores (Viarengo et al., 1997). Citadas muitas vezes como primeiro sistema de defesa da célula contra metais (Olsvik et al., 2000; Bragigand e Berthet, 2003), a ação das MTs no tecido branquial de organismos aquáticos foi descrita e caracterizada por diversos pesquisadores (Roesijadi e Klerks, 1989; Viarengo et al., 1980; Mouneyrac et al., 1998). Dang et al. (1999) ressaltaram a importância da ação das MTs nas brânquias, prevenindo possíveis danos e distúrbios. Sua função também é descrita como antioxidante (Petering et al., 1990; Zhang e Schlenk, 1995), mas esta ação ainda vem sendo discutida pois a ligação Cu-MT é sensível às condições do meio (Fabisiak et al., 1999). Concentrações celulares de MT geralmente são baixas mas aumentam acentuadamente com a administração de cobre (Viarengo et al., 1985; Viarengo, 1989; Ringwood e Brouwer, 1993; Roesijadi, 1994). Benson et al. (1990) e Canli et al. (1997) concluem que estas proteínas são um potenciais indicador de estresse celular e de contaminação em exposição sub-letal a metais pesados.

No presente estudo, as MTs branquiais foram responsivas ao incremento de cobre aquático pois houve aumento da concentração destas proteínas nos peixes expostos a 0.4Cu e 2.0Cu, quando comparados aos do grupo controle (Figura 8). Diversos autores relataram situação semelhante à exposição ao cobre (Heath, 1995; Dang, 2000; Bragigand e Berthet; 2003; Ryu et al., 2003) descrevendo que este mecanismo faz parte de um sistema de defesa metabólico para aumentar a tolerância dos organismos aos efeitos tóxicos do cobre. As MTs seqüestram os metais atuando como mecanismo protetor por manter a concentração de metal livre extremamente baixa, modificando as alterações induzidas pelos metais (Heath, 1995; Mayer et al., 2003). Pelgrom et al. (1995), Li et al. (1998) e Dang et al. (1999) e observaram aumento na concentração de MT branquial em tilápia mossâmbica em resposta a exposição ao cobre. Os dados de concentração de MT encontrados no presente trabalho estão de acordo com os achados destes autores e evidenciam a importância das MTs como mecanismos de proteção aos peixes expostos a metais. Como citado na discussão da $[Cu_p]$, o aumento na MT branquial em resposta ao cobre ocorreu de forma mais intensa no grupo 2.0Cu do que no grupo 0.4Cu. Isto pode ter sido um fator decisivo para diminuição da absorção de cobre e sua concentração no plasma.

Nos peixes, o cobre pode causar diminuição nas concentrações plasmáticas de Na^+ e Cl^- devido à perda da função iônico reguladora das brânquias (Nussey et al., 1995; Pelgrom et al., 1995). Em baixas concentrações de cobre, a tomada de íons pode ser suprimida pela inibição da atividade $Na^+/K^+-ATPase$ (Li et al., 1998). No presente trabalho, ocorreu inibição da atividade da $Na^+/K^+-ATPase$ branquial nos peixes expostos a 0.4Cu e 2.0Cu (Figura 8), mostrando que os dois níveis de cobre adicionados na água foram suficientes para inibir a $Na^+/K^+-ATPase$ branquial. Segundo Grosell et al. (2002) a redução ocorre principalmente devido à capacidade de ligação do cobre aos sítios ativos da $Na^+/K^+-ATPase$, podendo inibir o transporte iônico nas brânquias ou outros órgãos envolvidos nos processos de osmorregulação. A inibição na atividade da $Na^+/K^+-ATPase$ branquial pela exposição ao cobre também foi descrita em tilápia mossâmbica e parece ocorrer devido à ligação covalente do cobre com os grupos tiol (Pelgrom et al., 1995).

Dang et al. (1999) sugerem que a presença de grandes quantidades de MT branquial podem estar relacionadas à proteção da $Na^+/K^+-ATPase$, ligando-se inicialmente ao cobre e dificultando a ligação do metal com elas, representando uma barreira de proteção nas brânquias. Os mecanismos de ação da MTs como protetoras da $Na^+/K^+-ATPase$ parecem não ter sido suficientes para combater os danos da exposição ao cobre, pois por outro lado, o maior

nível de cobre utilizado no presente trabalho, também foi suficiente para inibir a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. Como discutido anteriormente, houve, em resposta a esta alta concentração de cobre na água, grande produção de muco branquial. O grande acúmulo de cobre nas brânquias é normalmente associado a danos nestes tecidos, gerando também desorganização do seu funcionamento (Mallatt, 1985). A primeira ação do cobre nos peixes é o distúrbio no transporte de Na^+ nas brânquias (Laurén e McDonald, 1985; Pelgrom et al., 1995). Por outro lado, a diminuição da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ foi proporcional nos peixes dos dois grupos experimentais (0.4Cu e 2.0Cu), ou seja, independentemente do nível de cobre adicionado na água a inibição não foi maior. O íon cobre (Cu^{2+}) tem alta afinidade por grupos de cisteína (Laurén e McDonald, 1985) e assim pode exercer efeitos tóxicos pela da ligação com proteínas ricas em cisteínas como a $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (Li et al., 1998).

d. Parâmetros Hematológicos

As características hematológicas de diversas espécies de peixes cultivados têm sido estudadas com o propósito de caracterizar o perfil hematológico. Assim, as variações neste perfil indicam distúrbios nos processos fisiológicos (Ranzani-Paiva et al., 2000). Tavares-Dias e Mataqueiro (2004) caracterizaram o perfil hematológico de pacus oriundos de cultivo intensivo. Os parâmetros hematológicos dos peixes do grupo controle do presente estudo estão de acordo com os caracterizados por estes autores, demonstrando, portanto, que o perfil hematológico dos espécimes utilizados afirma a condição ideal de saúde destes indivíduos para o desenvolvimento dos subseqüentes estudos experimentais. Para tanto, as comparações dos dados foram realizadas entre os peixes dos diferentes grupos experimentais com o grupo controle, demonstrando que variações hematológicas nestes grupos foram decorrentes de respostas às condições e fatores experimentais.

Nussey et al. (1995), expondo a tilápia mossâmbica ao cobre $0,40 \text{ mg.L}^{-1}$, observaram aumento no número de eritrócitos. Os dados do presente estudo corroboram os achados destes autores, uma vez que os peixes expostos a 0.4Cu aumentaram o Eri (Tabela 5). Porém, nesta mesma condição não houve diferença nos demais parâmetros hematológicos quando comparados aos dos peixes do grupo controle, mostrando que o cobre, nesta concentração, provavelmente estimulou a eritropoiese. De acordo com O'Connor e Fromm (1975), os metais estimulam a eritropoiese. Estes dados diferem dos demonstrados por Tavares-Dias et al. (2002)

que relataram decréscimo no Eri, Hb e CHCM em pacus expostos a duas doses de 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹ de Cu avaliados após 24 h da segunda exposição.

Os peixes expostos a 2.0Cu apresentaram aumento no Eri, Hb e CHCM e diminuição no VCM, sem modificar o Htc. O aumento na hemoglobina dá suporte aos resultados discutidos anteriormente, sendo que as exposições aos maiores níveis de cobre dificultaram os mecanismos respiratórios no pacu com a produção excessiva de muco e possíveis desestruturas branquiais. A exposição a poluentes, por danificar as brânquias e estimular a produção de muco, pode dificultar as trocas gasosas nesta superfície. Por isso, muitos autores relacionam os danos de exposição ao cobre como decorrentes da diminuição da captação de oxigênio. Esta condição deve conduzir o peixe a uma hipóxia interna (hipoxemia). Assim, tanto as elevações da Hb como da CHCM indicam a busca por maior captação de oxigênio em decorrência desta adversidade. De acordo com Cyriac et al. (1989), a elevação da concentração de hemoglobina é um mecanismo pelo qual o organismo responde para captar mais oxigênio do meio e enfrentar o aumento na demanda de oxigênio.

A exposição de pacus aos diferentes níveis de cobre demonstra que as respostas hematológicas foram diferentes nas concentrações de 0.4Cu e 2.0Cu. Nos peixes do primeiro grupo, houve aumento da concentração de Eri e nos peixes do grupo 2.0Cu houve aumento dos mecanismos de captação de oxigênio, com elevação da hemoglobina e da CHCM nos peixes expostos a 2.0Cu. Estas respostas mostraram que o incremento de cobre aquático estimulou respostas hematológicas no sentido de elevar a captação de oxigênio, sendo mais proeminente na maior concentração de cobre estudada.

8.1.2 exposição ao meio ácido

a. Metabolismo oxidativo

Produções excessivas do superóxido, em função do aumento da atividade da SOD, podem inibir a atividade da CAT (Kono e Fridovich, 1982). Roberts et al. (1987) e Rodriguez-Ariza et al. (1991; 1992; 1993) caracterizam o aumento da atividade da SOD como indicador de exposição a águas poluídas, indicando aumento na produção de ânion superóxido. Como observado nos peixes expostos ao meio ácido (0CupH), verificamos que no metabolismo hepático houve aumento da atividade da SOD e diminuição da atividade da CAT. As concentrações hepáticas de HP não foram alteradas. Possivelmente a manutenção da atividade

da GSH-Px foi suficiente para combater os superóxidos produzidos pela elevada atividade da SOD, evitando danos oxidativos (Figura 10).

A exposição dos peixes ao meio ácido causou diminuição na concentração de HP e na atividade das enzimas SOD e CAT no músculo vermelho, quando comparados aos peixes do grupo controle (Figura 11). Os valores do metabolismo intermediário dos peixes expostos ao meio ácido apontam para uma possível diminuição do metabolismo frente a esta adversidade pois, houve diminuição de concentração plasmática de glicose e lactato (estes parâmetros serão discutidos mais adiante). Este processo pode ser uma busca de evitar a acidose, como verificado nos dados de pH_{sg} (Figura 15), o que implicaria na diminuição de captação de oxigênio e, assim, diminuições da produção de EROs provenientes da cadeia respiratória. Cassini et al. (1993) e Wilhelm Filho et al. (1993) encontraram correlação positiva entre enzimas antioxidantes e intensidade metabólica.

A regulação precisa das concentrações de H^+ é essencial, visto que a atividade da maioria das enzimas é influenciada pelo pH. O pH da água afeta a estrutura e atividade das enzimas e baixos pHs podem desnaturar muitas delas na mitocôndria (Ling, 1981). Isto pode explicar a redução da atividade das enzimas do músculo vermelho, nos peixes expostos ao meio ácido no presente estudo, e a correlação destas inibições com a diminuição do pH_{sg} .

Por outro lado, no músculo branco dos peixes expostos ao meio ácido, por se tratar de um tecido menos oxidativo e ter menor atividade das DAs, houve um aumento na concentração de HP (Figura 12). Por não haver diferenças nas atividades da SOD e GSH-Px e diminuição na atividade da CAT, verificamos que as DAs não foram efetivas no processo de proteção do músculo branco, caracterizando estresse oxidativo.

Singh et al. (2004) determinaram uma faixa de pH ótimo para a atividade da CAT entre 6,5 a 7,0. Moore et al. (2008) sugerem que as alterações do pH do ambiente parecem influenciar a atividade da CAT, modificando a relação entre a ação enzimática e a concentração do substrato. O mecanismo molecular para o efeito do pH na atividade da CAT, embora ainda não tenha sido estudado detalhadamente, pode estar na oxidação do Fe^{2+} presente no grupamento heme de sua molécula. A sensibilidade da CAT à diminuição do pH foi verificada nos tecidos avaliados do pacu expostos ao meio ácido. Por outro lado, a atividade da GSH-Px foi mantida constante nestes tecidos, mostrando que as variações do pH, no presente estudo, não modificaram a atividade desta enzima no pacu.

b. Intermediários metabólicos

Brown et al. (1990) verificaram efeito do pH (4,7 – 5,6) no salmão do atlântico, *Salmo salar*. Estes autores observaram um aumento na concentração de glicose no plasma atribuído à busca na manutenção do metabolismo de carboidratos. A exposição ao meio ácido no pacu causou diminuição plasmática da glicose e lactato, sem alterações do piruvato, da amônia e da proteína (Figura 13). Estes resultados demonstram que a exposição ao meio ácido causou hipoglicemia, porém, sem ativação do metabolismo anaeróbico na tentativa de suprir as demandas energéticas. Estas respostas podem caracterizar uma depressão metabólica, diminuindo o gasto energético e evitando intensificar a acidose, uma vez que houve acidificação do plasma dos pacus expostos a pH 5,0. Winkaler et al. (2001) caracterizaram a hipoglicemia de peixes do gênero *Astyanax sp.* como resposta a estresse crônico. A diminuição do metabolismo glicolítico pode estar relacionada à prevenção da acidificação do meio evitando a acidose metabólica (Sidell, 1983), uma vez que a glicólise é o maior produtor de H^+ no organismo (Devlin, 1997), pois a diminuição do pH pode prejudicar processos fisiológicos e causar danos severos à célula (Van den Thillard e Van Waarde, 1985; Wood, 1991). De acordo com Jobling (1994), a exposição a condições ácidas pode levar a diminuições do pH sanguíneo de não mais que poucos décimos de unidade. Porém, as conseqüências fisiológicas destas mudanças são potencialmente grandes. Nossos dados, portanto, corroboram os destes autores demonstrando que a exposição ao meio ácido diminuiu o pH_{sg} de pacu.

c. Atividade da Na^+/K^+ -ATPase, concentração de Metalotionina branquial e $[Cu_p]$

A exposição ao meio ácido não modificou a $[Cu_p]$ do pacu quando comparados aos peixes do grupo controle (Figura 15). Não houve diferenças na concentração de MT branquial dos peixes expostos ao pH ácido, quando comparados aos do grupo controle (Figura 14). As MTs são importantes biomarcadores de poluição ambiental mas, no presente estudo, não se mostraram responsivas às alterações de exposição ao meio ácido.

Diferente dos mamíferos, o principal mecanismo de tamponamento sanguíneo dos peixes depende da regulação interna do pH, que é realizada pela excreção de H^+ para o ambiente aquático. Um dos processos que auxilia este mecanismo é a manutenção da baixa da concentração de Na^+ intracelular, mantido pela Na^+/K^+ -ATPase (Claiborne et al., 2008). Diversas espécies de peixes mostraram ajustar rapidamente seu metabolismo utilizando a liberação de H^+ pelas brânquias (Heisler et al., 1988). Claiborne et al. (1992) descreveram que o

“spiny dogfish”, *Squalus acanthias*, pode se recuperar de uma acidose respiratória em 24 h através da excreção de H^+ e aumento de HCO_3^- no plasma, compensando a diminuição do pH do sangue. O pacu exposto ao meio ácido aumentou a atividade da Na^+/K^+ -ATPase, possivelmente como mecanismo de reversão da diminuição do pH_{sg} .

d. Parâmetros Hematológicos

Variações no pH aquático causam estresse em peixes e as determinações dos parâmetros hematológicos são consideradas indicadores desta toxicidade (Sancho et al., 2000). Tanto o pH alto como o pH baixo são tóxicos para os peixes (Carvalho e Fernandes, 2006). De acordo com Heath (1995), quando a exposição a baixos pHs ocorre de forma mais crônica, o aumento dos parâmetros hematológicos pode ser uma resposta a uma diminuição no fluxo de oxigênio no sangue. Devido ao efeito Bohr, o sangue terá menor afinidade pelo oxigênio em baixos pHs. Os estímulos à produção de eritrócitos e hemoglobina podem, posteriormente, aumentar a capacidade de transporte de oxigênio e assim compensar parcialmente estas alterações. Os dados observados em pacus expostos ao meio ácido, na presente pesquisa (Figura 16), demonstram que os mecanismos para melhorar a captação e o transporte de oxigênio pelo sangue foram ativados. Estes dados são confirmados pelos aumentos de Eri, Hb e CHCM. Nota-se, ainda, que as diminuições significativas do VCM nos peixes expostos ao meio ácido possivelmente caracterizaram que as células sangüíneas liberadas eram menores, e não alterando o Htc.

Segundo Heath (1995) as proteínas são importantes tampões intracelulares e nos eritrócitos a hemoglobina pode também atuar como importante tampão. Nossos dados demonstram que a elevação na concentração de Hb pode também ser um mecanismo acionado para reverter a acidose plasmática. Estes dados mostram que, apesar do pacu resistir à exposição ao meio ácido, pois não houve mortalidade, suas variações hematológicas são estratégias para melhorar a captação de oxigênio dificultada pela acidose sangüínea, conforme descrito por Nussey et al. (1995).

8.1.3 Exposição à hipóxia

a. Metabolismo oxidativo

Os peixes expostos à hipóxia não modificaram a concentração de HP hepática nem a atividade da SOD, mas apresentaram inibição da GSH-Px e CAT, quando comparados aos peixes do grupo controle (Figura 17). No músculo vermelho houve diminuição das atividades da SOD e da CAT nos peixes expostos à hipóxia (Figura 18). Chandel et al. (2000) afirmam haver aumento na produção de EROs em hipóxia, apesar da redução da respiração aeróbica. Nossos dados não demonstram haver diferença na concentração de HP no fígado e no músculo vermelho em decorrência da exposição do pacu à hipóxia. Evidências de diminuição do metabolismo aeróbico no pacu em hipóxia (como será discutido no próximo item) nos mostram que possivelmente houve diminuição de entrada de oxigênio na cadeia respiratória, impedindo assim aumento na concentração de HP. As mitocôndrias são o principal local de produção de EROs e o músculo vermelho é, proporcionalmente, a maior concentração destas organelas (Graham, 1990). Portanto, este tecido é considerado o maior colaborador na geração de EROs (Chance et al., 1979). Neste contexto, pode-se esperar que as DAs nos peixes dependam do consumo de oxigênio e/ou da disponibilidade deste, pois as produções de EROs na mitocôndria são muitas vezes correlacionadas à tensão de oxigênio (Boveris e Chance, 1976).

No músculo branco houve aumento na concentração de HP no grupo de peixes expostos à hipóxia (Figura 19). As enzimas antioxidantes fornecem defesa antioxidante e intrinsecamente espera-se que elas aumentem em resposta à hipóxia, de modo a combater a formação dos EROs (Wilhelm Filho e Boveris, 1993). Este tecido, com menor metabolismo oxidativo e, portanto, menor atividade das DAs, parece não ter mecanismos suficientes para combater os danos decorrentes da diminuição de OD. O aumento de HP pode ter ocorrido em função da semelhança das atividades das DAs mensuradas neste tecido entre os peixes em hipóxia e normóxia, configurando EO, no músculo branco dos peixes em hipóxia.

b. Intermediários metabólicos

Evidências demonstram que as elevações do lactato plasmático em peixes são decorrentes da ativação do metabolismo anaeróbico como ajuste bioquímico, fornecendo energia alternativa em condição de estresse (Virani e Rees, 2000; Crestani et al., 2006). Os pacus expostos à hipóxia diminuíram as concentrações plasmáticas de glicose, lactato, piruvato e amônia (Figura 20). Embora não tenha sido medida a taxa metabólica dos peixes no presente

estudo, estes resultados demonstram que, possivelmente, pacus submetidos à hipóxia responderam à diminuição de captação de oxigênio por meio da supressão metabólica. Hochachka e Somero (1984) afirmam que a supressão metabólica é elemento chave à tolerância à hipóxia em uma variedade de organismos, incluindo os peixes. Muitos animais expostos à hipóxia e à anóxia por longos períodos podem inibir a ativação glicolítica para prevenir acidificação metabólica (Sidell, 1983) pois, a diminuição do pH pode prejudicar processos fisiológicos e causar danos severos à célula (Van den Thillard e Van Waarde, 1985; Wood, 1991).

Os dados de pH_{sg} do pacu, após exposição à hipóxia, demonstram que estes organismos estavam em acidose e, portanto, podem sobreviver a esta adversidade diminuindo seu metabolismo. Estes achados estão de acordo com os de Affonso et al. (2002) que verificaram uma diminuição no pH sanguíneo em tambaquis expostos à hipóxia. Estas respostas podem estar relacionadas à prevenção de acidose metabólica decorrente da exposição à hipóxia (Sidell, 1983).

c. Atividade da Na^+/K^+ -ATPase, concentração de Metalotionina branquial e $[\text{Cu}_p]$

A exposição de pacu à hipóxia não interferiu na $[\text{Cu}_p]$, quando comparado aos peixes do grupo controle (Figura 22), demonstrando que possíveis alterações nos processos respiratórios do pacu, frente às alterações na concentração de OD, não resultaram em maior absorção do cobre presente na água nos níveis controle.

Dentre os biomarcadores que são usualmente utilizados para monitorar a qualidade do ambiente, a indução das MTs tem sido proposta, visto que esta resposta está bem descrita por diversos autores (Roesijadi, 1992; George e Olsson, 1994; Cosson e Amiard, 2000; Carvalho et al., 2004). English e Storey (2003) observaram rápida resposta de expressão de MT em gastrópodos marinhos, *Littorina littorea*, após exposição à anóxia e congelamento, correlacionando a concentração de MT como fator importante para sobrevivência destes organismos à baixa disponibilidade de OD. Estes autores concluíram que além da resposta à exposição aos metais, as MTs são responsivas também às mudanças ambientais como diminuição de OD e de temperatura. Possivelmente, por ser uma espécie fisiologicamente adaptada à hipóxia moderada (Rantin et al., 1996), o pacu não alterou a concentração de MT branquial após exposição à hipóxia (Figura 21).

Comellas et al. (2007) relataram que, em mamíferos, a hipóxia eleva a produção de EROs aumentando a degradação da Na^+/K^+ -ATPase. Chandel et al. (1998) descreveram que a hipóxia *in vitro* inibe o transporte ativo de Na^+ através da diminuição da atividade dos canais de Na^+ e da Na^+/K^+ -ATPase, podendo haver diminuição da sua expressão gênica em uma situação de hipóxia mais pronunciada. Em algumas espécies de peixes tolerantes à hipóxia, a inibição da Na^+/K^+ -ATPase ocorre em paralelo com a diminuição da entrada de Ca^{2+} , contribuindo para a diminuição no consumo de ATP (Buck e Hochachka, 1993). Porém, Nilsson (2001) descreve que espécies de peixes tolerantes à hipóxia, como a carpa cruciana, *Carassius carassius*, não modificam a atividade da Na^+/K^+ -ATPase em resposta à diminuição do OD. No presente estudo, verificamos que pacu exposto à hipóxia aumentou a atividade Na^+/K^+ -ATPase (Figura 21). Por ser uma espécie tolerante à hipóxia (Rantin et al., 1996) e por ter sido exposta a uma PO_2 acima da sua PcO_2 , o pacu pode não ter inibido a Na^+/K^+ -ATPase no presente estudo.

Segundo Bogdanova et al. (2005), a sensibilidade da Na^+/K^+ -ATPase às concentrações de OD no hepatócito de truta arco-íris foram decorrentes do efeito do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons. Estes autores constataram que estas alterações de OD não afetam diretamente a hidrólise do ATP pela enzima, sugerindo que esta inibição é modulada pela produção de EROs. No presente trabalho, verificamos um aumento na atividade da Na^+/K^+ -ATPase e não verificamos aumentos na produção de EROs. O aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase pode ter sido ativado com o objetivo de manter o equilíbrio iônico, uma vez que houve diminuição significativa do pH_{sg} .

d. Parâmetros Hematológicos

Variáveis hematológicas são usuais em diagnósticos de alterações fisiológicas e bioquímicas de peixes (Wedemeyer e Yasutake, 1977). Normalmente são avaliadas para detectar mudanças decorrentes de condições estressantes como hipóxia (Val e Almeida-Val, 1995; Marcon e Wilhelm Filho, 1999 e Affonso et al., 2002). No presente estudo, os peixes apresentaram aumento de Eri, Htc, Hb e diminuição do VCM após exposição à hipóxia (Figura 23). Estas respostas demonstram que o pacu buscou adaptações hematológicas em decorrência da exposição à hipóxia na tentativa de aumentar a capacidade de captação e transporte de oxigênio. Os dados encontrados no presente trabalho estão de acordo com os relatados por Wilhelm Filho et al. (2005) que observaram elevada concentração de hemoglobina em piaparas

expostas à hipóxia. Affonso et al. (2002) expuseram o tambaqui à hipóxia e observaram aumentos de Eri, Hb e CHCM.

8.2 Efeito da exposição associada dos fatores

8.2.1 incremento do cobre em meio ácido

a. Metabolismo oxidativo

A contaminação ambiental é normalmente caracterizada pela combinação de resposta ao estresse e muitos dos biomarcadores que caracterizam estas respostas são fisiológicos e bioquímicos (Depledge, 1993). Os efeitos dos xenobióticos nos organismos aquáticos são baseados nos efeitos isolados de substâncias químicas, mas abordagens recentes mostram que as pesquisas com estudos do comportamento dos biomarcadores na exposição aos efeitos combinados têm ganhado importância (Ferreira et al., 2008). As alterações causadas por poluentes ocorrem inicialmente em níveis bioquímicos e fisiológicos. Portanto, o uso de biomarcadores representa potencial relevância nos testes de toxicidade (Depledge et al., 1993). Porém, poucos estudos demonstram o comportamento de biomarcadores fisiológicos e bioquímicos frente à exposição a metais associados a alterações fisicoquímicas do ambiente aquático em teleósteos.

A determinação da peroxidação é considerada importante como biomarcador (Lackner, 1998). Várias classes de poluentes ambientais são conhecidas por aumentar a formação intracelular de EROs (Winston e DiGiulio, 1991). Da mesma forma, o estudo dos mecanismos de defesa, que combatem o estresse oxidativo, constituem importantes biomarcadores de exposição a xenobióticos (Hasspieler et al., 1994a). Dentre os mecanismos de defesa destacam-se as enzimas antioxidantes SOD, GSH-Px e CAT. O monitoramento da atividade destas DAs é apontado como biomarcador bioquímico importante na ecotoxicologia aquática (Nascimento et al., 2006). A peroxidação lipídica é um índice indicador de danos à membrana e conseqüentemente da perda da função celular (Bopp et al., 2008). O estresse oxidativo tem importância na toxicologia aquática, por causa da difundida presença de contaminantes com potencial de indução na formação de EROs em organismos (Lesser, 2006). Bopp et al. (2008) sugerem que o estresse oxidativo, devido à exposição ao cobre, com a conseqüente geração de EROs, pode servir como alavanca para a apoptose e genotoxicidade. Estes mesmos autores expuseram células branquiais de truta arco-íris, *in vitro*, a concentrações de CuSO_4 que variaram de 10^{-8} a 10^{-3} M em pH 6 e 7. Concluíram que a diminuição do pH do meio resultou em

aumento da concentração de Cu^{2+} livre, aumentando a formação de EROs, e que este parâmetro pode ser utilizado com biomarcador de estresse celular. Biomarcadores comumente utilizados com base nas respostas de estresse oxidativo, como a atividade da CAT e níveis de antioxidantes, parecem ser induzidos na exposição ao sulfato de cobre (Ansaldò et al., 2000; Hansen et al., 2006).

O cobre é um elemento traço essencial com maior concentração no fígado (Turnlund, 1998). Assim como em mamíferos, na maioria dos peixes o fígado é um órgão importante de acúmulo de excesso de cobre (Buck, 1978; Shearer, 1984). Por ser parte integrante de muitas enzimas, o cobre está envolvido em inúmeros processos biológicos vitais. Mesmo estando normalmente ligado a proteínas, o cobre pode ser liberado tornando-se livre para catalisar a formação de EROs. Dados obtidos de estudos *in vitro* confirmam a capacidade do cobre em iniciar danos oxidativos e interferir em importantes eventos celulares (Gaetke e Chow, 2003).

Como discutido no capítulo de exposição do pacu ao cobre em pH neutro, o aumento do cobre aquático elevou a concentração de HP hepático na exposição a 0.4Cu e diminuiu em 2.0Cu. Ao adicionarmos o cobre em pH ácido, a concentração hepática de HP diminuiu nos peixes expostos a 0.4Cu_{pH} e 2.0Cu_{pH}. A atividade da SOD também foi influenciada pela interação entre cobre e pH aquático, uma vez que sua atividade foi intensificada quando o cobre foi adicionado em pH ácido. As comparações dos peixes expostos à associação dos fatores demonstram que o grupo 2.0Cu_{pH} apresentou maior atividade da SOD, quando comparado aos peixes do grupo controle (Tabela 6).

A atividade da GSH-Px hepática não foi diferente nos peixes expostos ao cobre em pH neutro e ácido. A atividade desta enzima de DA não foi alterada comparando-se a exposição aos fatores isolados e associados. A CAT, por outro lado, teve sua atividade abolida quando exposta ao cobre em pH ácido, demonstrando a interação entre os fatores cobre e pH e não correspondendo da mesma maneira aos diferentes níveis de cobre incrementados na água. Dentre os fatores que podem contribuir para a baixa concentração de HP hepática, uma vez que não houve ativação das enzimas CAT e GSH-Px no grupo 2.0Cu_{pH}, podem ser a baixa absorção de cobre ou a atuação de outros mecanismos de defesa antioxidantes não mensurados no presente trabalho.

No músculo vermelho, a concentração de HP e as atividades da SOD, GSH-Px e CAT foram influenciadas pela interação entre cobre e pH (Tabela 7). A exposição do pacu ao meio ácido e a adição de cobre em pH ácido diminuíram a concentração de HP no músculo vermelho. O músculo vermelho é rico em mitocôndrias e estas organelas representam, em

muitos organismos, o principal local de produção de EROs (Chance et al., 1979; Graham, 1990). O oxigênio respirado é utilizado na cadeia de transporte de elétrons, na mitocôndria, reduzindo o O_2 a H_2O_2 e H^+ (Halliwell e Gutteridge, 1986). De acordo com os dados avaliados no pacu exposto ao cobre em pH ácido, verificamos redução na concentração de HP no músculo vermelho, quando exposto ao cobre em meio ácido. Estas diminuições podem ser decorrentes da diminuição da entrada de elétrons na cadeia respiratória, uma vez que os peixes estavam com dificuldades na captação de O_2 , acionando, como apresentado na discussão do metabolismo glicolítico, diminuição do metabolismo quando em meio ácido. Porém, a exposição dos peixes a 2.0CupH mostrou-se mais danosa aos peixes, acionando mecanismos de respiração anaeróbica e busca no aumento da captação e transporte de O_2 .

O músculo vermelho, que supostamente é mais oxidativo, apresenta também maior atividade das DAs (Mazeuad et al., 1979). O padrão de resposta da SOD, GSH-Px e CAT nos peixes expostos às condições experimentais foram modificados quando expostos à associação de cobre e pH. Estas evidências foram constatadas nos diferentes níveis de cobre experimentados. Os grupos de peixes expostos ao pH ácido, adicionados ou não de cobre, tiveram a atividade da SOD diminuída, demonstrando alta sensibilidade da SOD ao meio ácido. A atividade da GSH-Px foi abolida na exposição ao pH ácido, associado ou não ao cobre. A CAT foi inibida nos peixes expostos aos diferentes níveis de cobre em pH ácido ou neutro. Muitas destas respostas demonstram a sensibilidade das DAs ao pH da água, demonstrando que elas são inibidas até mesmo frente à exposição ao cobre em meio ácido. Por apresentar grupamento heme, a CAT pode ser mais sensível à oxidação. Os dados do presente estudo sugerem que, possivelmente por esta sua característica, sua atividade foi a mais afetada em pH ácido.

Diferentemente do ocorrido no músculo vermelho, a concentração de HP no músculo branco foi mais intensa (Tabela 8). A interação cobre e pH foi evidenciada no aumento da concentração de HP nos peixes expostos ao meio ácido. O aumento na concentração de HP neste tecido pode ser decorrente da baixa atividade das DAs. Por ser um tecido menos oxidativo, seus mecanismos de defesa no combate ao estresse oxidativo podem ser menos eficientes. No músculo branco as DAs apresentaram atividade semelhante nos peixes expostos ao cobre em pH neutro e ácido.

A R_{px} (Tabela 9) da exposição do cobre em pH ácido também manteve a mesma relação tecido específica encontrada nos peixes expostos aos fatores isolados, decorrente das maiores atividades da CAT no fígado e menores no músculo branco. Da mesma forma, a R_{EO} mostrou

que, no pacu, o tecido mais oxidativo foi o fígado e o menos oxidativo o músculo branco (Tabela 10). As relações R_{px} e R_{EO} mantiveram o mesmo comportamento das respostas em função do incremento de cobre em meio ácido, demonstrando assim, que mesmo com as interações e mudanças das atividades das DAs (decorrentes da exposição às diferentes condições experimentais) este comportamento tecido-específico não se modificou.

As evidências sugerem que a utilização de enzimas antioxidantes e da concentração de HP como biomarcadores de exposição a xenobióticos, deve considerar a condição física e química da água, uma vez que houve interação entre os níveis de cobre e o pH da água no metabolismo oxidativo do pacu nos principais tecidos oxidativos. Os dados obtidos neste experimento nos permitem avaliar que a exposição do pacu ao incremento de cobre aquático em meio ácido foi mais danosa aos mecanismos bioquímicos, quando comparados com a exposição em pH neutro. E que a exposição a maior concentração de cobre em meio ácido mostrou ser prejudicial ao pacu.

No pacu, apesar da absorção do cobre diminuir quando no maior nível de exposição deste metal, nas duas condições de pH (como será discutido posteriormente), a associação destes fatores e a exposição isolada dos peixes a 2.0Cu causaram alterações no comportamento dos biomarcadores avaliados. Estas alterações podem ser decorrentes tanto da busca do animal em captar mais oxigênio, uma vez que a produção excessiva do muco e a quelação do cobre nas brânquias dificultam as trocas gasosas, como pelos distúrbios ionoregulatórios causados pela exposição aos fatores associados.

b. Intermediários metabólicos

A compreensão dos processos no metabolismo glicolítico frente à exposição a poluente permite avaliar os ajustes realizados no metabolismo energético para que os organismos sobrevivam a esta condição adversa (Heath, 1995). Observamos, na exposição do pacu, interação significativa dos fatores cobre e pH na concentração plasmática de glicose e lactato (Tabela 11). A redução das concentrações plasmáticas ocorridas nos peixes expostos a 0Cu/pH foi abolida na exposição aos fatores associados, mostrando que as alterações no metabolismo glicolítico, em resposta às condições isoladas de cobre e pH, foram diferentes quando estes fatores foram associados. Os peixes do grupo 2.0Cu/pH apresentaram concentração de glicose plasmática e lactato significativamente maiores que os peixes do grupo controle. Estes achados estão de acordo com os de Beaumont et al. (2000) que verificaram efeito do cobre (0,08

$\mu\text{Mol.L}^{-1} - 96\text{h}$) associado ao pH ácido (5,0) em truta marrom e observaram hiperglicemia atribuída à demanda de energia causada pelo meio ácido em associação ao cobre. Wendelaar Bonga et al. (1990) caracterizaram os aumentos de glicose sanguínea como indicador fisiológico de estresse. Takasusuki et al. (2004) observaram aumento no lactato plasmático do curimatá após exposição associada ao cobre e pH ácido, indicando o uso de glicólise anaeróbica para suprir as exigências energéticas. Nossos dados demonstram que o pacu, quando exposto ao cobre em meio ácido, possivelmente utilizou glicólise anaeróbica como mecanismo metabólico para suprir suas demandas energéticas.

As concentrações plasmáticas de piruvato no pacu foram influenciadas pela interação entre o cobre e pH aquático. Esta interação causou modificação das respostas aos níveis de cobre experimentais nos diferentes pHs. Em pH ácido houve inibição de utilização da via glicolítica aeróbica, quando os peixes foram expostos a 0.4CupH e 2.0CupH. Isani et al. (1994) descrevem que o cobre inibiu a piruvato quinase em robalo. A alta concentração de amônia, observada nos peixes expostos a 2.0CupH, comparados aos peixes do grupo 2.0Cu, mostra interação entre cobre e pH. Moraes et al. (2002) sugeriram que a concentração elevada de amônia plasmática indica nova síntese de glicose. O catabolismo protéico, para aumentar as fontes energéticas em organismos expostos a poluentes, é freqüente. Porém, a elevação nas concentrações de amônia plasmática, nos peixes do grupo 2.0CupH, não foram acompanhadas de aumentos no piruvato plasmático, o que não nos permite concluir que houve produção de energia utilizando-se substratos como a proteína. Beaumont et al. (1995a; 2000), Day e Butler (1996) e Wilson e Taylor (1993) observaram aumento na amônia plasmática em trutas expostas ao cobre em pH ácido. Beaumont et al. (2000) associaram as altas concentrações de amônia plasmática em decorrência das dificuldades de trocas iônicas em tecidos branquiais danificados. A amônia é produto final de muitos processos metabólicos, em particular da desaminação de aminoácidos. Concentrações elevadas de amônia são tóxicas aos organismos (Walton e Cowey, 1982). Em situações de estresse a concentração de amônia pode ser elevada devido ao aumento de níveis de catecolaminas e cortisol circulantes (Wendelaar Bonga, 1997; van Weerd e Komen, 1998).

A exposição ao meio ácido pode levar a diminuições do pH sanguíneo (Jobling, 1994). Aumentos nas concentrações de H^+ são normalmente decorrentes da glicólise. Variações nos níveis de lactato plasmático são freqüentemente correlacionadas com mudanças no pH sanguíneo (Hardewig et al., 1998), podendo o lactato ser considerado tampão em diversos tecidos, evitando a acidose (Brooks et al., 2000). A exposição do pacu a níveis de cobre e pH

demonstrou interação significativa nos valores do pH_{sg} . A interação observada demonstrou mudança no padrão de resposta do pH_{sg} do pacu frente aos níveis de cobre nos dois pHs. A acidose sanguínea foi observada nos peixes expostos aos grupos 2.0Cu, 0.4Cu_pH e 2.0Cu_pH, que apresentaram valores de pH_{sg} menores que os peixes do grupo controle. Esta diminuição do pH_{sg} mostrou que o cobre, quando adicionado na água com pH neutro, causou acidose somente na maior concentração. Porém, os dois níveis de cobre associados ao meio ácido foram suficientes para causar acidose no pacu.

c. Atividade da Na^+/K^+ -ATPase, concentração de Metalotionina branquial e $[\text{Cu}_p]$

A aquisição do cobre do ambiente aquático pelos peixes quase sempre ocorre através das brânquias (Stagg e Shuttleworth, 1982; Norey et al., 1990; Battaglini et al., 1993). Por isso, este órgão nos peixes é o primeiro local de injúria causada pelo cobre, sendo considerado órgão chave quando avaliamos o início das respostas compensatórias à exposição a este metal (Laurén e McDonald, 1985; 1987). A exposição aguda a metais ativa a hipersecreção de muco nas brânquias, que serve como importante mecanismo de proteção contra a absorção dos metais (McDonald e Wood, 1993) por meio da quelação, formação de complexos com o cobre de modo a reduzir sua toxicidade, e inibição de difusão (Heath, 1995). Porém, esse mesmo mecanismo benéfico para reduzir o efeito tóxico do contaminante, acaba sendo prejudicial para os peixes, pois pode impedir as trocas gasosas, levando o indivíduo à hipóxia (Lichtenfels et al., 1996) e também pode causar desordem na osmorregulação e na regulação iônica (Heath, 1995).

Neste sentido, verificamos que, no processo de absorção do cobre aquático não houve interação entre os níveis de cobre adicionados na água e os níveis de pH aos quais os pacus foram expostos (Tabela 12). A $[\text{Cu}_p]$, nos peixes dos grupos expostos ao cobre em pH neutro e em pH ácido, apresentou o mesmo padrão nas duas condições, mostrando diferenças em relação ao grupo controle na mesma intensidade. Os resultados demonstram que houve efeito dos fatores cobre e pH, quando na sua forma isolada. Como discutido anteriormente nos respectivos tópicos, verificamos que a produção excessiva de muco, observada no presente estudo, pode ser uma das causas da diminuição de absorção de cobre nos peixes expostos a maior concentração deste metal. Porém, o efeito do pH nos mostra que os grupos expostos ao meio ácido, indiferente dos níveis de cobre, aumentaram a $[\text{Cu}_p]$.

O volume ventilatório, a espessura do epitélio branquial e a perfusão influenciam a taxa de transporte de O_2 e podem similarmente influenciar a absorção de tóxicos através das

brânquias (Yang et al., 2000). Tem sido descrito que as taxas de transferência de oxigênio podem ser indicativas da transferência de compostos tóxicos (Murphy e Murphy, 1971). Yang et al. (2000) encontraram relação entre a taxa de absorção de tóxicos pelas brânquias e o consumo de O₂. Não foram mensurados os parâmetros respiratórios na presente pesquisa, mas existe a possibilidade de mudanças nestes processos terem influenciado na taxa de absorção do cobre pelas brânquias.

Blust et al. (1991) afirmaram que mudanças nas concentrações de íons hidrogênio tiveram efeito importante na absorção do cobre na *Artemia franciscana* e que as variações de absorção observadas não podem ser compreendidas somente pelas variações de concentração de íons cobre livre na água. Estes mesmos autores explicam que os sítios de ligação no sistema de transporte são vulneráveis ao meio ácido. Carvalho e Fernandes (2006) confirmam que a toxicidade do cobre é dependente do pH da água e sugerem que mudanças no pH podem afetar a especificidade do metal e sua toxicidade de modo complexo. Portanto, o meio ácido pode afetar a biodisponibilidade do cobre. De acordo com Buchwalter et al. (1996), a toxicidade do cobre pode aumentar com uma diminuição do pH pois, a quantidade de íons cobre livres ligados a carbono podem diminuir em resposta a um aumento de H⁺, que poderá competir com o cobre por sítios de ligação na molécula de carbono. Devido a esta relação de competição, deverá haver maiores quantidades de íons cobre livres na solução, que poderão se ligar à superfície branquial. Estes autores observaram que aumentos na concentração de H⁺ sempre levam a altas mortalidades de embriões e larvas do anfíbio africano, *Xenopus laevis*. Estes resultados referem-se mais à ação das altas concentrações do Cu²⁺, que estava associado à diminuição do pH, sugerindo que mudanças no pH podem afetar a especiação do metal e sua toxicidade de modo complexo. O efeito do pH na ação do metal é metal-específico e muitos dos mecanismos envolvidos são desconhecidos (Buchwalter et al., 1996).

A discussão acerca da importância das MTs na prevenção da absorção dos metais presentes na água também pode ser parâmetro para compreendermos esta diminuição de [Cu_p], quando aumenta a concentração de cobre na água (Hamer, 1986). Verificamos que os peixes expostos à concentração de 2.0mgCu, indiferente do pH aquático, apresentaram altas concentrações de MT branquial. O aumento desta proteína nas brânquias, principal local de absorção do cobre aquático (Battaglini et al., 1993), pode estar associado à diminuição da absorção deste metal. Ferreira et al. (2008) apontam que os efeitos antagônicos encontrados após a exposição à associação de cádmio e carbendazim se devem à redução na toxicidade destes poluentes, causada pelo aumento na concentração de MT. A metalotionina é um

componente tecidual e acredita-se que possui um grande papel na regulação do metabolismo intracelular do cobre e zinco. Elas também apresentam função importante na proteção das células de possíveis danos causados por estes agentes tóxicos. Estas proteínas fazem parte de uma função protetora através do seqüestro de íons livres de metais pesados, prevenindo que os íons metálicos se liguem e inibam enzimas celulares e outras proteínas funcionais (Jobling, 1994). Os mecanismos de destoxificação do cobre em peixes incluem a indução da MT, permitindo a retenção do cobre por semanas ou meses após sua absorção, sem produzir efeitos tóxicos (Hogstrand et al., 1991; Carbonell e Tarazona, 1994).

Ao avaliarmos as concentrações de MT branquial de pacu exposto ao cobre em pH neutro e ácido, verificamos que não houve interação entre estes dois fatores (Tabela 12). Uma vez que não ocorreu efeito de interação, avaliamos os efeitos isolados e verificamos que não houve efeito da exposição aos diferentes pHs mas, houve efeito dos níveis de cobre na concentração de MTs branquial. Estas respostas nos permitem caracterizar a MT como importante biomarcador de exposição ao CuSO_4 no pacu, pois a concentração da MT não foi modificada quando a exposição ocorreu em pH neutro ou ácido. Os dados obtidos por Carvalho et al. (2004), ao exporem o curimatá a níveis de cobre, pH e temperatura, afirmaram o uso da concentração de MT hepática como biomarcador da exposição ao cobre, mesmo nas diferentes condições de exposição.

O comportamento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial foi alterado em decorrência da interação significativa entre os níveis de cobre e os diferentes pHs a que os peixes foram expostos. A exposição ao meio ácido, conforme descrita na discussão dos fatores isolados, aumentou a atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial. O cobre, na exposição a pH neutro, diminuiu a atividade desta enzima. As exposições aos dois níveis de cobre, em pH neutro ou ácido, inibiram a atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial. A interação entre estes fatores demonstra que o estímulo à atividade desta enzima foi abolido quando os peixes foram expostos ao meio ácido associado ao cobre.

De forma mais pronunciada, os peixes do grupo exposto a $2.0\text{Cu}\mu\text{H}$ tiveram a maior inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial. Segundo Hussain et al. (1995) as MTs podem proteger Na^+/K^+ -ATPase contra as ações tóxicas de metais pesados, incluindo o cobre. O cobre promove a expressão de MTs branquiais, sendo inicialmente ativada nas células cloreto, como apresentado por Dang et al. (1999). Assim, o aumento de células cloreto pode contribuir para a proteção e manutenção da atividade Na^+/K^+ -ATPase branquial nestas novas células cloreto induzidas pela MT (Dang et al., 1999). Ao observarmos a maior intensidade de

redução da atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial no pacu exposto a 2.0CupH, podemos verificar que possivelmente o aumento da MT branquial foi insuficiente na proteção da Na^+/K^+ -ATPase, quando o maior nível de cobre foi associado ao pH ácido.

d. Parâmetros Hematológicos

Alterações nas características do meio aquático são responsáveis por variações nos parâmetros hematológicos de peixes expostos a ambientes poluídos. Estas alterações ocorrem principalmente por haver uma íntima ligação entre o sistema circulatório e o ambiente externo (Cassilas e Smith, 1977). Wandellar Bonga (1977) descreve que a avaliação das repostas hematológicas pode auxiliar na compreensão de possíveis alterações decorrentes da exposição a metais. Muitas das alterações hematológicas observadas em peixes expostos ao cobre são descritas por serem decorrentes da dificuldade de trocas gasosas ocasionadas pela desestruturação do epitélio branquial (Mazon et al., 2002a). Lichtenfels et al. (1996) associam também esta dificuldade respiratória com a hipersecreção de muco. Nussey et al. (1995) caracterizam as respostas de exposição ao cobre como as de exposição à hipóxia.

As concentrações de Eri e Hb dos pacus, frente aos níveis de cobre, foram semelhantes no pH neutro e ácido (Tabela 13). Não houve interação entre os fatores cobre e pH nas concentrações de Eri e Hb. Assim, a eritropoiese e o aumento de Hb foram estimulados com a mesma intensidade e frequência nas exposições isoladas e associadas de cobre. Porém, verificamos que os peixes dos grupos 0.4CupH e 2.0CupH tiveram aumento de Eri mais pronunciado, quando comparado aos peixes do grupo controle. A Hb também foi mais pronunciada nos peixes dos grupos 0.4CupH e 2.0CupH e nos peixes do grupo 2.0Cu. Isto nos mostra que, embora não haja interação, a associação dos fatores estimulou os mecanismos de captação e transporte de O_2 , quando comparados à exposição dos fatores isolados. As respostas hematológicas observadas no pacu exposto ao cobre em pH neutro e ácido demonstram que, indiferente da absorção deste metal, a presença de cobre na água dificulta as trocas gasosas estimulando o organismo a dispor de mecanismos que capturem e transportem mais O_2 , condição esta que foi mais pronunciada nos peixes expostos a cobre em pH ácido, pois a influência da diminuição do pH_{sg} pode interferir na afinidade da Hb pelo O_2 .

O Htc, VCM e CHCM dos pacus foram diferentes nos grupos expostos ao cobre em pH neutro e pH ácido, demonstrando interação entre o cobre e pH. A elevação do Htc dos peixes expostos a 2.0CupH demonstra que esta interação modificou o padrão de resposta desta

variável hematológica. Os peixes dos grupos expostos ao pH neutro apresentaram CHCM diferente dos peixes expostos ao pH ácido. Porém, a interação foi evidenciada no aumento do CHCM nos peixes dos grupos expostos a 2.0Cu. Todos os peixes expostos a pH ácido apresentaram CHCM maiores que os do grupo controle. O VCM não modificou seu padrão de resposta entre as diferentes condições experimentais, mas, as respostas em pH neutro foram diferentes das ocorridas em pH ácido. Os peixes expostos a 2.0Cu_{pH} tiveram aumento de Htc e CHCM e diminuição de VCM, comparados aos peixes do grupo controle. As variações dos índices hematimétricos observadas no pacu, nos diferentes grupos experimentais, devem considerar as variações no Htc, que influenciam diretamente o CHCM e o VCM. A semelhança do Htc nos peixes expostos ao incremento de cobre em pH neutro e ácido pode ter ocorrido em função da diminuição do VCM, da mesma forma que o Htc constante e o aumento no Eri mantém um VCM constante. A influência do Htc no CHCM também acontece quando existe aumento de Hb. Por isso, as avaliações dos índices hematimétricos devem levar em conta as variações nos parâmetros hematológicos. Soivio e Nikimaa (1981) alertam para as interpretações do CHCM quando são lançadas na corrente sanguínea célula imaturas, com diferentes concentrações de Hb. Carvalho e Fernandes (2006) observaram interação entre pH e cobre somente para Htc e CHCM e concluíram que a exposição aos fatores associados causou maiores distúrbios que os fatores isolados.

Cusimano et al. (1986), Takasusuki et al. (2004) e Menezes (2005) encontraram diminuição da toxicidade do cobre em pH ácido em truta arco-íris, tambaqui e curimatá, respectivamente. Carvalho e Fernandes (2006) sugerem que a diminuição da toxicidade do cobre em pH ácido pode ser decorrente da competição do H⁺ e do Cu²⁺ pelo mesmo sítio de ligação no epitélio branquial (Laurén e McDonald, 1985), que é a principal superfície corporal de difusão água-sangue (Mazon et al., 2002a). Nossos achados demonstram que houve diminuição da absorção de cobre em pH ácido, corroborando os achados de Carvalho e Fernandes (2006). Porém, as diferenças hematológicas dos peixes expostos ao cobre nos diferentes pHs evidenciam que estes efeitos podem ser indiretos e que mesmo que o cobre não seja absorvido, os possíveis danos branquiais e a produção excessiva de muco dificultaram as trocas gasosas dos peixes expostos a 2.0Cu, 0.4Cu_{pH} e 2.0Cu_{pH}.

8.2.2 Incremento do cobre em hipóxia

a. Metabolismo oxidativo

Vários mecanismos vêm sendo propostos para explicar a indução da toxicidade do cobre. Mais freqüentemente, a base desta teoria é a propensão de que íons de cobre livres participam na formação dos EROs (Bremmer, 1998). As concentrações de HP hepático dos peixes expostos ao cobre em normóxia foram diferentes dos peixes em hipóxia. Estas diferenças evidenciam a interação entre cobre e OD na concentração de HP hepático do pacu. Na concentração de cobre de 0.4mgCu, nas duas condições de OD, houve aumento de HP hepático. Porém, na concentração de 2.0mgCu os peixes em hipóxia apresentaram HP hepático maior que os peixes em normóxia.

Em normóxia, como discutido anteriormente, a não elevação do HP pode ser explicada pela diminuição do metabolismo. Em hipóxia, a diminuição do HP pode ser decorrente da efetividade das DAs, como a SOD e GSH-Px que aumentaram no fígado dos peixes do grupo 2.0CuHpx. Tanto a atividade hepática da SOD quanto a da GSH-Px foram alteradas pela interação do cobre e OD (Tabela 14). Outros mecanismos que podem inibir a atuação do cobre como antioxidante e a baixa produção de EROs podem ser decorrentes da atuação da MT como antioxidante (English e Storey, 2003). A SOD hepática mostrou-se responsiva aos níveis de cobre, uma vez que este metal é componente estrutural da Cu-Zn SOD (Pedrajas et al., 1995). Porém, os aumentos de atividade da SOD em normóxia e em hipóxia tiveram intensidades diferentes. Os peixes do grupo 2.0CuHpx tiveram o maior aumento da atividade desta enzima. Víg e Necmcsók (1989) encontraram que a atividade da SOD no fígado de carpa comum aumentou em resposta à exposição ao cobre. O aumento da atividade da SOD demonstra haver alta produção de $O_2^{\cdot-}$ neste tecido. De acordo com Pandey et al. (2003), a SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em H_2O e H_2O_2 , que é destoxificado pela CAT e GSH-Px. A GSH-Px, por catalisar a conversão de H_2O_2 proveniente, muitas vezes, da atividade da SOD, contribuindo para a diminuição do HP, prevenindo EO, como observado nos peixes do grupo 2.0CuHpx. Wilhelm Filho et al. (2005) expuseram a piapara a tensões de oxigênio e observaram aumentos significativos na atividade hepática da GSH-Px. Acredita-se que a atividade da GSH-Px aumenta a capacidade de defesa contra a toxicidade dos peróxidos (Hasspieler et al., 1994b). As enzimas antioxidantes atuam como mecanismos de defesa contra ambientes oxidantes, permitindo a adaptação às novas condições. Rodriguez-Ariza et al. (1993) também encontraram maior atividade da GSH-Px em tainhas, *Mugil sp.*, coletadas de áreas

poluídas. Sabe-se que a GSH-Px e GST atuam juntas, prevenindo a peroxidação lipídica em peixes (Steadman et al., 1991). Estes dados corroboram os de Winston e Di Giulio (1991) que também acreditam que aumentos da atividade da GSH-Px protegem o organismo da peroxidação lipídica. A CAT hepática não foi alterada nas diferentes condições experimentais, apresentando as mesmas concentrações nos peixes expostos ao cobre em normóxia e hipóxia.

As enzimas antioxidantes são importantes mecanismos de defesa e espera-se que elas aumentem em resposta à hipóxia, de modo a combater a formação de EROs. Por ser um tecido rico em mitocôndria (Graham, 1990), acredita-se que o músculo vermelho seja um dos grandes colaboradores na formação de EROs (Chance et al., 1979). Assim, o músculo vermelho também é caracterizado por apresentar alta atividade das DAs (Mazeuad et al., 1979). A produção de EROs na mitocôndria é muitas vezes correlacionada à tensão de oxigênio (Boveris e Chance, 1976). As concentrações de HP no músculo vermelho do pacu foram diferentes nos grupos expostos ao cobre em normóxia e em hipóxia (Tabela 15). A interação cobre e OD foi evidenciada no aumento do HP hepático dos peixes do grupo 0.4CuHpx, comparados aos peixes do grupo 0.4Cu. Os peixes expostos a 2.0mgCu, indiferente dos níveis de OD, diminuíram a concentração de HP no músculo vermelho. As DAs no músculo vermelho foram alteradas em função da interação cobre e OD, apresentando diferença nas respostas de exposição ao cobre em hipóxia, quando comparado à normóxia. Os pacus expostos a 2.0Cu e aos grupos 0CuHpx, 0.4CuHpx e 2.0CuHpx apresentaram diminuição na atividade da SOD, evidenciando tanto o efeito das altas concentrações de cobre aquático, quanto inibição da SOD em hipóxia, associada ou não ao cobre. Por outro lado, a GSH-Px, que foi estimulada nos peixes expostos a 2.0Cu, foi inibida nesta mesma concentração em hipóxia. A atividade da CAT foi inibida nos peixes expostos ao cobre em normóxia e em hipóxia. De acordo com Taylor et al. (1988), o cobre pode reduzir a atividade da CAT em ratos.

No músculo branco, a concentração de HP aumentou nos peixes expostos ao cobre em normóxia e hipóxia (Tabela 16). A interação entre cobre e OD foi evidenciada na diferença de concentração de HP nos grupos expostos à hipóxia, comparados aos peixes do grupo controle. Chandel et al. (2000) afirmam haver aumento na produção de EROs em hipóxia, apesar da redução da respiração aeróbica. As atividades da SOD, GSH-Px e CAT não foram alteradas em decorrência da exposição do pacu à normóxia e à hipóxia. Porém, a SOD do músculo branco foi maior nos peixes expostos a 2.0mgCu em normóxia e em hipóxia, demonstrando a influência do cobre na atividade desta enzima. Porém, como a GSH-Px e a CAT não foram

responsivas ao aumento da atividade da SOD, houve aumento das concentrações de HP, ocorrendo EO.

Avaliando o R_{px} do acréscimo de cobre em hipóxia, verificamos que o fígado possui a menor R_{px} em relação ao músculo vermelho e que este é menor que o músculo branco, pois houve diferença nas atividades das DAs nos diferentes tecidos (Tabela 17). A relação tecido-específica demonstra que a atividade da GSH-Px foi fígado < músculo vermelho < músculo branco e a atividade da CAT foi fígado > músculo vermelho > músculo branco, mostrando uma clara relação entre estas enzimas peroxidases pois, ambas competem pelo mesmo substrato para combater o estresse oxidativo. A razão entre elas é diferente em cada tecido e as proporções se mantêm indiferentes do OD da água.

Avaliando a R_{EO} dos grupos expostos ao incremento de cobre em meio ácido, verificamos que existem diferentes razões entre os tecidos (Tabela 18). Uma vez que a R_{EO} faz a razão entre a concentração de HP e a atividade das peroxidases, os tecidos com maior razão entre estes parâmetros é o mais oxidativo. Em resposta ao cobre em hipóxia temos: fígado > músculo vermelho > músculo branco. Esta relação demonstra que o fígado é o tecido mais oxidativo do pacu, uma vez que maiores concentrações de HP são produzidas nele. Talvez, por este motivo, a concentração de CAT seja maior neste tecido pois, esta enzima tem menor afinidade com o substrato. As relações R_{px} e R_{EO} mantiveram o mesmo comportamento das respostas em função do incremento de cobre em hipóxia.

b. Intermediários metabólicos

Os níveis de glicose sangüínea são freqüentemente citados como indicador fisiológico sensível ao estresse em peixes (Wedemeyer e McLeay, 1981). Segundo Wendelaar Bonga (1997) e Van Weerd e Komen (1998), o aumento de glicose no plasma, após exposição ao estresse, é o mecanismo que assegura o abastecimento e redistribuição de energia na busca da homeostase. Dentre os efeitos metabólicos da exposição a metais em peixes, são descritos a hiperglicemia, o catabolismo protéico e alterações nos níveis de proteína no sangue (Wendelaar Bonga, 1977; Laurén e McDonald, 1985). Os níveis de glicose plasmática do pacu foram influenciados pela interação entre os níveis de cobre aquático e a concentração de OD. O pacu quando exposto ao cobre em normóxia não alterou as concentrações plasmáticas de glicose, porém, em hipóxia, os peixes expostos a 2.0CuHpx apresentaram hiperglicemia. Para Hatting (1976) a hiperglicemia é uma resposta comum a estressores em peixes de água doce e tem sido

considerada como biomarcador. A hiperglicemia também é correlacionada como mecanismo de destoxificação (Carvalho, 2003).

Os dados do presente trabalho demonstram que, embora na exposição às concentrações de cobre em normóxia não tenha havido diferença nas concentrações de lactato plasmático, quando o cobre foi adicionado em hipóxia os níveis de lactato dos peixes do grupo 2.0CuHpx se elevaram (Tabela 19). Estas respostas mostram a mudança de padrão das concentrações de lactato frente às diferentes condições de OD, evidenciando a interação cobre e OD. Aumentos nas concentrações de lactato sanguíneo indicam a ativação de metabolismo anaeróbico como via alternativa na manutenção e fornecimento de energia (Virani e Rees, 2000; Crestani et al., 2006). Embora o nível hipóxico ao qual o pacu foi exposto esteja abaixo da sua P_{cO_2} , a exposição à hipóxia associada a 2.0mgCu estimulou o pacu à ativação de mecanismos alternativos, como o metabolismo anaeróbico, para suprir suas demandas energéticas. As respostas bioquímicas contribuem para que os peixes possam enfrentar baixos níveis de OD (Moraes et al., 2002).

O pH_{sg} foi significativamente modificado pela interação cobre e OD (Tabela 20). Nota-se que os peixes expostos à hipóxia, indiferente dos níveis de cobre, e o grupo de peixes expostos a 2.0Cu apresentaram acidose plasmática quando comparados aos peixes do grupo controle. Diminuições do pH sanguíneo podem prejudicar processos fisiológicos causando danos severos à célula (Van den Thillard e Van Waarde, 1985; Wood, 1991). Affonso et al. (2002) verificaram uma diminuição do pH sanguíneo em tambaqui exposto à hipóxia. Variações nos níveis de lactato plasmático são freqüentemente correlacionadas com mudanças no pH sanguíneo (Hardewig et al. 1998). A acidose láctica ocorre, normalmente, em condições de alta atividade glicolítica, gerando acúmulo de lactato e H^+ nas células sanguíneas. Em situações de acidose, o organismo busca, de alguma forma, compensar a queda do pH do plasma para que este não exceda os limites toleráveis. Nos peixes um dos processos que atuam na reversão da acidose é a excreção de H^+ pelas brânquias. Este processo é auxiliado pela ação da Na^+/K^+ -ATPase que mantém os níveis de Na^+ intracelular (Claiborne et al., 2008). No pacu houve um aumento na atividade Na^+/K^+ -ATPase branquial em hipóxia, mas a atividade desta enzima foi inibida na adição de cobre, indiferente da concentração de OD (como será discutido posteriormente). Desta forma, mesmo a diminuição do pH_{sg} na exposição ao cobre em hipóxia não estimulou este mecanismo de manutenção do equilíbrio ácido base. Deve-se considerar que o espessamento da camada de muco na superfície branquial pode dificultar a liberação dos íons H^+ para o ambiente.

As modificações na concentração de piruvato demonstradas na exposição ao cobre em normóxia foram abolidas na exposição ao cobre em hipóxia. As comparações dos peixes em normóxia e dos peixes em hipóxia demonstram diferenças na concentração de piruvato em todos os níveis de cobre. A interação cobre e OD modificou a intensidade de resposta do pacu, inibindo o aumento do piruvato, em resposta à exposição ao cobre. Por outro lado, a amônia plasmática que não havia sido alterada nos peixes expostos às concentrações de cobre em normóxia, aumentou nos peixes expostos a 2.0CuHpx, evidenciando a interação cobre e OD nas concentrações de amônia no plasma. Moraes et al. (2002) sugeriram que as concentrações elevadas de amônia podem indicar nova síntese de glicose se este aumento for acompanhado do aumento de piruvato e glicose. A exposição ao cobre causa aumentos na concentração de amônia plasmática, provavelmente em resposta ao estresse, mecanismo este que assegura o abastecimento e redistribuição de energia para defender o equilíbrio homeostático (Wendellar Bonga, 1997; Van Weerd e Komen, 1998). Como não observamos aumento nos níveis de piruvato no grupo 2.0CuHpx, as altas concentrações de amônia plasmática podem ter sido decorrentes das dificuldades de excreção da mesma pelo tecido branquial, conforme proposto por Beaumont et al. (1995b). No presente estudo, as mudanças dos parâmetros metabólicos mostraram preferências pelas vias anaeróbicas utilizando como substrato energético fontes como o lactato para suprir a demanda de energia quando o pacu foi submetido ao incremento de cobre em condição de hipóxia. No presente trabalho observou-se que as maiores diferenças nas alterações no metabolismo glicolítico ocorreram no maior nível de exposição de cobre.

c. Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, concentração de Metalotionina branquial e [Cu_p]

Os aumentos das concentrações internas de metal estão provavelmente relacionados à taxa de absorção do metal, que depende da concentração do metal na água e dos parâmetros físico-químicos da água (Baer e Thomas, 1990; English e Stirey, 2003; Mosleh et al., 2004) e das propriedades da membrana entre o meio externo e o meio interno (Florence et al., 1992). No presente estudo, a concentração da MT branquial foi elevada com o incremento de cobre em ambiente hipóxico (Tabela 20). Este aumento foi diferente nos níveis de incremento de cobre avaliados, mostrando que a maior concentração de cobre adicionada nos aquários experimentais, resultou na maior concentração de MT branquial. Porém, a concentração de MT branquial se comportou de forma semelhante e com mesma intensidade de aumento em normóxia e hipóxia, mostrando que não houve interação entre cobre e hipóxia na concentração

desta proteína. O comportamento da MT branquial do pacu exposto ao cobre, em normóxia e hipóxia, caracteriza esta proteína como importante biomarcador podendo monitorar a exposição ao cobre mesmo em ambientes com OD diferentes.

O incremento de cobre em águas hipóxicas modificou a $[Cu_p]$ do pacu, embora, na exposição ao cobre em normóxia, a maior concentração de cobre tenha diminuído a $[Cu_p]$. Quando esta inclusão de cobre foi feita em ambiente hipóxico, a absorção de cobre foi intensificada (Tabela 20). As diferenças na absorção do cobre podem ser decorrentes de alterações no processo respiratório frente à hipóxia, porém estes parâmetros não foram avaliados no presente trabalho. Contrário aos nossos achados, Pilgaard et al. (1994) expuseram a truta arco-íris a cobre e hipóxia e concluíram que não houve diferença significativa nas concentrações de cobre nos tecidos, quando comparou os peixes expostos ao cobre em anóxia e cobre em hipóxia. De modo similar ao já discutido na exposição ao cobre em normóxia, o aumento na frequência respiratória e a produção de muco decorrente da exposição ao cobre e à hipóxia influenciaram a associação entre cobre aquático e cobre absorvido, tornando esta relação não linear. Observa-se que nos peixes expostos a 2.0CuHpx, mesmo com altas concentrações de MT branquial, que possivelmente protegeriam o organismo da entrada do metal no sangue, o pacu absorveu maiores quantidades de cobre.

As exposições a concentrações crescentes de cobre aquático em meio hipóxico causaram diminuição na atividade branquial da $Na^+/K^+-ATPase$ (Tabela 20). Embora em condição de hipóxia, houve estímulo da atividade da $Na^+/K^+-ATPase$. Por outro lado, nas duas concentrações de cobre a que o pacu foi exposto, indiferentemente das condições de oxigênio, houve inibição da atividade da $Na^+/K^+-ATPase$ branquial. Esta modificação no padrão de resposta demonstra a interação entre cobre e OD. Observou-se que, de certa forma, a diminuição da atividade da $Na^+/K^+-ATPase$ branquial ocorreu nos peixes expostos a 2.0CuHpx, demonstrando que a associação de cobre e hipóxia foi prejudicial ao mecanismo de regulação iônica do pacu. Não foi encontrado nenhum estudo avaliando a atividade da $Na^+/K^+-ATPase$ na exposição do cobre em hipóxia. Porém, estudos que avaliaram a exposição à hipóxia e ao cobre evidenciaram a inibição da $Na^+/K^+-ATPase$ nestas duas condições, separadamente (DeBoeck et al., 2007; Comellas et al., 2007). Comellas et al. (2007) caracterizaram a inibição da $Na^+/K^+-ATPase$ decorrente da diminuição do ATP por ajustes no metabolismo.

d. Parâmetros Hematológicos

As variáveis hematológicas são usadas normalmente em diagnósticos clínicos da fisiologia dos peixes, sendo ferramenta utilizada para avaliar a exposição a concentrações sub-letais de poluentes (Wedemeyer e Yasutake, 1977). O uso destas variáveis como indicador de estresse (Casillas e Smith, 1977) de substâncias tóxicas (Van Vure, 1986) e de metais (Cyriac et al., 1989; Wepner et al., 1992) tem sido proposto. A avaliação das variáveis hematológicas proporciona informações importantes relativas às respostas fisiológicas dos peixes, quando expostos a mudanças ambientais (Casillas e Smith, 1977). Muitos fatores interferem nas respostas hematológicas dos peixes, dentre eles a hipóxia (Marcon e Wilhelm Filho, 1999) e o cobre (Nussey et al., 1995). O Eri dos peixes aumentou nos peixes expostos a 0.4mgCu, tanto em normóxia quanto em hipóxia (Tabela 21). Porém, os grupos de peixes expostos a 2.0mgCu, nas duas condições de OD, não modificaram o Eri. A hemoglobina, influenciada pela interação cobre e OD, aumentou nos peixes dos grupos 0.4CuHpx e 2.0Cu, quando comparados aos peixes do grupo controle. Os peixes do grupo 2.0CuHpx apresentaram valores de Hb semelhantes aos do grupo controle. O decréscimo do Eri após a exposição ao CuSO₄ sugere inibição na produção dessas células ou hemodiluição decorrente de alterações peroxidativas na membrana celular e distúrbios osmorregulatórios causados por metais pesados (Roncero et al., 1992; Nussey et al., 1995). Os dados do presente estudo demonstram que os peixes expostos a 0.4Cu, 0.4CuHpx e a 2.0Cu estimularam mecanismos de aumento de captação e transporte de O₂. Porém, na exposição a 2.0CuHpx não houve indícios de aumento das concentrações de Eri e Hb.

Interações também foram observadas no Htc e CHCM dos peixes expostos a diferentes níveis de cobre e OD. As variações nestes parâmetros foram diferentes quando o cobre foi adicionado em normóxia e em hipóxia. Por outro lado, o VCM respondeu da mesma forma, nos diferentes níveis de OD, às demais concentrações de cobre, onde o maior nível de cobre, indiferente das condições de OD, diminuiu o VCM. Esta diminuição pode ser decorrente tanto da liberação de células imaturas como da hemólise decorrente do estresse (Larsson et al., 1985). As interpretações dos índices hematimétricos devem considerar também as variações dos parâmetros hematológicos. A não alteração do Htc e a diminuição do Eri podem ter causado diminuições no valor do VCM.

A introdução de muitos dos metais tóxicos em pequenas quantidades em ambientes aquáticos causam diversas mudanças na dinâmica interna de organismos aquáticos, mesmo em níveis sub-letais (Nussey et al., 1995). Pickering (1968) expôs o “bluegills”, *Lepomis macrochirus*, a

3 diferentes concentrações de oxigênio dissolvido 1.8, 3.2, e 5.6 mg.L⁻¹ (31, 56 e 98 mmHg) em exposição sub-aguda ao zinco. Os peixes apresentaram elevada sensibilidade ao zinco como resultado das baixas concentrações de oxigênio.

Existem inúmeros estudos sobre o efeito do cobre na fisiologia e bioquímica de peixes. Entretanto, poucos são os que combinam a toxicidade do cobre em águas com qualidade modificada. A qualidade da água influencia a toxicidade do cobre e modifica consideravelmente a capacidade de excreção deste metal pelas brânquias (Taylor et al., 1996). Por exemplo, Heath (1995) observou que “bluegill” expostos ao cobre durante hipóxia apresentaram hiperglicemia e redução nas concentrações plasmáticas de Na⁺ e K⁺.

Geest et al. (2001) estudaram os efeitos das combinações de hipóxia e tóxicos, como o cobre e a diazinon, em efemeróptera, *Ephoron virgo*. Estes autores concluíram que as combinações de tóxicos e baixos níveis de OD podem ter impactos maiores do que se espera quando os resultados são baseados nos efeitos adversos dos fatores individuais e que o padrão dos testes de toxicidade sozinhos podem ser insuficientes para determinar o impacto das atividades humanas no estado ecológico de comunidades aquáticas.

CONCLUSÕES:

1. As avaliações do metabolismo oxidativo, do metabolismo intermediário e dos parâmetros hematológicos dos pacus expostos ao cobre em águas normóxicas e em pH neutro, permitiu verificar que houve alterações destes biomarcadores. A exposição à 2.0Cu mostrou alterar de forma mais significativa os biomarcadores, mesmo sendo sua absorção menos efetiva, mostrando possíveis alterações indiretas desta exposição no comportamento dos biomarcadores. Porém, as alterações não foram dose-dependentes, mostrando não haver relação linear entre os níveis de cobre na água e os biomarcadores avaliados.

2. A exposição do pacu ao meio ácido alterou os biomarcadores do metabolismo oxidativo, sendo as respostas tecido-específicas. Os biomarcadores avaliados no plasma foram alterados em decorrência da exposição ao meio ácido, sugerindo que o pacu buscou elevar a captação e transporte de oxigênio. Por outro lado, as alterações do metabolismo glicolítico sugerem que o pacu em hipóxia diminuiu o metabolismo, visando reverter a queda no pH plasmático e restabelecer o equilíbrio iônico. A metalotionina não foi responsiva às alterações de pH do meio.

3. A exposição do pacu à hipóxia alterou os biomarcadores do metabolismo oxidativo, sendo as respostas tecido-específicas. Os biomarcadores avaliados no plasma foram alterados em decorrência da exposição à hipóxia, sugerindo que o pacu buscou elevar a captação e transporte de oxigênio. Os dados sugerem que o pacu respondeu à exposição à hipóxia diminuindo o metabolismo, na tentativa de reverter a queda no pH plasmático e restabelecer o equilíbrio iônico. A metalotionina não foi responsiva às alterações de oxigênio dissolvido.

4. Os efeitos dos níveis de cobre no metabolismo oxidativo do pacu dependem do nível do pH da água. Porém, as interações observadas foram tecido-específicas, sendo o músculo branco um tecido menos oxidativo, porém mais susceptível ao estresse oxidativo por possuir menor atividade das enzimas antioxidantes. A atividade da GSH-Px mostrou interação somente no músculo branco, sendo que no fígado e no músculo vermelho esta enzima apresentou atividade semelhante em resposta aos níveis de cobre, em pH neutro e ácido. O eritrócito, a hemoglobina, a proteína plasmática, a concentração de metalotionina branquial e a concentração plasmática de cobre mostraram que os efeitos dos níveis de cobre não dependem do pH da água no comportamento destes biomarcadores. Os demais biomarcadores avaliados foram influenciados pelos níveis de cobre e pH aquáticos, demonstrando haver interação entre estes, modificando o padrão de resposta em pH neutro e ácido. A exposição ao cobre em pH ácido mostrou-se, em geral, ser mais prejudicial que a exposição em pH neutro.

5. Os efeitos dos níveis de cobre no metabolismo oxidativo do pacu dependem do nível de oxigênio dissolvido na água. Porém, as interações observadas foram tecido-específicas. A atividade da SOD, GSH-Px e CAT no músculo branco apresentaram atividade semelhante em resposta aos níveis de cobre, em normóxia e hipóxia. A concentração de metalotionina branquial mostrou que os efeitos dos níveis de cobre não dependem do oxigênio dissolvido na água no comportamento deste biomarcador. Os demais biomarcadores avaliados foram influenciados pelos níveis de cobre e oxigênio dissolvidos, demonstrando haver interação entre estes, modificando o padrão de resposta em normóxia e em hipóxia. A exposição ao cobre em hipóxia mostrou-se, em geral, ser mais prejudicial que a exposição em normóxia.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

Adelman, I.R., Smith, L.L., 1972. Toxicity of hydrogen sulfide to goldfish (*Carassius auratus*) as influenced by temperature, oxygen, and bioassay techniques. J. Fish. Res. Board Can. 29, 9, 1309-1317.

Aebi, H., 1974. Methods of Enzymatic Analysis. v.1, 2, 3, 4. 2th ed. Bergmeyer, H.U. (Eds). Academic Press, London, p. 137-158.

Affonso, E.G., Polez, V.L.P., Corrêa, C.F., Mazon, A.F., Araujo, M.R.R., Moraes, G., Rantin, F.T., 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. C 133, 375-382.

Ahmad S., 1995. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman & Hall, New York. 61p.

Aksne, A., Njaa, L.R., 1981. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. Comp. Biochem. Physiol. B 69, 893-896.

Allen, H.E., D.J. Hansen., 1996. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. Water Environ. Res. 68, 42-54.

Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Hochachka, P.W., 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of an under-explored "goldmine". In: Hochachka, P.W., Lutz, P.L., Sick, T., Rosenthal, M., Van den Thillart, G. (Eds.), Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation. CRC Press, Boca Raton, pp. 435-445.

Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Walker, I., 1999. Long-term and short-term adaptation to varying oxygen levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), Biology of Tropical Fishes. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, pp. 185-206.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Review. Aquat. Toxicol. 76, 160-202.

Andrew, R.W., Biesinger, K.E., Glass, G.E., 1977. Effects of inorganic complexation on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. Water Res. 11, 309-315.

Andros, J.D., Garton, R.R., 1980. Acute lethality of copper, cadmium, and zinc to northern squawfish. Trans. Am. Fish. Soc. 109, 235-238.

Ansaldo, M., Luquet, C.M., Evelson, P.A., Polo, J.M., Llesuy, S., 2000. Antioxidant levels from different Antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. Polar Biol. 23, 160-165.

- Aragão, M.A., Araújo, R.P.A., 2006. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: Zagatto, P.A., Bertoletti, E. (Eds.), *Ecotoxicologia Aquática. Métodos e Aplicações*. Rima, São Carlos, pp. 117-152.
- Aragão, M.A., Buratini, S.V., Bertoletti, E., 2003. Total Hardness of surface waters in São Paulo State (Brazil). *Acta Limnol. Bras.* 15, 1, 15-18.
- Asknes, A., Njaa, L.R., 1981. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B* 69, 893-896.
- Atli, G., Alptekin, O., Tükel, S., Canli, M., 2006. Response to catalase activity to Ag⁺, Cd⁺, Cr⁺ and Zn⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 218-224.
- Avcı, A., Kaçmaz, M., Durak, I., 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 101-105.
- Baer, K.N., Thomas, P., 1990. Influence of capture stress, salinity and reproductive status on zinc associated with metallothionein-like-proteins in the liver of three teleost species. *Mar. Environ. Res.* 29, 277-287.
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.* 34, 151-162.
- Baker, R.T.M., Handy, R.D., Davies, S.J., Snook, J.C., 1998. Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the gray mullet, *Chelon labrosus*. *Mar. Environ. Res.* 45, 357-365.
- Barcarolli, I.F., Martinez, C.B.R., 2004. Effects of Aluminium in acid water on hematological and physiological parameters of neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 639-646.
- Barry, H. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 52, 253-265.
- Battaglini, P., Andreozzi, G., Antonucci, R., Arcamone, N., De Girolamo, P., Ferrara, L., Gargiulo, G., 1993. The effects of cadmium on the gills of the goldfish *Carassius auratus* L.: metal uptake and histochemical changes. *Comp. Biochem. Physiol. C* 104, 239-247.
- Beaumont, M.W., Butler, P.J., Taylor, E.W., 1995a. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to sub-lethal copper concentrations in soft, acid water and its effect upon sustained swimming performance. *Aquat. Toxicol.* 33, 45-63.
- Beaumont, M.W., Butler, P.J., Taylor, E.W., 1995b. Plasma ammonia concentration in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to sublethal copper in soft, acidic water and its relationship to decreased swimming performance. *J. Exp. Biol.* 198, 2213-2220.

- Beaumont, M.W., Butler, P.J., Taylor, E.W., 2000. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle and membrane potential. *Aquat. Toxicol.* 51, 259-272.
- Begum, G., Vijayaraghavan, S., 1999. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Environ. Res. A* 80, 80-83.
- Benson, W.H., Bear, K.N., Watson, C.F., 1990. Metallothionein a biomarker of environmental metal contamination: species-dependent effects. In: Mc-Carthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis, Boca Raton, pp. 255-265.
- Berner, R.A., 1981. A new geochemical classification of sedimentary environments. *J. Sed. Petrol.* 51, 2, 359-365.
- Blust, R., Fontaine, A., Declair, W., 1991. Effect of hydrogen ions and inorganic complexing on the uptake of copper by the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76, 273-282.
- Bogdanova, A., Grenacher, B., Nikinmaa, M., Gassmann, M., 2005. Hypoxic response of Na⁺/K⁺-ATPase in trout hepatocytes. *J. Exp. Biol.* 208, 1793-1801.
- Bogdanova, A., Ogunshola, O.O., Bauer, C., Nikinmaa, M., Gassmann, M., 2003a. Molecular mechanisms of oxygen-induced regulation of Na⁺/K⁺ pump. *Adv. Exp. Med. Biol.* 536, 231-238.
- Bogdanova, A.Y., Ogunshola, O.O., Bauer, C., Gassmann, M., 2003b. Pivotal role of reduced glutathione in oxygen-induced regulation of the Na⁺/K⁺ pump in mouse erythrocyte membranes. *J. Membr. Biol.* 195, 33-42.
- Bogdanova, A.Y., Virkki, L.V., Gusev, G.P., Nikinmaa, M., 1999. Copper effects on ion transport across lamprey erythrocyte membrane: Cl⁻/OH⁻ exchange induced by cuprous ions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159, 204-213.
- Bopp, S.K., Abicht, H.K., Knauer, K., 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat. Toxicol.* 86, 197-204.
- Borghetti, J.R., Canzi, C., 1993. The effect of water temperature and feeding rate on the growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in cages. *Aquaculture* 114, 93-101.
- Borgmann, U., 1983. Metal speciation and toxicity of free metal ions to aquatic biota. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Advances in Environmental Science and Technology*. Wiley, New York, pp. 47-72.
- Borgmann, U., Ralph, K.M., 1983. Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. *Water Res.* 17, 1697-1703.
- Borković, S.S., Šaponjić, J.S., Pavlović, S.Z., Blagojević, D.P., Milošević, S.M., Kovačević, T.B., Radojičić, R.M., Spasić, M.B., Zikić, R.V., Saičić, Z.S., 2005. The activity of antioxidant

- defenses enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141, 366-374.
- Boveris, A., Chance, B., 1976. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Boyd, C.E., 1990. Water quality in ponds for aquaculture. Bermington Publishing, Bermingham. 482 p.
- Boyd, C.E., 1998. Water quality for pond aquaculture. International center for aquaculture and aquatic environments Alabama Agricultural Experiment Station. Auburn University. Alabama. Research and development series n. 43. 37p.
- Boyd, C.E., Massaut, L., 1999. Risk associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquac. Eng.* 20,113-132.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bragigand, V., Berthet, B., 2003. Some methodological aspects of metallothionein evaluation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 134, 55-61.
- Braum, E., Junk, W.J., 1982. Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. *Int. Ver. Ges. Hydrobiol.* 67, 869-886.
- Bremner, I., 1998. Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1069S-1073S.
- Bremner, I., 1991. Metallothionein and copper metabolism in liver. In: Riordan, J.F., Vallee, B.L. (Eds.), *Methods in Enzymology. Metallobiochemistry, Part B: Metallothionein and related molecules*, v. 205. Academic Press Inc., San Diego, pp. 584-591.
- Brix, K.V., DeForest, D.K., Adams, W.J., 2001. Assessing acute and chronic copper risk to freshwater aquatic life using species sensitivity distributions for different taxonomic groups. *Enviro. Toxic. Chem.* 20, 1846-1856.
- Brooks, G.A., 2000. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 32, 790-799.
- Brouwer, M., Winge, D.R., Gray, W.R., 1989. Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster *Homarus americanus*. *J. Inorg. Biochem.* 35, 289-303.
- Brown, S.B., Evans, R.E., Majewski, H.S., Sangalang, G.B., 1990. Responses of plasma electrolytes, thyroid hormones, and gill histology in Atlantic salmon (*Salmo salar*) to acid and limed river water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2431-2440.
- Buchwalter, D.B., Linder, G., Curtis, L.R., 1996. Modulation of cupric ion activity by pH and fulvic acid as determinants of toxicity in *Xenopus laevis* embryos and larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 568-573.

- Buck, L.T., Hochachka, P.W., 1993. Anoxic suppression of Na⁺-K⁺-ATPase and constant membrane potential in hepatocytes: support for channel arrest. *Am. J. Physiol.* 265, R1020-R1025.
- Buck, W.B., 1978. Copper/molybdenum toxicity in animals. In: Oehme, F.W. (Ed.), *Toxicity of Heavy Metals in the Environment*, part 1, Marcel Dekker, New York, pp. 491-515.
- Buckley, J.A., 1983. Complexation of copper in the effluent of a sewage treatment plant and an estimate of its influence on toxicity to coho salmon. *Water Res.* 17, 1929-1934.
- Buerttner, G.R., 1993. The packing order of free radical and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535-543.
- Buratini, S.V., Brandelli, A., 2006. Bioacumulação. In: Zagatto, P.A., Bertolotti, E. (Eds), *Ecotoxicologia Aquática. Métodos e Aplicações*. Rima, São Carlos, pp. 55-88.
- Butler P.J., Taylor E.W., Capra M.F., Davidson W., 1978. The effect of hypoxia on the level of circulating catecholamines in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *J Comp. Physiol. B* 127, 325-330.
- Butler, P.J., Day, N., Namba, K., 1992. Interactive effects of seasonal temperature and low pH on resting oxygen uptake and swimming performance of adult brown trout (*Salmo trutta*). *J. Exp. Biol.* 165, 195-212.
- Button, S.B., Hostetler, H.P., Mair, D.M., 1977. Copper dispersal in water supply reservoir. *Water Res.* 11, 539-544.
- Cai, L., Satoh, M., Tohyama, C., Cherian, M.G., 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 132, 85-98.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295-311.
- Campbell, H.A., Handy, R.D., Nimmo, M., 1999. Copper uptake kinetics across the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) measured using an improved isolated perfused head technique. *Aquat. Toxicol.* 46, 177-190.
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons, New York, pp. 45-102.
- Campbell, P.G.C., Stokes, P.M., 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 42, 2034-2049.
- Canli, M., Stagg, R.M., Rodger, G., 1997. The induction of metallothionein in tissues of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to cadmium, copper and zinc: the relationships between metallothionein and the metals. *Environ. Pollut.* 96, 343-350.

- Carbonell, G., Tarazona, J.V., 1993. A proposed method to diagnose acute copper poisoning in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ. Suppl.* 1993, 1329-1334.
- Carbonell, G., Tarazona, J.V., 1994. Toxicokinetics of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 29, 213-221.
- Carvalho, C.S. 2003. Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre na sangue e fígado de curubatá, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 107 p.
- Carvalho, C.S., Araújo, H.S.S., Fernandes, M.N., 2004. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 137, 2, 225-234.
- Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2006. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture.* 251, 109-117.
- Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 437-442.
- Casillas, E., Smith, L.S., 1977. Effect of stress on blood-coagulation and hematology in rainbow-trout (*Salmo Gairdneri*). *J. Fish Biol.* 10, 481-491.
- Cassee, F.R., Groten, J.P., van Bladeren, P.J., Feron, V.J., 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 73-101.
- Cassini, A., Favero, M., Albergoni, V., 1993. Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and whiteblooded antarctic teleost fish, *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106, 333-336.
- Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Evangelisti, V., Cerratto, N., Viarengo, A., 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131, 447-455.
- Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter response in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 83-91.
- Chakoumakos, C., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1979. Toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH and hardness. *Environ. Sci. Technol.* 13, 213-218.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-602.
- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., Schumacker, P.T., 1998. Mitochondrial reactive oxygen species triggers hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11715-11720.

- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumaker, P.T., 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia. *J. Biol. Chem.* 275, 25130-25138.
- Chandel, N.S., Shumacker, P.T., 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J. Appl. Physiol.* 88, 1880-1889.
- Chow, C.K., 1979. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 1066-1081.
- Christensen, G.M., McKim, J.M., Brungs, W.A., Hunt, E.P., 1972. Changes in the blood of the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus* Lesueur) following short and long term exposure to copper (II). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23, 417-427.
- Claiborne, J.B., Choe, K.P., Morrison-Shetlar, A.I., Weakley, J.C., Havird, J., Freiji, A., Evans, D.H., Edwards, S.L., 2008. Molecular detection and immunological localization of gill Na⁺/H⁺ exchanger in the dogfish (*Squalus acanthias*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, 1092-1102.
- Claiborne, J.B., Evans, D.H., 1992. Acid-base balance and ion transfers in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) during hypercapnia: a role for ammonia excretion. *J. Exp. Zool.* 261, 9-17.
- Çoğum, Y. H., Kargin, F., 2004. Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere* 55, 277-282.
- Comellas, A.P., Dada, L.A., Lecuona, E., Pesce, L.M., Chandel, N.S., Quesada, N., Scott Budinger, G.R., Strous, G.J., Ciechanover, A., Sznajder, J.I., 2007. Hypoxia-Mediated Degradation of Na,K-ATPase via Mitochondrial Reactive Oxygen Species and the Ubiquitin-Conjugating System. *Circ. Res.* 98, 1314-1322.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (Cetesb), 2007. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2006 / CETESB. São Paulo: CETESB.
- Connolly, N.M., Crossland, M.R., Pearson, R.G., 2004. Effect of low dissolved oxygen on survival, emergence, and drift of tropical stream macroinvertebrates. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 23, 251-270.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), 2006. Resoluções vigentes publicadas entre julho de 1984 e maio de 2006. Brasília.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L. 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 279, 1-20.
- Correia, A.D., Livingstone, D.R., Costa, M.H., 2002. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Mar. Environ. Res.* 54, 357-360.

- Cosson, R.P., Amiard, J.C., 2000. Use of metallothioneins as biomarkers of exposure to metals. In: Lagadic, L., Cauquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment. Science Publisher Inc., Enfield, NH, USA, pp. 79-111.
- Cousins, R.J., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65, 238-309.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Lazzari, R., Duarte, M.F., Morsch, V.M., Pippi, A.L., Vieira, A.P., 2006. Effects of Clomazone Herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 48-55.
- Crouch, R.K., Gandy, S.E., Kimsey, G., Galbraith, R.A., Galbraith, M.P., Buse, M.G., 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 30, 235-241.
- Cusimano, R.F., Brakke, D.F., Chapman, G.A., 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 43, 1497-503.
- Cyriac, P.J., Antony, A., Nambisan, N.K., 1989. Hemoglobin and hematocrit values in the fish *Oreochromis mossambicus* (Peters) after short term exposure to copper and mercury. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 315-320.
- Dang, Z. 2000. Adaptive stress responses in fish gills. PhD Thesis. Catholic University of Nijmegen, Nijmegen, Netherlands. 183p.
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., 1999. Wendelaar Bonga, S.E., Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water, *Am. J. Physiol.* 277, R320-R331.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., Vernet, G., 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochim. Biophys. Acta.* 1573, 4-8.
- Dautremepuits, C., Paris-Palacios, S., Betoulle, S., Vernet, G., 2004. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio*) induced by copper and chitosan. *Comp. Biochem. Physiol. C* 137, 325-333.
- Davey, E.W., Morgan, M.J., Ekickson, S.J., 1973. A biological measurement of copper complexation capacity of seawater. *Limnol. Oceanogr.* 18, 993-997.
- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *Life* 50, 279-289.
- Day, N., Butler, P.J., 1996. Environmental acidity and white muscle recruitment during swimming in the brown trout (*Salmo trutta*). *J. Exp. Biol.* 199, 1947-1959.
- De Boeck, G., Meeus, W., Coen, W.D., Blust, R., 2004. Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*), and gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquat. Toxicol.* 70, 179-188.
- De Boeck, G., Vlaeminck, A., Balm, P.H.M., Lock, R.A.C., De Wachter, B., Blust, R., 2000. Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term copper exposure: interaction between Cu²⁺ and plasma cortisol elevation. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 374-381.
- DeBoeck, G., Van der Ven, K., Meeus, W., Blust, R., 2007. Sublethal copper exposure induces respiratory stress in common and gibel carp but not in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. C* 144, 380-390.
- Degroot, H., Littauer, A., 1989. Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. *Free Radical. Biol. Med.*, Elmsford, 6, 541-551.
- Depledge, M.H., 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C., Leonzio, C. (Eds.), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 261-285.
- Desrochers, P., Hoffert, J.R., 1983. Superoxide dismutase provides protection against the hyperoxia in the retina of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 76, 241-247.
- Dethloff, G.M., Schlenk, D., Hamm, J.T., Baileyà, H.C., 1999. Alterations in Physiological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with Exposure to Copper and Copper/Zinc Mixtures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 253-264.
- Devlin, T.M., 1997. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 4th ed. Edgard Blucher, São Paulo. 1007
- Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P., 1993. Effects of black rock harbour sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.* 26, 1-22.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.
- Dias, C.F.S. 2003. Retenção do cátion sulfato de cobre nos compartimentos biótico e abiótico de mesocosmos com sistema de fluxo contínuo de água. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 66 f.
- Dodge, E.E., Theis, T.L., 1979. Effect of chemical speciation on the uptake of copper by *Chironomus tentans*. *Environ. Sci. Technol.* 13, 1287-1288.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of the cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.

- Dubois, M.G., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-358.
- Duncan, W.L.P. 1998. Estresse metabólico e dano celular em *Colossoma macropomum* e *Hoplosternum littorale* exposto ao petróleo. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, 117 p.
- Dunn, J.F., Hochachka, P.W., 1986. Metabolic responses of trout (*Salmo gairdneri*) to acute environmental hypoxia. *J. Exp. Biol.* 123, 229-242.
- Duquesne, S.J., 1992. Bioaccumulation métallique et métallothioneins chez trois espèces de poissons provenant du littoral Nord-Pas de Calais. Thèse d' Université des Sci et des Tec de Lille. 307p.
- Eddy, F.B., 1985. Uptake and loss of potassium by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in fresh water and dilute sea water. *J. Exp. Biol.* 118, 277-286.
- Effler, S.W., Litten, S., Field, S.D., Tong-Ngork, T., Hale, F., 1980. Whole lake response to low level copper sulfate treatment. *Water Res.* 14, 1489-1499.
- English, T.E., Storey, K.B., 2003. Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Biol.* 206, 2517-2524.
- Erickson, R.J., Benoit, D.A., Mattson, V.R., 1987. A Prototype Toxicity Factors Model For Site-Specific Copper Water Quality Criteria, revised September 5, 1996, United States Environmental Protection Agency, Environmental Research. Laboratory-Duluth, Duluth, MN.
- Erickson, R.J., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Nelson, H.P.Jr., Leonard, E.N., 1996. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 181-193.
- Erickson, S.F., Maloney, T.E., Gentile, J.H., 1970. Effect of nitrilotriacetic acid on the growth and metabolism of estuarine phytoplankton. *J. Water Pollut. Control. Fed.* 42, 329-335.
- Fabisiak, J.P., Tyriun, V.A., Tyurina, Y.Y., Borisenko, G.G., Korotaeva, A., Pitt, B.R., Lazo, J.S., Kagan, V.E., 1999. Redox regulation of copper-metallothionein. *Arch. Biochem. Biophys.* 363, 171-181.
- Fehér, J., Csomós, G., Vereckei, A., 1987. Free radical reactions in medicine. Springer-Verlag, Berlin, 117 p.
- Ferreira, A.B.G, Amadeu, S.L., Soares, V. M., 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 89, 28-39.
- Fitzgerald, J.P., 1992. Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol B* 101, 111-114.

- Flik, G., Klaren, P.H.M., Schoenmakers, T.J.M., Bijvelds, M.J.C., Verbost, P.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1996. Cellular calcium transport in fish: unique and universal mechanisms. *Physiol. Zool.* 69, 403-417.
- Florence, T.M., Morrison, G.M., Stauber, J.L., 1992. Determination of trace element speciation in aquatic toxicity. *Sci. Total Environ.* 125, 1-13.
- Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J., 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1981. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung and lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* 256, 10986-10992.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982. Biology of disease: free radicals tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412-426.
- Fridovich, I., 1975. Superoxide and evolution. *Horiz. Biochem. Biophys.* 1, 37.
- Gaetke, L.M., Chow, C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147-163.
- Gatlin, D.M., Wilson, R.P., 1986. Dietary copper requirements of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 54, 277-285.
- Geest, H.G., Soppe, W.J., Greve, G.D., Kroon, A., Kraak, M.H.S., 2001. Combined effects of lowered oxygen and toxicants (copper and diazinon) on the mayfly *Ephoron virgo*. *Environm. Toxicol. Chem.* 21, 431-436.
- Gentzkon, C.J., Masen, J.M., 1942. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. of Biolog. Chemest.* 143, 531-544.
- George, S.G., Olsson, P.E., 1994. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: Kramer, K.J.M. (Ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton, pp. 151-178.
- Graham, J. B., 1990. Ecological evolutionary, and physical factors influencing aquatic animal respiration. *Am. Zool.* 30, 137-146.
- Grande, M., 1967. Effect of copper and zinc on salmonid fishes. *Proceedings International Conference on Advances in Water Pollution Research* 1, 97-111.
- Griffin, B.R., Hobbs, M.S., Gollon, J.L., 1997. Effect of waterborne copper sulfate exposure on copper content in liver and axial muscle of Channel Catfish. *J. Aquat. Anim. Health* 9, 144-150.
- Grisham, M.B., 1992. *Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine*. Austin: R.G., Landes. pp 4-22.

- Grosell, M., Blanchard, J., Brix, K.V., Gerdes, R., 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquatic Toxicol.* 84, 162-172.
- Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini, A., 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 133, 287-303.
- Gül, S., Belge-Kurutas, E., Yildiz, E., Sahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.* 30, 605-609.
- Guy, R. D., Kean, A. R., 1980. Algae as a chemical speciation monitor I. A comparison of algal growth and computer calculated speciation. *Water Res.* 14, 891-899
- Hafeman, D.G., Sunde, R.A., Hoekstra, W.G., 1974. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 104, 580-587.
- Hai, D.Q., Vargas, S.I., Matkovics, B., 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 117, 83-88.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C., 1985. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 501-514.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford Clarendon Press, New York. 543 p.
- Hamer, D.H., 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
- Han, F.X., Hargreaves, J.A., Kingery, W.L., Huggett, D.B., Schlenk, D.K., 2001. Accumulation, distribution and toxicity of copper in sediments of catfish ponds receiving periodic copper sulfate applications. *J. Environ. Qual.* 30, 912-919.
- Hanazato, T., Dodson, S.I., 1995. Synergistic effects of low-oxygen concentration, predator kairomone, and a pesticide on the cladoceran *Daphnia-Pulex*. *Limnol. Oceanogr.* 40, 700-709.
- Handy, R.D., Eddy, F.B., Baines, H., 2002. Sodium-dependent copper uptake across epithelia: a review of rationale with experimental evidence from gill and intestine. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1566, 104-115.
- Hansen, B.H., Rømme, S., Garmo, Ø.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 263-274.

- Hardewig, I., Van Dijk, P.L.M., Pörtner, H.O., 1998. High-energy turnover at low temperatures: recovery from exhaustive exercise in Antarctic and temperate eelpouts. *Am. J. Physiol.* 274, R1789-R1796.
- Harris, Z.L., Gitlin, J.D., 1996. Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 5836-5841.
- Harrower, J.R., Brown, C.H., 1972. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.* 32, 5, 709-711.
- Hartwell, S.I., Jin, J.H., Cherry, D.S., Cairns, J., 1989. Toxicity versus avoidance response of golden shiner, *Notemigonus crysoleucas*, to five metals. *J. Fish. Biol.* 35, 447-456.
- Hasspieler, B.M., Behar, J.V., Carlson, D.B., Watson, D.E., Di Giulio, R.T., 1994a. Susceptibility of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) to oxidative stress: a comparative study. *Aquat. Toxicol.* 28, 53-65.
- Hasspieler, B.M., Behar, J.V., DiGiulio, R.T., 1994b. Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 28, 82-90.
- Haux, C., Sjobeck, M., Larsson, A., 1981. Some toxic effects of lead on fish. In: Pickering, A.D. (Ed.), *Stress and fish*. Academic Press, New York.
- Heath, A.G., 1991. Effect of water-borne copper on physiological responses of bluegill (*Lepomis macrochirus*) to acute hypoxic stress and subsequent recovery. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 100, 559-564.
- Heath, A.G., 1995. *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Boca Raton.
- Hecht, T., Endemann, F., 1998. The impact of parasites, infections and diseases on the development of aquaculture in sub-Saharan Africa. *J. Appl. Ichthyol.* 14, 213-221.
- Heisler, N., 1989. Interaction between gas exchange, metabolism, and ion transport in animals: an overview. *Can. J. Zool.* 67, 2923-2935.
- Heisler, N., Toews, D., Holeton, G., 1988. Regulation of ventilation and acid-base status in the elasmobranch *Scyliorhinus stellaris* during hyperoxia-induced hypercapnia. *Respir. Physiol.* 71, 227-246.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: Storey, K.B., Storey, J.M. (Eds.), *Cell and Molecular Responses to Stress*. v.2. Elsevier, Amsterdam, pp. 263-287.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1993. Oxidative inactivation of GST from a freezing tolerant reptile. *Mol. Cell. Biochem.* 124, 149-158.

- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1998. Role of antioxidants defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. Mol. Cell Biochem. 189, 79-89.
- Hidalgo, M.C., Exposito, A., Palma, J.M., Higuera, M., 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Int. J. Biochem. Cell. B 34, 183-193.
- Hochachka, P.W., 1961. Glucose and acetate metabolism of fish. Can. J. Zool. 56, 717-729.
- Hochachka, P.W., 1980. Living without Oxygen. Harvard University Press, Cambridge, England, pp. 100-116.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 1973 Biochemical Adaptation. Princeton Univ. Press, Princeton. 538p.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 1984. Biochemical Adaptation. Princeton University Press, NJ, pp. 85-144.
- Hogstrand, C., Lithner, G., Haux, C., 1991b. The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. Pharmacol. Toxicol. 69, 492- 501.
- Howarth. R. S., Sprague, J. B., 1978. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. Water Res. 12, 455-462.
- Hunt, D.T.E., 1987. Trace Metal Speciation and Toxicity to Aquatic Organisms - A Review. Technical. Report 247, Water Research Centre, Marlow, Bucks, United Kingdom.
- Hussain, S., Anner, R.M., Anner, B.M., 1995. Metallothionein protects purified Na⁺:K⁺-ATPase from toxicity in vitro. In Vitro Toxicol. 8, 25-30.
- Hyne, R.V., Maher, W.A., 2000. Macroinvertebrate Biomarkers: Links to Toxicosis and Changes in Population or Communities. Cooperative Centre for Freshwater Ecology. University of Canberra. Australia. Cooperative Research Centre for Freshwater Ecology. Technical Report ScD5. Disponível em: <http://enterprise.canberra.edu.au>.
- Inglis, A., Davis, E.L., 1972. Effects of water hardness on the toxicity of several organic and inorganic herbicides to fish. Technical Paper No. 67. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- Isani, G., Cattani, O., Carpena, E., Cortesi, P., 1994. Kinetic properties of liver and muscle pyruvate kinase of a marine teleost, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Comp. Biochem. Physiol. B 107, 616-624.
- Jackson, T.A., 1984. Effects of inorganic cadmium, zinc, copper, and mercury on methylmercury production in polluted lake sediments. Evidence for selective inhibition and stimulation of microbial species based on variations in heavy metal tolerance. In: Nriagu, J.O. (Ed.), Environmental Impacts of Smelters. John Wiley & Sons, New York, USA. 551-578 pp.

- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Jamnik, P., Roš, M., 2008. Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 61-68.
- Jensen, F.B., Nikinmaa, M., Weber, R.E., 1993. Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (Eds.), *Fish Ecophysiology*. Chapman. & Hall, London, pp. 161-179.
- Jiang, Z.Y., Wollard, A.C.S., Wolf, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853-856.
- Jobling, M., 1994. *Fish Bioenergetics*. Edmondsbury Press, London. 300p.
- Kadiiska, M.B., Hanna, P.M., Jordan, S.J., Mason, R.P., 1993. Electron spin resonance evidence for free radical generation in copper-treated vitamin E - and selenium - deficient rats: in vivo spin-trapping investigation. *Mol. Pharmacol.* 44, 222-227.
- Kägi, J.H.R., 1993. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: Suzuki, K.T., Imura, N., Kimura, M. (Eds.), *Metallothioneins III: Biological Roles and Medical Implications*. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 29-55.
- Kägi, J.H.R., Nordberg, M., 1979. *Metallothionein*. Birkhauser, Verlag Basel. 152p
- Kil, I.S., Shin, S.W., Yeo, H.S., Lee, Y.S., Park, J., 2006. Mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase protects cadmium-induced apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 70, 1053-1061.
- Kolok, A.S., Hartman, M.M., Sershan, J., 2002. The physiology of copper tolerance in fathead minnows: insight from an intraspecific, correlative analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1730-1735.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radicals inhibit catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754.
- Kramer, J.H., Misik, V, Weglicki, W.B., 1994. Lipid peroxidation derived free radical production and post-ischemic myocardial reperfusion injury. *Ann. NY Acad. Sci.* 723, 180-196.
- Krogh, A., Lethch, I., 1919. The respiratory function of blood in fishes. *J. Physiol.* 52, 288.
- Kruger, N.J., 1994. The Bradford method for protein quantification. *Meth. Mol. Biol.* 32, 9-15.
- Kubitza, F., 1998. *Qualidade da água na produção de peixes*. Campo Grande, MS. 60 p.
- Lacher, T.E., Goldstein, M.I., 1997. Tropical ecotoxicology, status and needs. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 100-111.
- Lackner, R., 1998. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp. 203-224.

- Larsson, A., Haux, C., Sjöbeck, M., 1985. Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 9, 250-281.
- Laurén, D.J., McDonald, D.G., 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Comp. Physiol. B* 155, 635-644.
- Laurén, D.J., McDonald, D.G., 1986. Influence of water hardness, pH and alkalinity on the mechanisms of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 1488-1496.
- Laurén, D.J., McDonald, D.G., 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: biochemistry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 99-104.
- Leena, S., Oommen, O.V., 2000. Hormonal control of enzymes of osmoregulation in a teleost, *Anabas testudineus* (BLOCH): an *in vivo* and *in vitro* study. *Endocr. Res.* 26, 169-187.
- Lemaire, P., Forlin, L., Livingstone, D.R., 1996. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers (3-methylcholanthrene, b-naphtho.avone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 36, 141-160.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Ann. Rev. Physiol.* 68, 253-278.
- Leung, K.M.Y., Furness, R.W., 2001. Metallothionein induction and condition index of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) exposed to cadmium and hydrogen peroxide. *Chemosphere* 44, 321-325.
- Leung, K.M.Y., Svavarsson, J., Crane, M., Morrith, D., 2002. Influence of static and fluctuating salinity on cadmium uptake and metallothionein expression by the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 274, 175-189.
- Li, J., Quabius, E.S., Wendelaar-Bonga, S.E., Flik, G., Lock, R.A.C., 1998. Effects of water-bone copper on branchial chloride cells and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquat. Toxicol.* 43, 1-11.
- Lichtenfels A.J., Lorenzi-Filho, G., Guimarães, E.T., Macchione, M., Saldiva, P.H., 1996. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. *J. Comp. Path.* 115, 47-60.
- Lin, H., Randall, D.J., 1990. The effect of varying water pH on the acidification of expired water in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 149, 149-160.
- Linde, A.R., Sánchez-Galán, S., Vallez-Mota, P., Garcia-Vazquez, E., 2001. Metallothionein as bioindicator of fresh water metal pollution: European eel and brown trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 60-63.
- Linder, M.C., 2001. Copper and genomic stability in mammals. *Mutat. Res.* 475, 141-152.

- Ling, G.N., 1981. Oxidative phosphorylation and mitochondrial physiology: a critical review of chemiosmotic theory, and reinterpretation by the association-induction hypothesis. *Physiol. Chem. Phys.* 13, 1, 26-29.
- Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. *J. Chem. Biotechnol.* 57, 195-211.
- Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120, 43-49.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
- Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L.D., Porte, C., Fitzpatrick, P.J., Forlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N., Goldfarb, P., 1995. Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zostersessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy, biochemical studies. *Mar. Environ. Res.* 39, 235-240.
- Lloyd, R., 1961. Effect of dissolved oxygen concentration on several poisons to Rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). *J. Exp. Biol.* 38, 447.
- Lopes, P.A., Pinheiro, T., Santos, M.C., Mathias, M., Colares-Pereira, M.J. and Viegas-Crespo, A.M., 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Sci. Total Environ.* 280, 153-163.
- Lorz, H.W., Mcpherson, B.P., 1976. Effects of copper or zinc in fresh water on adaptation to sea water and ATPase activity and the effects of copper on migratory disposition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish Res. Bord. Can.* 33, 2023-2030.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R100-R107.
- Machala, M., Petrivalský, M., Nezveda, K., Ulrich, R., Dusek, L., Piacka, V., Svobodová, Z., 1997. Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants-a field study. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1410-1416.
- Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 630-648.
- Marcon, J.L., Wilhem Filho, D., 1999. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from the Amazon. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123, 257-263.
- Margoshes, M., Vallee, B.L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814.

- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75-88.
- Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons Ltd., London, pp. 479-608.
- Mastin, B.J., Rodgers, J.H. Jr., 2000. Toxicity and bioavailability of copper herbicides (Clearigate, Cutrine-Plus, Copper sulfate) to freshwater animals. *Arch. Environ. Toxicol.* 39, 445-451.
- Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83-104.
- Mathiessen, P., 2000. Biological effects quality assurance in monitoring programs (BELQUALM). Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Remembrance Avenue, Burham-on-Crouch, Essex CM0 8HA, UK. 24 p.
- Mayer, O.H., Leach, A., Kling, P., Olsson, P., Hogstrand, C., 2003. Activation of the rainbow trout metallothionein – A promoter by silver and zinc. *Comp. Biochem. Physiol. B* 134, 181-188.
- Mazeaud, F., Maral, J., Michelson, A.M., 1979. Distribution of superoxide dismutase and glutathione peroxide in the carp: erythrocytic manganese SOD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 1161-1168.
- Mazon, A.F. 1997. Efeito dos íons cobre sobre curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 163p.
- Mazon, A.F., Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002a. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.* A 88, 52-63.
- Mazon, A.F., Fernandes, M.N., 2001. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 797-804.
- Mazon, A.F., Fernandes, M.N., Nolasco, M.A., Severi, W., 1998. Functional morphology of gills and respiratory area two active rheophilic fish species, *Plagioscion squamosissimus* and *Prochilodus scrofa*. *J. Fish. Biol.* 52, 50-61.
- Mazon, A.F., Fernandez, M.N., 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Phrochilodontidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 797-804.
- Mazon, A.F., Monteiro, E.A.S., Pinheiro, G.H.D., Fernandes, M.N., 2002b. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Braz. J. Biol. A* 62, 621-631.

- McCarthy, J.F., Shugart, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 3-14.
- McCormick, S. D., 1995. Hormonal control of gill Na⁺/K⁺-ATPase and chloride cell function. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. (Eds.), *Fish Physiology*. v.14: Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation. Academic Press, New York, pp. 285-316.
- McDermott, B.M., Flatt, P.R., Strain, J.J., 1994. Effects of copper deficiency and experimental diabetes on tissue antioxidant enzyme levels in rat. *Ann. Nutr. Metab.* 38, 5, 263-269.
- McDonald, D.G., Reader, J.P., Dalziel, T.R.K., 1989. The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. In: Morris, R., Taylor, E.W., Brown, D.J.A., Brown, J.A. (Eds.), *Acid Toxicity and Aquatic Animals*. Cambridge University Press, New York, pp. 221-242.
- McDonald, D.G., Wood, C.M., 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin J.C., Jensen, F.B. (Eds), *Fish ecophysiology*. Chapman and Hall, London, pp. 297-321.
- McGeer, J.C., Playle, R.C., Wood, C.M., Galvez, F., 2000. A physiologically based biotic ligand model for predicting the acute toxicity of waterborne silver to rainbow trout in freshwaters. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4199-4207.
- McKim, J.M., 1994. Physiological and biochemical mechanisms that regulate the accumulation and toxicity of environmental chemicals in fish. In: Hamelink, J.L., Landrum, P.F., Bergman, H.L., Benson, W.H. (Eds.), *Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions*. Lewis, Boca Raton, pp. 179-202.
- McKim, J.M., Christensen, G.M., Hunt, E.P., 1970. Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short-term and long-term exposure to copper. *J. Fish. Res. Board Can.* 27, 1883-1889.
- Menezes, A.C.L. 2005. Toxicidade do cobre sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 68p.
- Miller, T.G., Mackay, W.C., 1980. The effects of hardness, alkalinity and pH of test water on the toxicity of copper to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.* 14, 129-133.
- Milligan, C.L., Wood, C.M., 1982. Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo Gairdneri*. *J. Exp. Biol.* 99, 397-415.
- Mills, G.C., 1959. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 234, 502-506.
- Monteiro, S.M., Mancera, J.M., Fontáinhas-Fernandes, A., Sousa, M., 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141, 375-383.

- Moore, R.L., Powell, L.J., Goodwin, D.C., 2008. The kinetic properties producing the perfunctory pH profiles of catalase-peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 900-907.
- Moraes, G., Avilez, I.M., Altran, A.E., Barbosa, C.C., 2002. Biochemical and hematological responses of the banked knife fish *Gymnotus carapo* (LINNEAUS, 1758) to environmental hypoxia. *Braz. J. Biol.* 64, 4A, 633-640.
- Moraes, G., Choudhuri, J.V., Souza, R.H.S., 1997a. Metabolic strategies of *Hypostomus regani* (cascudo), a fresh-water teleost fish under extreme environmental hypoxia. *B. Téc. CEPTA. Pirassununga.* 10, 35-44.
- Moraes, G., Chippari, A.R., Guerra, C.D.R., Gomes, L.C., Souza, R.H.S., 1997b. Immediate changes on metabolic parameters of the freshwater teleost fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu) under severe hypoxia. *B. Téc. CEPTA. Pirassununga.* 10, 45-52.
- Moraes, G., Oliveira, M.A., Rantin, F.T., 1996. The metabolic pattern changes of *Hoplias malabaricus* from normoxia to hypoxic conditions. *Rev. Brasil. Biol.* 56, 2, 191-196.
- Morris, S.M., Albright, J.T., 1984. Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in the rete mirabile and gas gland epithelium of six species of marine fishes. *J. Exp. Zool.* 232, 29-39.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Arnoult, F., Couderchet, M., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2004. Metallothionein induction in aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to herbicide isoproturon. *Environ. Toxicol.* 19, 88-93.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 1998. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 162, 125-135.
- Moura, M.A.F., Oliveira, M.I.S., Val, A.L., 1997. Effects of hypoxia on leucocytes of two Amazon fish *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale*. *Rev. UA. Sér. Ciências Biol.* 1, 13-22.
- Mozeto, A.A., Zagatto, P.A., 2006. Introdução de Agentes Químicos no Ambiente. In: Zagatto, P.A., Bertoletti, E. (Eds), *Ecotoxicologia Aquática. Métodos e Aplicações*. Rima, São Carlos, pp. 15-38.
- Murphy, P.G., Murphy, J.V., 1971. Correlation between respiration and direct uptake of DDT in the mosquito fish *Gambusia affinis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6, 581-588.
- Muto, N., Ren, H.W., Hwang, G.S., Tominaga, S., Itoh, N., Tanaka, K., 1999. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by airpumping stress, dexamethasone, and metals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 75-82.
- Nakamura, M., Yamazaki, I., 1972. One-electron transfer reactions in biochemical systems. VI. Changes in electron transfer mechanism of lipoamide dehydrogenase by modification of sulfhydryl groups. *Biochem Biophys. Acta.* 267, 249-257

- Nascimento, I.A., Pereira, S.A., Leite, M.B.N.L., 2006. Biomarcadores como Instrumentos Preventivos de Poluição. In: Zagatto, P.A., Bertoletti, E. (Eds), Ecotoxicologia Aquática. Métodos e Aplicações. Rima, São Carlos, pp. 413-432.
- Newman, S.G., 1993. Bacterial vaccines for fish. Annual review of fish diseases. v. 3. New York - USA, pp. 145-185.
- Nilsson, G.E., 2001. Surviving anoxia with the brain turned on. News Physiol. Sci. 16, 217-221.
- Nilsson, S., Grove, D.J., 1974. Adrenergic and cholinergic innervation of the spleen of the cod: *Gadus morhua*. Eur. J. Pharmacol. 28, 135-139.
- Norey, C.G., Cryer, A., Kay, J., 1990. Cadmium uptake and sequestration in the pike (*Esox lucius*). Comp. Biochem. Physiol. C 95, 217-221.
- Novelli Filho, J.L.V.B., Novelli, E.L.B., Manzano, M.A., Lopes, A.M., Cataneo, A.C., Ribas, B.O., 2000. Effect of tocopherol on superoxide radical and toxicity of cadmium exposure. Int. J. Environ. Health. Rev. 10, 125-134.
- Nriagu, J.O., 1990. A silent epidemic of environmental metal poisoning. Environ. Pollut. 30, 139-161.
- Nussey, G. 1994. The effect of copper on the blood coagulation and general haematology of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). M.Sc.-Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.
- Nussey, G., Van Vuren, J.H.J., Du Preez, H.H., 1995. Effect of copper on the hematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). Comp. Biochem. Physiol. C 111, 369-380.
- O'Connor, D.V., Fromm, P.O., 1975. The effect of methyl mercury on gill metabolism and blood parameters of rainbow trout. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 13, 4, 406-411.
- Oliveira, C.P.F. 2003. Efeito do cobre e do chumbo presentes na água de formação derivada da extração de petróleo da província petrolífera do Urucu – AM, sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1918). Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 70p.
- Olsvik, P.A., Gundersen, P., Andersen, R.A., Zachariassen, K.E., 2000. Metal accumulation and metallothionein in two populations of trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments a run-off episode. Aquat. Toxicol. 50, 301-316.
- Otero, J., Toni, P., Garcia Morato, Y.V., 1983. Cu-Zn superoxide dismutase: Metodo para su determinación. Rev. Iberoam. Invest. Clin. 2, 121-127.
- Otto, D.M.E., Moon, T.W., 1996. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. Fish Physiol. Biochem. 15, 349-358.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. Environ. Sci. Technol. 17, 342-347.

- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque R., Bin-Hazfee, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (BI. & Schn.). *Sci. Total Environ.* 309, 105-115.
- Panepucci, R.A., Panepucci, L., Fernandes, M.N., Sanches, J.R., Rantin, F.T., 2001. The effects of hypoxia and recuperation on carbohydrate metabolism in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Braz. J. Biol.* 61, 4, 547-554.
- Paris-Palacios, S., Biagiante-Risbourg, S., Fouley, A., Vernet, G., 2000. Metallothioneins in liver of *Rutilus rutilus* exposed to Cu²⁺. Analysis by metal summation, SH determination and spectrofluorimetry. *Comp. Biochem. Physiol. C* 126, 113-122.
- Paul, R.J., Colmorgen, M., Pirow, R., Chen, Y.-H., Tsai, M.-C., 1998. Systemic and metabolic responses in *Daphnia magna* to anoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120, 519-530.
- Pavanelli, G.C., Eiras, J.C., Takemoto, R.M., 1998. Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnósticos e Tratamentos. Editora da Universidade Estadual de Maringá. 264 p.
- Pavicic, J., Skreblin, M., Krebar, I., Tusek-Zidaric, M., Stegnar, P., 1994. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. *Comp. Biochem. Physiol. C* 107, 249-257.
- Pedrajas, J.R., Peinado, J., Lopez-Barea, J., 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem. Biol. Interact.* 98, 267-282.
- Pelgrom, S.M.G.J., Lock, R.A.C., Balm, P.H.M., Wendelaar-Bonga, S.E., 1995. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 32, 303-320.
- Pena, M.M.O., Lee, J., Thiele, D.J., 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutrit.* 129, 7, 1251-1260.
- Perry, S.F., Kinkead, R., Gallagher, P., Randall, D.J., 1989. Evidence that hypoxemia promotes catecholamines release during hypercapnic acidosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Respir. Physiol.* 77, 651-364.
- Petering, D.H., Goodrich, M., Hodgman, W., Krezoski, S., Weber, D., Spieler, R., Shaw, C.F., Zettereng, L., 1990. Metal-binding proteins and peptides for the detection of heavy metals in aquatic organisms. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis, Boca Raton, pp. 239-254.
- Pickering, Q.H., 1968. Some effects of dissolved oxygen concentrations upon the toxicity of zinc to the blue gill, *Lepomis macrochirus*. *Water Res.* 2, 187-194.
- Pilgaard, L., Malte, H., Jensen, F.B., 1994. Physiological effects and tissue accumulation of copper in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under normoxic and hypoxic conditions. *Aquat. Toxicol.* 29, 197-212.

- Pistole, D.H., Peles, J.D., Taylor, K., 2008. Influence of metal concentrations, percent salinity, and length of exposure on the metabolic rate of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 148, 48-52.
- Plaa, G.L., 1982. Present status: toxic substances in the environment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 1010-1016.
- Playle, R.C., Gensemer, R.W., Dixon, D.G., 1992. Copper accumulation on gills of fathead minnows: influence of water hardness, complexation and pH of the gill micro environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 381-389.
- Prasad, A.S., 1984. Trace metals in growth and sexual maturation. In: *Metabolism of Trace Metals in Man. v. I.* CRC Press, Boca Raton, pp. 79-94.
- Pratap, H.B., Wendelaar Bonga, S.E., 1990. Effect of water-borne cadmium on plasma cortisol and glucose in the cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 95, 313-317.
- Quarbius, E.S., Balm, P.H.M., Weendelaar Bonga, S.E., 1977. Interrenal stress responsiveness of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 472-482.
- Rábago-Castro, J.L., Sanchez J.G., Pérez-Castañeda. A., González-González R., 2006. Effects of the prophylactic use of RometR-30 and copper sulfate on growth, condition and feeding indices in Channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 253, 343-349.
- Radie, A.A.R., Hay, D.Q., Matokovics, B., Gabrielak, T., 1985a. Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behaviour. *Comp. Biochem. Physiol. C* 81, 395-399.
- Radie, A.A.R., Hay, D.Q., Gabrielak, T., Matokovics, B., 1985b Comparative antioxidative enzyme study in freshwater fishes I. Distribution of superoxide dismutase, peroxide decomposing enzymes and lipid peroxidation in herbivorous fishes. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 36, 169-174.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Ishikawa, C.M., Das Eiras, A.A., Felizardo, N.N., 2000. Haematological analysis of Chara, *Pseudoplatystoma fasciatum* in captivity. *Aqua* 2000. Responsible aquaculture in the new millennium. May 2-6 2000. European Aquaculture Soc. Special Pub. Nice, France, 590p.
- Raj-banshi, V.K., Gupta, A.K., 1986. Bioaccumulation of copper in tissue of freshwater air-breathing fishes, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) and *Channa punctatus* (Bloch), from an experimental short-term bioassay. *Znt. J. Acad. Ichthyol.* I, 1, 27-30.
- Rand, G.M., 1995. *Fundamentals of Aquatic Toxicology.* Taylor and Francis, London. 1156p
- Randall, D.J., Perry, S.F., 1992. Catecholamines. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrel, A.P. (Eds.), *Fish Physiology.* Academic Press, San Diego, pp. 255-300.

Rantin, F.T., Guerra, C.D.R., Kalinin, A.L., Glass, M.L., 1998. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 119, 991-997.

Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 1996. Aquatic surface respiration (ASR) and cardiorespiratory responses of *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, serrasalmidae), during graded and acute hypoxia. In: Val, A.L., Randall, D.J., Mackinley, D (Eds.), *The Physiology of Tropical Fish Symposium*. San Francisco State University, CA. 141p.

Ratter, B.A., Heath, A.G., 1995. Environmental factors affecting contaminant toxicity in aquatic and terrestrial vertebrates. In: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A.Jr., Cairns, J.Jr. (Eds), *Handbook of Ecotoxicology*. 755p.

Reardon, I.S., Harrell, R.M., 1990. Acute toxicity of formalin and copper sulfate to striped bass fingerlings held in varying salinities. *Aquaculture* 87, 3, 255-270.

Ringwood, A.H., Brouwer, M., 1993. Expression of constitutive and metal-inducible metallothioneins in oyster embryos (*Crassostrea virginica*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 106, 523-529.

Roberts, M.H. Jr., Sved, D.W., Felston, S.P., 1987. Temporal changes in AHH and SOD activities in feral spot from the Elizabeth River, a polluted subestuary. *Mar. Environ. Res.* 23, 89-101.

Rodriguez-Ariza, A., Abril, N., Navas, J.I., Dorado, G., Lopez-Barea, J., Pueyo, C., 1992. Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts. *Environ. Mol. Mutagen.* 19, 112-114.

Rodriguez-Ariza, A., Dorado, G., Pueyo, C., Lopez-Barea, J., 1991. Biochemical effects of environmental pollution in fishes from Spanish South-Atlantic littoral. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 301S.

Rodriguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J., 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted areas. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 50, 2568-2574.

Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81-114.

Roesijadi, G., 1994. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health Perspect.* 102, 91-95.

Roesijadi, G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 113, 2, 117-123.

Roesijadi, G., Drum, A.S., Thomas, J.M., Fellingham, G.W., 1982. Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low weight, mercury-binding proteins. *Mar. Pollut. Bull.* 13, 7, 250-253.

- Roesijadi, G., Fellingham, G.W., 1987. Influence of Cu, Cd and Zn pre-exposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis*. Can. J. Fish. Aquatic Sci. 44, 680-684.
- Roesijadi, G., Klerks, P.L., 1989. Kinetic analysis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. J. Exp. Zool. 251, 1-12.
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. Aquat. Toxicol. 48, 185-194.
- Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., 1997. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. Comp. Biochem. Physiol. C 118, 33-37.
- Roncero, V., Durán, E., Soler, F., Masot, J., Gómez, L., 1992. Morphometric, structural and ultrastructural studies of tench (*Tinca tinca* L.) hepatocytes after copper sulfate administration. Environ. Res. 57, 45-58.
- Rowley, D.A., Halliwell, B., 1983. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction? Arch. Biochem. Biophys. 225, 1, 279-284.
- Roy, J., 1997. Environmental contaminants encyclopedia: copper entry. National Park Service, Water Resources Divisions, pp. 99.
- Ruuge, E.K., Lendenev, A.N., Lakomkin, A.A., Ksenzenko, M.Y., 1991. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion. Am. J. Physiol. Suppl. 261, 81-86.
- Ryu, S.-K., Park, J.-S., Lee, I.-S., 2003. Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. Comp. Biochem. Physiol. C. 134, 101-107.
- Saint-Paul, U., 1984. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish (*Colossoma macropomun*, Serrasalminidae). Environ. Biol. Fish. 11, 53-62.
- Saint-Paul, U., Bernardinho, G., 1988. Behavioral and ecomorphological responses of neotropical Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalminidae) to oxygen-deficient waters. Exp. Biol. 48, 19-26.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback, relationship with hepatic metal levels. Environ. Toxicol. Pharmacol. 19, 177-183.
- Sancho, E., Cerón, J.J., Ferrando, M.D., 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 46, 81-86.
- Sant'Ana, L.S., Mancini-Filho, J., 2000. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. Food Chem. 68, 2, 175-178.

- Santos, L.R.B. dos. 2006. Efeitos da dieta suplementada com vitamina E e cobre nas respostas metabólicas e antioxidantes de matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869), frente à hipóxia. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo, 95p.
- Sato, M., Bremner, I., 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 325-337.
- Satoh, M., Tsuji, Y., Watanabe, Y., Okonogi, H., Suzuki, Y., Nakagawa, M., Shimizu, H., 1996. Metallothionein content increased in the liver of mice exposed to magnetic fields. *Arch. Toxicol.* 70, 315-318.
- Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.
- Schalch, S.H.C., Moraes, F.R., 2005. Distribuição sazonal de parasitos branquiais em diferentes espécies de peixes em pesque-pague do município de Guariba-SP, Brasil. *Brazil. J. Vet. Parasitol.* 14, 4, 141-146.
- Schlenk, D., Kenneth, B.D., Griffin, B.R., 1999. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. *Aquaculture.* 177, 367-397.
- Schubauer-Berigan, M.K., Dierkes, J.R., Monson, P.D., Ankley, G.T., 1993. pH dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn, to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyaella azteca* and *Lumbriculus variegates*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1261-1266.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313, 1072-1077.
- Segner, H., Braubeck, T., 1990. Adaptive changes of liver composition and structure in golden ide during winter acclimatization. *J. Exp. Zool.* 255, 171-85.
- Serafim, A., Company, R.M., Bebianno, M.J., Langston, W.J., 2002. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Mar. Environ. Res.* 54, 361-365.
- Severi, W. 1991. Aspectos morfológicos e estruturais das brânquias de pacu (*Piaractus mesopotamicus* - Holmbreg, 1887, Osteichthyes, Serraxalmidae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.
- Shah, S. L., Hafeez, M. A., Shaikh, S. A., 1995. Changes in haematological parameters and plasma glucose in the fish, *Cyprinion watsoni*, in response to zinc and copper treatment. *Pak. J. Zool.* 27, 249-253.
- Shaw, T.L., Brown, V.M., 1974. The toxicity of some forms of copper to rainbow trout. *Water Res.* 8, 377-382.

- Shearer, K.D., 1984. Changes in elemental composition of hatchery-reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* associated with growth and reproduction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 1592-1600.
- Shoubridge, E.A., Hochachka, P.W., 1981. The origin and significance of metabolic carbon dioxide production in the anoxic goldfish. *Molec. Physiol.* 1, 315-338.
- Sidell, B.D., 1983. Cardiac metabolism in the *Myxiniidae*: physiological and phylogenetic considerations. *Comp. Biochem. Physiol. A* 76, 495-505.
- Sies, H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed.* 25, 1058-1071.
- Singh, H.S., Reddy, T.V., 1990. Effect of copper sulfate on hematology, blood chemistry, and hepato-somatic index of an Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and its recovery. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 20, 1, 30-35.
- Singh, M., 1995. Haematological responses in a freshwater teleost *Channa punctatus* to experimental copper and chromium poisoning. *J. Environ. Biol.* 16, 4, 339-341.
- Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Donald, L.J., Duckworth, H.W., Carpena, X., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *J. Biol. Chem.* 279, 43098-43106.
- Soengas, J., Moon, T., 1995. Uptake and metabolism of glucose, alanine and lactate by red blood cells of the American eel *Anguilla rostrata*. *J. Biol.* 198, 877-888.
- Soivio, A., Nikinmaa, M., 1981. The swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. In: Pickering, A.D. (Ed.), *Stress and Fish*. Academic Press, London, pp. 103-119.
- Soivio, A., Westman, K., Nyholm, K., 1974. Changes in haematocrit values in blood samples treated with and without oxygen: A comparative study with four Salmonid species. *J. Fish Biol.* 6, 163-69.
- Sprague, J.B., 1968. Avoidance reactions of rainbow trout to zinc sulphate solutions. *Water Res.* 2, 5, 367-372.
- Spry, D.I., Wood, C.M., 1984. Acid base, plasma ion and blood gas changes in rainbow trout during shortterm toxic zinc exposure. *J. Comp. Physiol. B* 15, 149-158.
- Stagg, R.M., Shuttleworth, T.J., 1982. The accumulation of copper in *Platichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentrations. *J. Fish Biol.* 20, 491-500.
- Starodub, M.E., Wong, P.T.S., Mayfield, C.I., Chau, Y.K., 1987. Influence of complexation and pH on individual and combined heavy metal toxicity to a freshwater alga. *Can J. Fish Aquat. Sci.* 44, 1173-1180
- Steadman, B.L., Farag, A.M., Bergaman, H.L., 1991. Exposure-related patterns of biochemical indicators in rainbow-trout exposed to No. 2 fuel oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 365-373.

- Stiff, M.J., 1971. Copper/bicarbonate equilibria in solutions of bicarbonate ion at concentrations similar to those found in natural water. *Water Res.* 5, 171-197.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptation in nature. *Braz. J. Med. Res.* 29, 1715-1733.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q. Rev. Biol.* 65, 145-174.
- Stouthart, A.H., Haans, J.L.M., Lock, R.A.C., Wendelaar-Bonga, S.E., 1996. Effects of water pH on copper toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 376-383.
- Straus, D.L., Tucker, C.S., 1993. Acute toxicity of copper sulfate and chelated copper to channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacul. Soc.* 24, 390-395.
- Strivastava, P.N., Narain, A.S., 1985. Catfish blood chemistry under environmental stress. *Experientia* 41, 855-857.
- Stuhlbacher, A., Bradley, M.C., Naylor, C., Calow, P., 1992. Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Comp. Biochem. Physiol. C* 101, 3, 571-577.
- Sunda, W.G., Lewis, J.A.M., 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. *Limnol. Oceanogr.* 23, 870-876.
- Takasusuki, J., Araujo, M.R.R., Fernandes, M.N., 2004. Effect of Water pH on Copper Toxicity in the Neotropical Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodondidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 1075-1082.
- Tao S., Long, A., Liu, C., Dawson, R., 2000. The influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 59-64.
- Tao, S., Liangt, T., Cao, J., Dawson, R., Liu, C.F., 1999. Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44, 190-195.
- Tao, S., Long, A., Xu, F., Dawson, W., 2002. Copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*) at various levels of pH. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 221-226.
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., Moraes, F.R., 2001. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. *Rev. Bras. Zool.* 18, 67-79.
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., Schalch, S.H.C., Onaka, E.M., Quintana, C.I.F., Moraes, J.R.E., Moraes, F.R., 2002. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). *Acta Scientiarum* 24, 2, 547-554.

- Tavares-Dias, M., Mataqueiro, M.I., 2004. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. *Acta Scientiarum. Biological Sciences.* 26, 2.
- Taylor, C.G., Bettger, W.J., Bray, T.M., 1988. Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defenses system in rats. *J. Nutr.* 118, 613-621.
- Taylor, E.W., Beaumont, M.W., Butler, P.J., Mujallid, M.S.I., 1996. Lethal and sub-lethal effects copper upon fish: a role for ammonia toxicity. In: Taylor, E.W. (Ed.), *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 85-113.
- Thevenod, F., Friedmann, J.M., 1999. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of N^+/K^+ -ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J.* 13, 1751-1761.
- Thorburn, M.A., Moccia, R.D., 1993. Use of chemotherapeutics on trout farms in Ontario. *J. Aquat. Anim. Health* 5, 85-91.
- Thornton, J.A., Rast, W., 1997. The use of copper and copper compounds as algicides. In: Richardson, W.T. (Ed.), *The Handbook of Copper Compounds and Applications.* CRC Press, Boca Raton, pp. 123-142.
- Tomasso, J.R., Simco, B.A., Davis, K. B., 1983. Circulating corticosteroid and leucocyte dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) during net confinement. *Tex. J. Sci.* 3, 5, 83-88.
- Tonguthai, K., 1997. Control of freshwater fish parasites: a Southeast Asian perspective. *Int. J. Parasitol.* 27, 1185-1191.
- Tort, L., Torres, P., Flos, R., 1987. Effects on dogfish haematology and liver composition after acute copper exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 87, 2, 349-353.
- Turnlund, J.R., 1998. Human whole-body copper metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 960S-964S.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2007. Aquatic Life Ambient Freshwater Quality Criteria – Copper 2007 Revision. EPA-822-R-07-001. National Technical Information Service, Springfield, VA.
- UNEP/RAMOGÉ, 1999. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme. UNEP, Athens.
- US Environmental Protection Agency, 1975. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. EPA-660/3-75-009, Nat. Tech. Info. Ser., Washington, DC.
- Val, A.L, Almeida-Val, V.M.F., 1995. Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and biochemical features, Springer Verlag, Heidelberg.

- Val, A.L. 1986. Hemoglobinas de *Colossoma macropomun* Cuvier, 1918 (*Charcoidei, Pisces*): aspectos adaptativos (Ilha da Marchantaria, Manaus, AM). Tese de doutorado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 224p.
- Val, A.L., 1996. Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, AM, pp. 59-73.
- Valarmathi, S., Azariah, J., 2003. Effect of copper chloride on the enzyme activities of the crab *Sesarma quadratum* (Fabricius). *Turk. J. Zool.* 27, 253-256.
- Van Den Thillart, G., Van Waarde, A., 1985. Teleosts in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. *Molec. Physiol.* 8, 393-409.
- Van Der Merwe M. 1992. Aspects of heavy metal concentration in the Olifants River, Kruger National Park, and the effect of copper on the haematology of *Clarias gariepinus* (Clariidae). M.Sc. Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Van Vuren, J.H., 1986. The effects of toxicants on the haematology of *Labeo umbratus* (Teleostei: Cyprinidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 83, 155-159.
- Van Weerd, J.H., Komen, J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120, 107-112.
- Varanasi, U. Markey, D. 1978. Uptake and release of lead and cadmium in skin and mucus of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 60, 187-191
- Varanka, Z., Rojik, I., Varanka, I., Nemcsok, J., Abraham, M., 2001. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp. Biochem. Physiol. C* 128, 467-478.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metal in marine invertebrate: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *C.R.C. Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1, 295-317.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* 46, R1612-R1619.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* 104, 3, 355-372.
- Viarengo, A., Palmero, S., Zanicchi, G., Capelli, R., Vaissiere, R., and Orunesu, M., 1985. Role of metallothionein in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive glands of *Mytilus galloprovincialis*. *Lam. Mar. Environ. Res.* 16, 23-36.

- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmero, S., Zanicchi, G., Bouquegneau, J.M., Orunesu, M., 1984. Biochemical characterization of copper-thioneins isolated from the tissues of mussels exposed to the metal. *Mol. Physiol.* 5, 41-52.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Zanicchi, G., Orunesu, M., 1980. Rapid induction of copper-binding proteins in the gills of metal exposed mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 67, 215-218.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondedero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organism: an application to Mediterranean and Antarctic mollusk. *Mar. Environ. Res.* 44, 69-84.
- Víg, E., Nemcsók, J., 1989. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp *Cyprinus carpio*. *J. Fish Biol.* 35, 23-25.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., Iwama, G.K., 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol. C* 116, 89-95.
- Virani, N.A., Rees, B.B., 2000. Oxygen consumption, blood lactate and interindividual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. *Comp. Biochem. Physiol. A* 126, 397-405.
- Walsh, P.J., Henry, R.P., 1991. Carbon dioxide and ammonia metabolism and exchange. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. v.1. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 181-207.
- Walton, M.J., Cowey, C.B., 1982. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 73, 59-79.
- Wang, T., Knudsen, P.K., Brauner, C.J., Busk, M., Vijayan, M.M., Jensen, F.B., 1998. Copper exposure impairs intra- and extracellular acid-base regulation during hypercapnia in the fresh water rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol. B* 168, 591-599.
- Warner, H.R., 1994. Superoxide dismutase, aging and degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 249-258.
- Wdzieczak, J., Zalesna, G., Wujec, E., Péres, G., 1982. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B* 73, 2, 361-365.
- Weber, R.E., 1982. Interspecific adaptation of haemoglobin function in fish to oxygen availability. In: Addink, A.D.F., Spronk, N. (Eds.), *Exogenous and Endogenous influences on Metabolic and Neural Control*. Pergamon Press, Oxford, pp. 87-101.
- Weber, J.M., Zwingsltein, G., 1995. Circulatory substrate fluxes and their regulation. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. v.4. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 15-32.

- Weber, R.E., Jensen, F.B., 1988. Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *A. Rev. Physiol.* 50, 161-179.
- Wedemeyer, G., McLey, D.J., 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stress on fish health. U.S. Tech. Pap. U.S. Fish Wildl. Serv. 89, 1-18.
- Wedemeyer, G.A., Yasutake, W.T., 1977. Clinical methods for assessment of the effects of environmental stress on fish health. U.S. Tech. Pap. U.S. Fish Wildl. Serv. 89, 1-18.
- Wells, B.R.M., Beard, G.C.G.L.A., Summers, G., 1989. Hypoxic responses in fish from a stable environment: blood oxygen transport in the antarctic fish *Pagothenia borchgrevink*. *J. Exp. Biol.* 141, 97-111.
- Wendelaar Bonga, S.E., Flik G., Balm, P.H., Van der Meij, J.C., 1990. The ultrastructure of chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water, *Cell Tissue Res.* 259, 575-585.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Wepener, V., Van Vuren, J.H., Du Preez, H.H., 1992. The effect of hexavalent chromium at different pH values on the hematology of *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 101, 375-381.
- Wilhelm Filho, D., Giuvili, C., Boveris, A., 1993. Antioxidant defenses in marine fish. I. Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106, 409-413.
- Wilhelm Filho, D., Boveris, A., 1993. Antioxidant defenses in marine fish: II. Elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106, 415-418.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.B., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar (*Geophagus brasiliensis*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 719-726.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Zaniboni-Filho, E., Pedrosa, R.C., 2005. Effect of different oxygen tension on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture* 244, 349-357.
- Williams, R.J.P., 1981. Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 294, 57-74.
- Wilson, R., Taylor, E.W., 1993. The physiological responses of freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acutely lethal copper exposure. *J. Comp. Physiol. B* 163, 38-47.
- Winkaler, E.B., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R., 2001. Biomarcadores histolgicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeires de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Maringá*, 23, 2, 507-514.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.

- Winzer, K., Winston, G.W., Becker, W. Van, Noorden, C.J.F., Hochler, A., 2001. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Patichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.* 52, 2, 143-155.
- Winzerling, J.J., Low, J.H., 1997. Comparative nutrition of iron and copper. *Ann. Rev. Nutr.* 17, 501-526.
- Wood, C.M., 1989. The physiological problems of fish in acid waters. In: Morris, R., Taylor, E.W., Brown, D.J.A., Brown, J.A. (Eds.), *Acid Toxicity and Aquatic Animals*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 125-152.
- Wood, C.M., 1991. Acid–base and ion balance, metabolism, and their interactions, after exhaustive exercise in fish. *J. Exp. Biol.* 160, 285-308.
- Wood, C.M., 2001. Toxic responses of the gill. In: Benson, W.H., Schleuh, D.W. (Eds.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. Taylor & Francis, Washington, pp. 1-87.
- Woottonm, R.J., 1990. *Ecology of Teleost Fishes*. Chapman and Hall, New York. 404p.
- Wu, S.M., Shih, M., Ho, Y., 2006. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. A* 145, 218-226.
- Wurts, W.A., Durborow, R.M. 1992. Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds. *Aquaculture program. SRAC-public n. 464*. 4p.
- Yang, R., Brauner, C., Thurston, V., Neuman, J. Randall, D.J., 2000. Relationship between toxicant transfer kinetic processes and fish oxygen consumption. *Aquat. Toxicol.* 48, 95-108.
- Yesaki, T.Y., Iwama, G.K., 1992. Some effects of water hardness on survival, acid-base regulation, ion regulation and ammonia excretion in rainbow trout in highly alkaline water. *Physiol. Zool.* 65, 763-787.
- Yim, M., Chock, P., Stadtman, E., 1993. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J. Biol. Chem.* 268, 4099-4105.
- Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74, 139-162.
- Zagatto, P.A., 2005. *Évaluation écotoxicologique du réservoir Guarapiranga, Brésil, em relation avec le problème des algues toxiques e algicides*. Tese de Doutorado. Universidade de Mertz, França. 86p.
- Zagatto, P.A., Bertolotti, E., 2006. *Ecotoxicologia Aquática. Métodos e Aplicações*. Rima, São Carlos, pp. 413-432.
- Zarogian, G., Anderson, S., Voyer, R., 1992. Individual and combined cytotoxic effects of cadmium, copper and nickel in brown cells of *Mercenaria mercenaria*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 24, 328-337.

Zaroogian, G., Jackim, E., 2000. In vivo metallothionein and glutathione status in an acute response to cadmium in *Mercenaria mercenaria* brown cells. *Comp. Biochem. Physiol. C* 127, 251-261.

Zhang, Y.S., Schlenk, D., 1995. Induction and characterization of hepatic metallothionein expression from cadmium-induced channel-catfish (*Ictalurus punctatus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1425-1431.

Zikic, R.V., Stajn, A., Saicic, Z.S., Spasic, M.B., Ziemnicki, K., Petrovic, V.M., 1996. The activities of superoxide dismutase, catalase and ascorbic acid content in the liver of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.* 45, 479-481.

Zitko, V., Carson, W.G., 1976. A mechanism of the effects of water hardness on the lethality of heavy metals to fish. *Chemosphere* 5, 299-303.