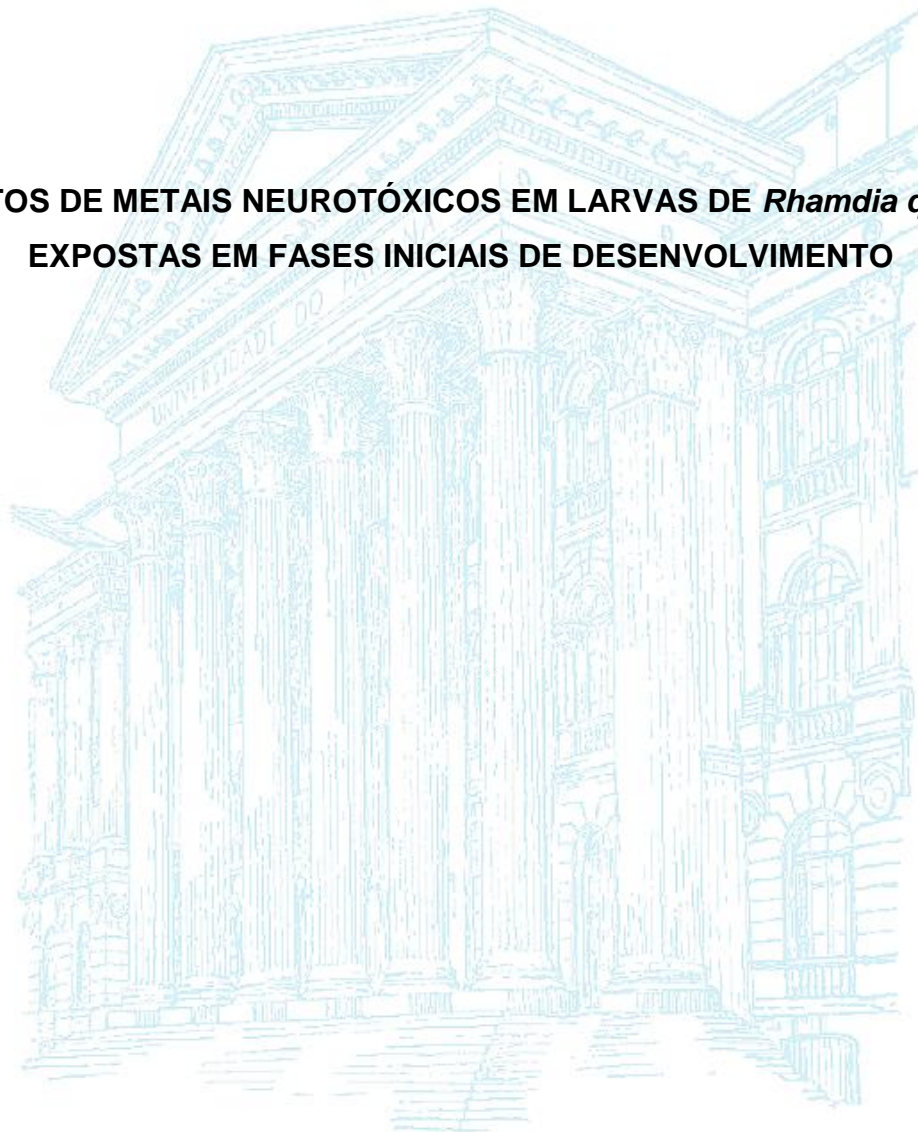


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAOLA CAROLINE NAGAMATSU

**EFEITOS DE METAIS NEUROTÓXICOS EM LARVAS DE *Rhamdia quelen*
EXPOSTAS EM FASES INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO**



Curitiba

2013

PAOLA CAROLINE NAGAMATSU

**EFEITOS DE METAIS NEUROTÓXICOS EM LARVAS DE *Rhamdia quelen*
EXPOSTAS EM FASES INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial á obtenção de grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Curitiba

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Nagamatsu, Paola Caroline

Efeito de metais neurotóxicos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas em fases iniciais de crescimento. / Paola Caroline Nagamatsu. – Curitiba, 2013.

84f.: il. ; 30cm.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Peixe - Larva. 2. Poluentes. I. Título II. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro. III Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Daniel Bussolaro
Instituto Federal do Paraná



Profa. Dra. Flávia Sant'Anna Rios
Universidade Federal do Paraná

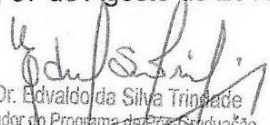
Suplente:

Profa. Dra. Marta Margarete Cestari
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a mestranda Paola Caroline Nagamatsu, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeitos de metais neurotóxicos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas em fases iniciais de desenvolvimento", são de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 07 de Agosto de 2013



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

**Dedico esta dissertação ao meu
amado pai, que sempre me apoiou em
todos os momentos da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro por guiar os meus primeiros passos na pesquisa científica. Obrigada pelo incentivo e apoio diante das dificuldades;

Aos professores Francisco Filipak Neto, Marco Randi, Cláudia Machado e Sônia Grötzner pela colaboração em muitos momentos;

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR;

Aos meus colegas de laboratório pela companhia e ajuda nas coletas;

À minha família, por tudo;

Ao meu namorado Alexei, pelo apoio integral nos momentos mais difíceis;

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, por toda contribuição na minha formação;

À Piscicultura Panamá;

À CAPES pela disponibilização da bolsa de mestrado;

Ao grupo de Ensino e Química analítica da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela caracterização das nanopartículas de prata;

Enfim, a todos aqueles que tornaram possível a execução deste trabalho.

RESUMO

O aumento das atividades antropogênicas têm resultado na crescente poluição de ecossistemas aquáticos por metais pesados como o chumbo (Pb), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e a prata (Ag). Diversos estudos sobre o acúmulo e os efeitos neurotóxicos destes elementos têm sido feito em diferentes espécies de peixes juvenis ou adultos, mas só recentemente testes de toxicidade em fases iniciais de desenvolvimento tornaram-se ferramentas promissoras em estudos ambientais. Os parâmetros de níveis aceitáveis de metais e outras substâncias em águas brasileiras são apresentados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, no entanto, não existe uma legislação própria referente a normas e padrões que assegurem os primeiros estádios do desenvolvimento de teleósteos. Diante disso, são necessários mais estudos sobre os efeitos de agentes tóxicos e de misturas complexas na embriogênese de espécies nativas. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição hídrica em larvas da espécie nativa *Rhamdia quelen* expostas *in ovo* a três concentrações diferentes de cada metal (chumbo, manganês e mercúrio), sendo a menor concentração baseada na resolução do CONAMA. Além destes metais, os ovos também foram expostos à concentração de 0,03 mg/L de nanopartículas de prata (AgNP) e às misturas complexas destes elementos. Oito horas após a fecundação (hpf) os embriões foram expostos e decorridas 24, 48, 72 e 96 hpf, os parâmetros: taxa de eclosão, taxa de sobrevivência, frequência de deformidades e a morfologia dos neuromastos foram analisados. Em geral, os tratamentos anteciparam a eclosão em 24 hpf à temperatura de 24°C. As taxas de sobrevivência das larvas diminuíram em função do tempo, principalmente a partir de 72 hpf e, em 96 hpf, as taxas de sobrevivência foram inversamente proporcionais à concentração de Pb, Mn e Hg. A adição das AgNPs nas misturas interferiu tanto nas taxas de eclosão quanto nas taxas de sobrevivência. Comparado aos espécimes do grupo controle, várias alterações anatômicas foram identificadas nas larvas que sofreram exposição aos diferentes tratamentos em 48 e 96 hpf, tais como lordose, cifose e outras torções espinhais, deformidades na região cefálica, nas nadadeiras, no saco vitelínico, edema cardíaco e encurtamento corpóreo. Além disso, foram observadas alterações morfológicas em estruturas sensoriais como os barbilhões e os neuromastos, indicando o potencial neurotóxico dos compostos químicos utilizados neste trabalho. Essas deformidades encontradas nos primeiros dias pós-eclosão podem acarretar em conseqüências imprevisíveis para a sobrevivência do organismo nos ambientes naturais. Nesse sentido, a avaliação do impacto sobre os primeiros estádios de desenvolvimento em peixes pode de forma preditiva ter um significado muito promissor, visto que a condição de sucesso da população está vinculada ao sucesso também das fases iniciais do ciclo de vida daquela espécie.

Palavras-chave: Jundiá, metais pesados, nanopartículas.

ABSTRACT

The growth of anthropogenic activities is resulting in a crescent pollution of the aquatic ecosystem by heavy metals, such as Plumb (Pb), Manganese (Mn), Mercury (Hg) and Silver (Ag). Several studies about the accumulation and the neurotoxic effects of those elements have been done in different species of juvenile fishes or adults, but just recently toxicity tests on initial phases of growing have become promising tools in ambiental studies. The parameters of acceptable levels of metals and other substances in brazilian waters are presented by the National Council of Environment – CONAMA, however, there isn't an own legislation that refers to rules and patterns that assures the initial stages of teleosts growth. Thereupon, more study about the effect of the toxic agents and complex mixtures on embryogenesis of the native species is needed. This study aimed to evaluate the effects of the hidric exposure on larvae of native species *Rhamdia quelen* exposed *in ovo*, on three different concentrations of each metal (Plumb, Manganese and Mercury), being the lower concentration based on CONAMA's resolution. Besides those metals, the eggs were also exposed to a concentration of 0,03 mg/L of silver nanoparticles (AgNP) and to the complex mixtures of those elements. Eight hours after the fecundation (hpf) that the embryos were exposed and after 24, 48, 72 and 96 hpf, the parameters: emergence rate, survival rate, deformities frequency and the neuromasts morphology were analised. In general, the emergence was anticipated by the treatments in 24 hpf at the 24°C temperature. The survival rates for larvae decreased as a function of time, especially since 72 hpf, and in 96 hpf the survival rate were inversely proportional to the concentration of Pb, Mn and Hg. The addition of AgNPs on mixtures interfered on the emergence rate as much as the survival rate. Compared to the control group specimes, many anatomical changes were identified on larvae that were exposure by different treatments in 48 and 96 hpf, such as lordosis, cifosis, and other spinal twists, deformities on the cephalic region, flippers, yolk sack, cardiac edema and corporeal shorter. Besides, morphological changes were observed in sensorial structures like barbells and neuromasts, pointing the neurotoxic potential of the chemical compounds used in this study. Those deformities found in the first days after emergence can cause unpredictable consequences to the organism survival on natural environment. Therefore, the evaluation of the impact over the first stages of development on fishes might have a promising meaning, once the condition of success on population is connected to the success of the initial stages of life cycle of that species.

Key words: Jundiá, heavy metals, nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Estádios protegidos e não-protegidos pela legislação nos diferentes estágios do ciclo de vida de teleósteos.	15
FIGURA 2. Espécime de <i>Rhamdia quelen</i>	19
FIGURA 3. Viveiros escavados para a estocagem de reprodutores e alevinos na piscicultura Panamá.	24
FIGURA 4. Oócitos recém-desovados de uma fêmea (A). Macho liberando o líquido espermático sobre os oócitos (B). Mistura (C), hidratação (D) e aeração (E) para estimular a fertilização. (F) Oxigenação dos ovos para o transporte em sacos plásticos.	25
FIGURA 5. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 48 hpf.	29
FIGURA 6. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 48 hpf.	30
FIGURA 7. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 96 hpf.	31
FIGURA 8. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 96 hpf.	32
FIGURA 9. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 96 hpf.	33
FIGURA 10. Magnitude do potencial zeta.	36
FIGURA 11. Tamanho e distribuição dos agregados de prata.	37
FIGURA 12. Taxa de sobrevivência média (barras indicam o desvio padrão) dos diferentes tratamentos de Pb e AgNP em diferentes períodos após a fecundação..	39
FIGURA 13. Taxa de sobrevivência média dos diferentes tratamentos de Mn e AgNP em diferentes períodos após a fecundação.	40
FIGURA 14. Taxa de sobrevivência média dos diferentes tratamentos de Hg e AgNP em diferentes períodos após a fecundação..	41
FIGURA 15. Taxa de sobrevivência média das diferentes misturas em diferentes períodos após a fecundação	42
FIGURA 16. Microscopia eletrônica de varredura dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> do grupo controle (96 hpf)	51
FIGURA 17. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao Pb1 (96 hpf)	52
FIGURA 18. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao Pb2 (96 hpf)	53
FIGURA 19. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao Pb3 (96 hpf)	54
FIGURA 20. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao Mn1 (96 hpf).....	55
FIGURA 21. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao Mn2 (96 hpf).....	56
FIGURA 22. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao Mn3 (96 hpf)	57
FIGURA 23. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao Hg3 e ao AgNP (96 hpf)..	58

FIGURA 24. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao Pb1+AgNP e ao Mn1+AgNP (96 hpf).....	59
FIGURA 25. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao Hg1+ AgNP e à mistura + AgNP (96 hpf).....	60
FIGURA 26. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas à mistura (96 hpf).....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Padrões de qualidade da água - Resolução CONAMA nº357 de 2005.	20
TABELA 2. Concentrações finais dos metais utilizados no presente estudo.....	23
TABELA 3. Concentrações finais utilizadas nas misturas	24
TABELA 4. Taxa de eclosão (%) dos tratamentos (concentrações de poluentes) após 24 horas de fecundação..	38
TABELA 5. Ocorrência de deformidades (%) dos tratamentos (concentrações de poluentes) após 48 horas de fecundação.	46
TABELA 6. Ocorrência de deformidades (%) dos tratamentos (concentrações de poluentes) após 96 horas de fecundação	50

LISTA DE ABREVIATURAS

Hpf - horas após a fertilização

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

Pb - Chumbo

Mn - Manganês

Hg - Mercúrio

Ag - Prata

AgNP - Nanopartícula de prata

Pb1 - 10 µg/L de chumbo

Pb2 - 30 µg/L de chumbo

Pb3 - 90 µg/L de chumbo

Mn1 - 100 µg/L de manganês

Mn2 - 500 µg/L de manganês

Mn3 - 2500 µg/L de manganês

Hg1 - 0,2 µg/L de mercúrio

Hg2 - 2 µg/L de mercúrio

Hg3 - 20 µg/L de mercúrio

Pb1+ AgNP - 10 µg/L de chumbo + 0,03 mg/L de nanopartículas de prata

Mn1+ AgNP - 100 µg/L de manganês + 0,03 mg/L de nanopartículas de prata

Hg1+ AgNP - 0,2 µg/L de mercúrio + 0,03 mg/L de nanopartículas de prata

Mistura - 10 µg/L de chumbo + 100 µg/L de manganês + 0,2 µg/L de mercúrio

Mistura + AgNP - 10 µg/L de chumbo + 100 µg/L de manganês + 0,2 µg/L de mercúrio + 0,03 mg/L de nanopartículas de prata

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Preparo das soluções	23
3.2. Obtenção e incubação dos ovos.....	24
3.3. Seleção dos ovos embrionados	26
3.4. Fixação das larvas	27
3.5. Testes de Toxicidade em larvas	27
3.5.1. Taxa de Eclosão	27
3.5.2. Taxa de Sobrevivência	27
3.5.3 Deformidades morfológicas	28
3.5.4. Análise Morfológica dos neuromastos	34
3.6. Análises dos dados	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Caracterização das nanopartículas de prata.....	36
4.2. Taxa de eclosão.....	37
4.3. Taxa de sobrevivência	39
4.4. Frequência de deformidades	43
4.5. Alterações morfológicas dos neuromastos	51
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento da atividade de mineração (KELLY, 1988), industrial e da agricultura resultou em um aumento na poluição de ecossistemas aquáticos por metais tóxicos, elementos considerados de alto risco ambiental para invertebrados, peixes e seres humanos (ULUTURHAN; KUCUKSEZGIN, 2007). Alguns destes elementos são tóxicos para os organismos vivos, mesmo em concentrações muito baixas, enquanto outros são biologicamente necessários (AMUNDSEN *et al.*, 1997). Metais como o manganês, cobre e zinco são essenciais para o metabolismo e, somente se tornam tóxicos em altas concentrações (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006), enquanto que o chumbo, mercúrio e a prata não têm função biológica conhecida e seus efeitos sobre os organismos vivos normalmente são deletérios. Para o metabolismo normal de peixes, os metais essenciais são tomados a partir da água, sedimentos e alimentação, podendo entrar facilmente no organismo através das superfícies do ovo, do corpo, do trato digestivo e das brânquias (DALLINGER *et al.*, 1987; POURANG, 1995). No entanto, os “não essenciais” também podem ser captados pelas mesmas vias e ocasionar efeitos nocivos em diferentes níveis de organização biológica (bioquímicos, morfológicos e fisiológicos).

A contaminação aquática interfere na qualidade dos parâmetros físicos e químicos da água, indispensáveis para o desenvolvimento normal e a sobrevivência da biota. Os peixes são organismos sensíveis aos efeitos da poluição, tanto é que são freqüentemente usados como indicadores de qualidade de água, pois eles constituem os produtos finais de um sistema complexo formado pelo ambiente (MIRANDA *et al.*, 2008; RABITTO *et al.*, 2011). De acordo com Yi *et al.* (2011), o acúmulo de metais nos tecidos destes animais e as manifestações dos efeitos tóxicos dependem das concentrações, do período de exposição e de fatores ambientais como a salinidade, dureza da água e temperatura, que são fundamentais para a inter conversão entre as diferentes formas químicas e conseqüentemente para a biodisponibilidade.

Em diferentes espécies de peixes, há uma ampla compreensão sobre o acúmulo e os efeitos tóxicos dos metais pesados, mas só recentemente testes de toxicidade em fases iniciais de desenvolvimento tornaram-se uma ferramenta promissora para substituir ou complementar os testes agudos em peixes juvenis e

adultos (NAGEL, 2002). Atualmente este método representa um modelo atraente para avaliação de risco ambiental de compostos químicos, uma vez que possibilita uma correlação com os ensaios convencionais de peixes adultos (LAMMER *et al.*, 2009b), a compreensão de mecanismos tóxicos específicos e a indicação de possíveis efeitos adversos a longo prazo (SCHOLZ *et al.*, 2008). Em relação a este último, muitos estudos toxicológicos que compararam diferentes fases de vida de peixes, concluíram que na maioria dos casos, a toxicidade a longo prazo pode ser extrapolada a partir dos resultados de estudos nos primeiros estádios de vida (CHORUS, 1987, WOLTERING, 1984; LÓPEZ-BARRERA, 2013). Por fim, devido à sensibilidade, reprodutividade e adaptabilidade, o ensaio com embriões está cada vez mais presente nos laboratórios, principalmente em investigações ambientais (HALLARE *et al.*, 2005a; HOLLERT *et al.*, 2003; ULRICH *et al.*, 2002). Os doadores de gametas para estudo podem ser tomados de populações naturais de várias espécies (WEDEKIND *et al.*, 2001; WEDEKIND; MÜLLER, 2005), ou de animais em cativeiro, incluindo a maioria dos peixes que ocorrem nos habitats nas quais as substâncias em estudo são potencialmente relevantes.

Sabendo-se que não existe uma legislação própria referente a normas e padrões que assegurem os primeiros estádios do desenvolvimento de teleósteos (Figura 1), torna-se necessário que estudos sejam realizados até mesmo para que haja uma atenção especial aos efeitos de diferentes contaminantes sobre esses organismos. Alguns trabalhos relatam a influência dos metais pesados na reprodução de peixes fazendo menção às influências sobre a qualidade dos gametas (KIME *et al.*, 1996; LAHNSTEINER *et al.*, 2004), sobre a fertilização dos ovócitos (RURANGWA *et al.*, 1998; WITECK, 2007), sobre a qualidade das larvas (JEZIERSKA *et al.*, 2000) e agressões às membranas celulares dos gametas e/ou ovos embrionados (BROOKS *et al.*, 1997). Outros efeitos adversos podem estar relacionados à estruturas sensoriais como os neuromastos (LÓPEZ-BARRERA, 2013).

Ghysen e Chaudière (2004) descreveram os neuromastos, como agrupamentos de células sensoriais e de suporte espalhadas sobre a superfície do corpo e cabeça do peixe. As células sensoriais dos neuromastos são denominadas *hair cells* e apresentam um feixe de cílios mais longos denominados cinecílio (ou quinecílio) e outras projeções mais curtas denominadas estereocílios. O movimento da água provoca o deslocamento dos cinecílios na direção dos estereocílios ou em

sentido oposto. Como conseqüência, causam, respectivamente, aumento e ou diminuição da secreção de neurotransmissores excitatórios e estão adaptados para detectar fenômenos ondulatórios (POUGH *et al.*, 2003). Muitos trabalhos são limitados a breve descrição e distribuição dos neuromastos, portanto, diante da importância dessas estruturas, há a necessidade de mais estudos sobre a influência de contaminantes neurotóxicos sobre o desenvolvimento sensorial dos peixes.

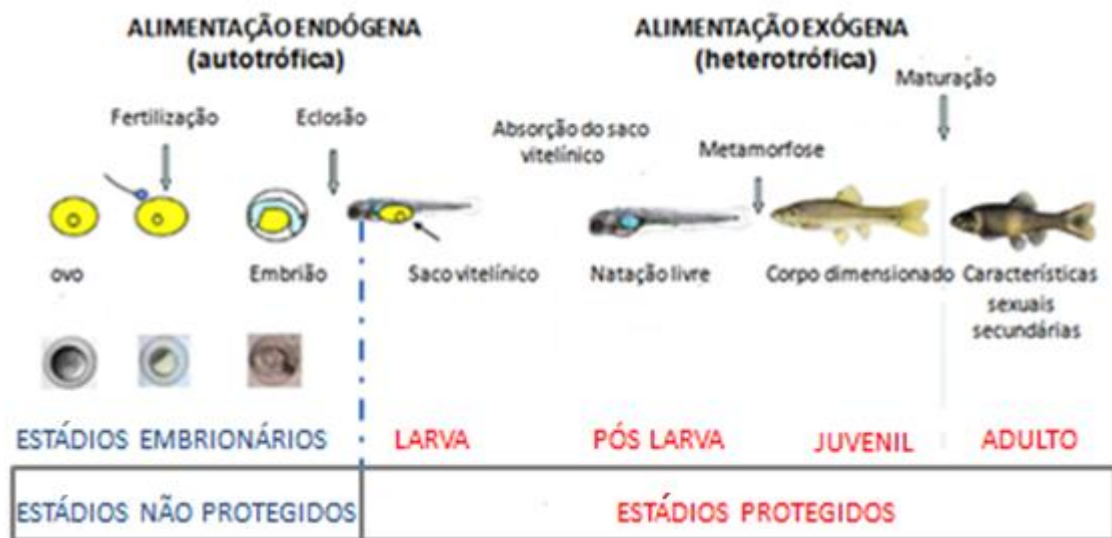


FIGURA 1. Estádios protegidos e não-protégidos pela legislação do ciclo de vida de teleósteos (Modificado de Embry *et al.*, 2010).

O chumbo (Pb) é um dos contaminantes industriais mais comuns nos ambientes naturais. Possui a maior liberação antropogênica entre todos os metais (Pb > Ag > Mo > Sb > Zn > Cd > As > Cr > Co > Mn) (SALOMON; FÖRSTNER, 1984) e, embora essa liberação tenha sido reduzida drasticamente na última década, ainda continua sendo alta devido à atividade da mineração (XIE *et al.*, 1998), da metalurgia (FATMA, 1999), indústrias de tintas, de produtos cerâmicos, de calefação, de soldas (SARYAN; ZENZ, 1994), de baterias de veículos ou industriais e em sistemas de backup de energia elétrica (SKERFVING; BERGDAHL, 2007). O chumbo pode chegar aos seres vivos através da água, solo, alimentação e pelo uso de produtos a base de chumbo (CHEN *et al.*, 2012). Uma vez absorvido, o metal é transportado pela corrente sanguínea para outros tecidos acumulando-se em concentrações elevadas nos ossos, fígado, baço, rim e até mesmo no cérebro, uma vez que transpõe a barreira hemato-encefálica (GOYER; CLARSKSOM, 2001; GWALTENEY-

BRANT, 2002). A partir disso, o Pb tem sido descrito como uma poderosa neurotoxina para os peixes por causar o desequilíbrio de neurotransmissores (RADEMACHER *et al.*, 2001, 2003), reduzir atividades enzimáticas (KATTI; SATHYANESAN, 1986), induzir a hiperatividade (WEBER *et al.*, 1991) e atuar negativamente no comportamento reprodutivo destes organismos (WEBER, 1993; ALADOS; WEBER, 1999).

O manganês (Mn) é o décimo segundo elemento mais abundante da crosta terrestre, podendo ser encontrado nas rochas, no solo, na água e nos alimentos. Não ocorre naturalmente como um metal livre, mas sim em mais de 100 minerais, incluindo óxidos, carbonatos e silicatos (CORNELIS; NORDBERG, 2007). É um nutriente essencial para todos os organismos vivos, desempenhando papéis fisiológicos críticos na constituição e co-ativação de enzimas (UNDERWOOD, 1977; COSSARINI-DUNIER *et al.*, 1988). Apesar de ser um elemento relativamente comum no ambiente, ainda é pouco estudado nos ecossistemas de água doce (DITTMAN; BUCHWALTER, 2010). Quando dissolvido em águas naturais através de fontes antropogênicas associadas à mineração e atividades industriais, pode atingir concentrações muito elevadas (McNEELY *et al.*, 1979; MORILLO; USERO, 2008) e, conseqüentemente tóxicas. A concentração de Mn que causa toxicidade depende da espécie do peixe, fase da vida e das condições químicas da água (FISH, 2009). Em um estudo sobre a distribuição do radioisótopo ^{54}Mn na truta arcoíris, Adam *et al.* (1997) classificou os órgãos alvos deste metal em dois grupos diferentes: o primeiro consiste em órgãos de penetração ou de trânsito como a pele, as brânquias, rins, fígado e vísceras, enquanto o segundo grupo é constituído por órgãos receptores de armazenamento como os ossos, cabeça, nadadeiras e músculos.

De modo geral, os efeitos tóxicos do Pb e do Mn têm sido amplamente estudados em diversas espécies de peixes juvenis e adultos distribuídos em diferentes níveis da cadeia trófica (NYBERG *et al.*, 1995; HOWE *et al.*, 2004). Entretanto, são poucos os trabalhos encontrados na literatura que investigam espécies que representam o ecossistema brasileiro e menos ainda os estudos referentes aos períodos embrionários e larvais.

O mercúrio (Hg) é um dos metais mais tóxicos encontrado nos ambientes naturais, como na litosfera, a atmosfera, hidrosfera e biosfera. Uma série de transformações químicas complexas permitem três estados de oxidação de Hg no ambiente, incluindo uma forma orgânica de grande toxicidade como o metilmercúrio.

Descargas urbanas, materiais agrícolas, mineração e resíduos industriais são as principais fontes antropogênicas de poluição por Hg (ZHANG; WONG, 2007). No Brasil, porém, o garimpo de ouro foi no passado recente a maior fonte de emissão deste metal, principalmente na região Amazônica (GUIMARÃES *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002). Já é bem conhecido que a exposição ao mercúrio pode induzir uma variedade de efeitos adversos nos sistemas biológicos (neurológico, respiratório, imunológico e reprodutivo) de organismos aquáticos (ARABI, 2004; SAMSON e SHENKER, 2000; VERLECAR *et al.*, 2008). Muitos estudos foram realizados para investigar a toxicidade do mercúrio orgânico e inorgânico em diferentes fases da vida de peixes (DAVE; XIU, 1991; GUILHERME *et al.*, 2008a,b; WEIS; WEIS, 1995), incluindo os primeiros estádios de desenvolvimento. Estes, são de primordial importância para a dinâmica populacional dos peixes devido à intensa mortalidade.

Com o avanço recente da nanotecnologia ao longo da última década, milhares de nanomateriais estão sendo fabricados com variações no tamanho, estágio de aglomeração, formato, carga elétrica e outras muitas propriedades (PAUR *et al.*, 2010). Estima-se que de todas as nanopartículas encontradas em produtos de consumo, as de prata (AgNP) sejam as mais comercializadas (AHAMED *et al.*, 2010). Estas são aplicadas no revestimento de roupas e tecidos, armazenamento de alimentos, em cosméticos, protetores solares, máquinas de lavar roupas (JUNG *et al.*, 2007), curativos e ataduras (ARORA *et al.*, 2008), filtros para tratamento d'água (LI *et al.*, 2008) e em produtos farmacêuticos e médicos (SUN *et al.*, 2008). Os potenciais benefícios das AgNPs são indubitáveis e a indústria da nanotecnologia comercial está prevista para aumentar significativamente em US\$ 3 trilhões até 2015 (WOODROW WILSON INTERNATIONAL CENTER, 2011). No entanto, essas substâncias acabam sendo intencionalmente ou acidentalmente lançadas nos ambientes aquáticos, expondo os organismos que vivem nesses locais (BENN e WESTERHOFF, 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram que as AgNPs podem induzir toxicidade em células derivadas de diferentes órgãos (AHAMED *et al.*, 2010), embora o fígado, rins e o cérebro costumam ser os principais alvos. Wu *et al.* (2010) utilizaram as primeiras fases de vida da espécie de peixe *Oryzias latipes* para investigar a toxicidade das AgNPs sobre o desenvolvimento. Nos embriões tratados foram observados retardo no desenvolvimento, pigmentação reduzida e uma variedade de deformidades tais como edema, alterações na coluna vertebral e defeitos oculares.

Jundiá é o nome comum dado aos peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia* formado por 11 espécies, sendo *Rhamdia quelen* (Fig.2) (QUOY e GAIMARD, 1824) a mais encontrada (BALDISSEROTTO, 2004). Esta espécie pertencente à família Heptapteridae e a ordem dos Siluriformes (BOCKMANN e GUAZZELLI, 2003) é amplamente distribuída nas bacias hidrográficas das Américas Central e Sul, desde o sudoeste do México ao centro da Argentina. Trata-se de um bagre nativo bem adaptado à criação e de boa aceitação no mercado consumidor (MARCHIORIO; BALDISSEROTTO, 1999). Em sistemas de cultivo do Brasil, aceita bem o manejo periódico e não cessa o crescimento no inverno (FRACALLOSSI *et al.*, 2004), além disso, responde positivamente ao processo de indução hormonal (SAMPAIO; SATO, 2006; CARNEIRO; MIKOS, 2008). É encontrado em lagos e fundos de rios, preferindo ambientes de águas mais calmas, escondendo-se entre as pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento (GUEDES, 1980). Segundo este mesmo autor, os organismos encontrados no conteúdo gastrintestinal de *R. quelen* não são restritos ao habitat bentônico, indicando que essa espécie é generalista em relação à escolha de alimento. Desta forma, jundiás adultos são onívoros, com uma clara preferência por crustáceos, insetos, restos vegetais, detritos orgânicos (GUEDES, 1980; MEURER; ZANIBONI FILHO, 1997.) e com tendência piscívora (KÜTTER *et al.*, 2009). Sua alimentação, assim como em outras espécies de peixes tropicais (ABELHA *et al.*, 2001) se baseia na disponibilidade de alimento presente no ambiente natural (GOMIERO *et al.*, 2007).

A espécie possui coloração que varia de marrom avermelhado a cinza escuro, três pares de barbilhões, sendo o maior par no maxilar e dois pares menores mandibulares, e não apresenta dimorfismo sexual aparente, somente na época reprodutiva (GOMES *et al.*, 2000). A maturação gonadal é atingida com aproximadamente um ano de idade em ambos os sexos, sendo que em ambientes naturais, os machos iniciam o processo de maturação testicular com cerca de 13,4 cm e, as fêmeas com cerca de 16,5 cm (NARAHARA *et al.*, 1985a). Quando se encontram maduros, os machos apresentam papila protraída e liberam com facilidade o sêmen e as fêmeas sob leve massagem abdominal liberam os ovócitos (SILVA *et al.*, 2004). O período reprodutivo e os picos de desenvolvimento gonadal do *R. quelen* podem variar a cada ano e de um lugar para outro. Em geral, possui desova múltipla e dois picos reprodutivos por ano (um no verão e outro na primavera) (GOMES *et al.*, 2000). De acordo com Barcelos *et al.* (2001b; 2002), a

temperatura da água associada ao fotoperíodo, são características ambientais primárias que regulam a fase de maturação dos jundiás.

É uma espécie ovulípara em seu habitat natural e, quando prontos para a desova, grandes cardumes procuram lugares de água rasa, limpa e com fundo pedregoso (MARDINI *et al.*, 1981). Já a reprodução artificial pode ser realizada por meio da indução hormonal (BALDISSEROTO; RADÜNZ NETO, 2004), podendo ser empregada a fertilização semi-natural (SILVA *et al.*, 2004) ou a seco (BOMBARDELLI *et al.*, 2006a; SAMPAIO; SATO, 2006). No presente trabalho a fertilização do jundiá foi realizada a “seco”, em que após a coleta dos gametas, ocorre a mistura do sêmen com os ovócitos na inicialmente na ausência de água (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983). O desenvolvimento larval é rápido e se dá entre 3 a 5 dias (GOMES *et al.*, 2000), podendo ser influenciado por fatores ambientais como a temperatura e a turbulência da água (GODINHO *et al.*, 1978), e por diferentes substâncias químicas potencialmente tóxicas liberadas nos ambientes aquáticos.



FIGURA 2. Espécime de *Rhamdia quelen*. Fonte: www.pisciculturapanama.com.br

Uma vez que os ecossistemas aquáticos constituem os receptáculos finais da maior parte dos poluentes, faz-se necessário o estabelecimento de concentrações limites dessas substâncias nas águas brasileiras. Os parâmetros de níveis aceitáveis são apresentados na Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA e têm sido propostos com base em legislações internacionais (Tabela 1). Os valores máximos permitidos para os metais chumbo, manganês e mercúrio foram utilizados neste trabalho. Adicionalmente, deve-se

considerar que um contaminante no ambiente aquático encontra-se na presença de outros agentes químicos, o que pode resultar em uma ação conjunta sobre um determinado sistema biológico. O estudo dessa toxicidade por exposição múltipla de poluentes representa uma nova perspectiva para avaliações de riscos à saúde e ao meio ambiente. Desta forma, os resultados deste trabalho tornam-se relevantes para a adoção de políticas públicas que visem à proteção das comunidades aquáticas e da saúde humana.

TABELA 1. Padrões de qualidade da água - Resolução CONAMA nº 357 de 2005.

PADRÕES – Classe 1 e 2 – ÁGUAS DOCES	
Parâmetro	Valor máximo
Chumbo total	0,01 mg/L Pb
Manganês total	0,1 mg/L Mn
Mercúrio total	0,002 mg/L Hg
Prata total	0,01 mg/L Ag

Geralmente os testes de toxicidade nas fases iniciais são focados em organismos modelos (zebrafish – *Danio rerio*, medaka japonesa – *Oryzias latipes*, truta arco-íris – *Oncorhynchus mykiss* e carpa comum – *Cyprinus carpius*) (OECD, 2003). Entretanto, a sensibilidade de outras espécies ainda não foi testada, apesar de seus aspectos comerciais e ecológicos diferirem daqueles organismos modelos. Embora a fauna de peixes de água doce do Brasil seja a mais rica do mundo (BUCKUP *et al.*, 2007), pouco se sabe sobre os efeitos dos poluentes no desenvolvimento embrionário de espécies nativas como por exemplo o jundiá, objeto de estudo deste trabalho. Sendo assim, as informações deste estudo contribuem para o aporte científico que garanta a sustentabilidade de espécies nativas de forma semelhante às espécies exóticas.

Durante a embriogênese, diversos mecanismos bioquímicos e moleculares ocorrem entre células, receptores, tecidos e órgãos. Estes mecanismos podem ser influenciados por um grande número de agentes tóxicos com possíveis impactos na diferenciação e organização tecidual (SHULTE; NAGEL, 1994). A maioria dos estudos que estão disponíveis na literatura envolvem compostos que já são apontados como problemas em potencial para o meio ambiente e saúde, tais como o

manganês, chumbo, mercúrio e a prata, cujas doses permissíveis já tentam ser controladas pela legislação. Porém, existem poucos dados sobre exposições múltiplas, isto é, exposição à mistura de agentes químicos.

Apesar das propriedades neurotóxicas do manganês, chumbo, mercúrio e da prata serem bem conhecidas, há poucas informações sobre os efeitos (sinérgicos ou antagônicos) da mistura destes metais. Além disso, considerando o fato de que na natureza normalmente o cenário que se tem, intencionalmente ou não, é a presença simultânea de mais de um composto químico, verifica-se a necessidade de mais estudos e da criação de mecanismos formais para controlar e avaliar os potenciais riscos para a biota dos recursos hídricos receptores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do chumbo, manganês, mercúrio e nanopartículas de prata, assim como a mistura entre eles, através da exposição hídrica em fases iniciais de desenvolvimento de *Rhamdia quelen*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito dos metais e misturas sobre a taxa de eclosão dos ovos em 24 horas após a fertilização;
- ✓ Avaliar o efeito dos metais e misturas sobre a taxa de sobrevivência das larvas em 24, 48, 72 e 96 horas após a fertilização;
- ✓ Caracterizar a frequência de deformidades encontradas nas larvas em 48 e 96 horas após a fertilização;
- ✓ Identificar alterações na estrutura dos neuromastos das larvas por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- ✓ Gerar dados que possam ser utilizados em modelagem ecológica para a previsão de danos ambientais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo das soluções

Para o preparo das soluções de Mn^{++} , Pb^{++} e Hg^{++} utilizadas neste estudo, uma solução estoque com o sal de cada metal foi preparada, diluindo-se o sal em água MilliQ. Diluições das soluções estoques foram preparadas em água MilliQ nas seguintes concentrações finais (Tabela 1).

TABELA 2. Concentrações finais dos metais utilizados no presente estudo.

	Concentrações finais ($\mu g/L$)		
	Resolução CONAMA nº 357 de 2005	Simulação de um ambiente impactado	
$Pb^{++}(PbNi_2)$	10	30	90
$Mn^{++}(MnCl_2)$	100	500	2500
$Hg^{++}(HgCl_2)$	0,2	2	20

As nanopartículas de prata (Sigma-Aldrich, Ref. 576832-5G, estabilizadas em tampão citrato) foram suspensas em água MilliQ na concentração final de 0,03 mg/L. Em seguida, a suspensão foi sonicada durante 2 ciclos de 10 minutos a uma potência de 25W e 90W de amplitude. A sonicação foi realizada sob-banho de gelo com o objetivo de manter a temperatura baixa durante o processo. O tamanho das partículas e o potencial zeta (estabilidade da solução) foram analisados no Zetasizer Nano ZS90 MALVERN[®] pelo grupo de Ensino e Química analítica da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Com o objetivo de trabalhar com mais realismo para avaliar a toxicidade das misturas foram utilizadas apenas as concentrações apresentadas pelo CONAMA como limites máximos permissíveis, isto é, as menores concentrações de cada metal indicadas na tabela 2, na proporção de 1:1 (Tabela 3):

TABELA 3. Concentrações finais utilizadas nas misturas.

Misturas	Concentrações finais dos metais ($\mu\text{g/L}$)
AgNP + Pb	0,03 mg/L + 10
AgNP + Mn	0,03 mg/L + 100
AgNP + Hg	0,03 mg/L + 0,2
AgNP + Pb + Mn + Hg	0,03 mg/L + 10 + 100 + 0,2
Pb + Mn + Hg	10 + 100 + 0,2

3.2. Obtenção e incubação dos ovos

O estudo teve início a partir da coleta de um casal adulto de jundiás capturados na piscicultura Panamá, localizada em Paulo Lopes–SC (Figura3).

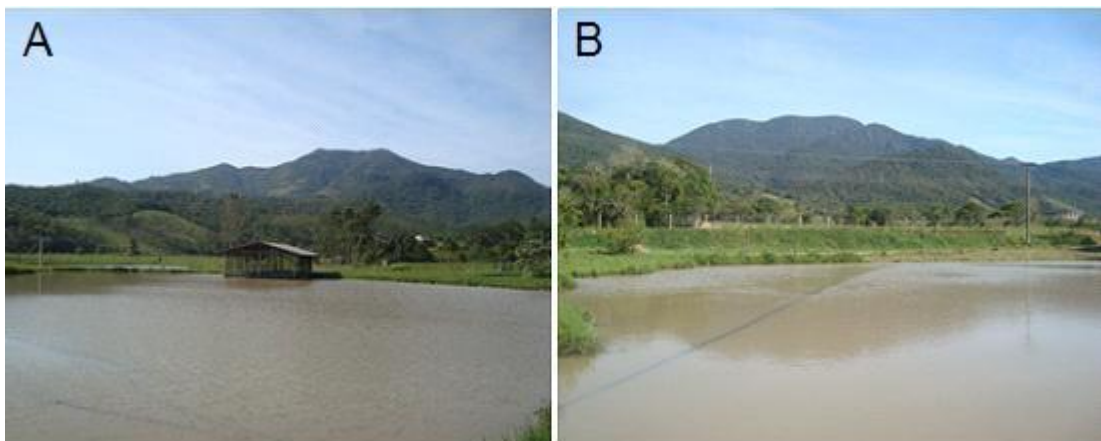


Figura 3. Viveiros escavados para a estocagem de reprodutores e alevinos na piscicultura Panamá (A-B).

A desova da fêmea foi induzida por injeção intramuscular de extrato de pituitária de carpa (2,5 mg cada uma). Foram duas doses calculadas de acordo com base na massa de cada animal (primeira dose de 0,5 mg/QPV e a segunda 5 mg/Kg). No momento da desova uma fêmea foi retirada da água e seu ventre pressionado suavemente para a liberação dos gametas em recipientes de polipropileno (Figura 4A). Para a fertilização, os oócitos foram misturados com o esperma do macho e hidratados com água do tanque onde se encontravam os progenitores (Figuras 4B,C). Em seguida, os ovos fecundados foram colocados em

sacolas de polipropileno contendo água e saturação de oxigênio (Figura 4E,F) para serem transportados até o Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular, onde foram acondicionados em um aquário de 30 litros, contendo a mesma água proveniente da piscicultura e aeração constante. A temperatura foi controlada e mantida a $\pm 24^{\circ}\text{C}$ através de um aquecedor termostato.



FIGURA 4. Oócitos recém-desovados de uma fêmea (A). Macho liberando o líquido espermático sobre os oócitos (B). Mistura a seco (C), hidratação (D) e aeração (E) para estimular a fertilização. (F) Oxigenação dos ovos para o transporte em sacos plásticos.

3.3. Seleção dos ovos embrionados

Neste trabalho foram adotados os estádios descritos por Rodrigues-Galdino e colaboradores (2010) para o desenvolvimento de *Rhamdia quelen*, considerando:

1. Zigoto: Uma célula.
2. Embrião: Estádios de desenvolvimento dentro do córion, desde a fecundação até a eclosão.
3. Larva: Estádios de desenvolvimento após a eclosão e antes do esgotamento das reservas vitelínicas.

Antes de dar início aos testes de toxicidade, uma amostra de embriões foi colocada em uma placa de petri com ajuda de uma pipeta Pasteur para verificar se estavam no estágio de desenvolvimento de gástrula (cerca de 8 horas após a fertilização - hpf) (RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2010). Em seguida, os embriões viáveis foram transferidos para placas de 96 poços (Corning®). Os testes de toxicidade foram conduzidos em triplicatas: um embrião por poço, 30 embriões por placa e 90 embriões por concentração para cada tempo (48 e 96 hpf). Cada poço recebeu 200 μ L de solução e a exposição foi realizada de forma semi-estática, no qual 100 μ L eram trocados a cada 24 horas. Esta renovação da solução foi realizada por meio de pipetas, aspirando suavemente cada poço e adicionando novamente as soluções teste. O grupo controle recebeu apenas água reconstituída sendo esta também renovada a cada 24 horas. As exposições tiveram durações de quatro dias e durante todo o experimento, as placas foram mantidas na incubadora a uma temperatura controlada de $\pm 24^{\circ}\text{C}$, com proteção total da luz para simular as condições naturais do desenvolvimento da espécie.

3.4. Fixação das larvas

Após o tempo de incubação todas as larvas em 48 e 96 hpf foram coletadas e fixadas por 2 horas em solução de Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato 0,1M pH 7,2 a 7,4 mantido a 4°C) e posteriormente lavadas em tampão Cacodilato 0,1M (2x) para serem realizadas as observações em estereoscópio e as capturas de imagens para o registro das alterações morfológicas.

3.5. Testes de Toxicidade em larvas

3.5.1. Taxa de Eclosão

Por meio da observação com estereoscópio foi registrada a taxa de eclosão das larvas em 24 hpf, isto é, após 16 horas de exposição. A taxa de eclosão foi calculada como sendo o número de larvas que se encontravam fora do córion e apresentavam natação livre em relação ao total de embriões incubados no início da exposição aos tratamentos.

3.5.2. Taxa de Sobrevivência

Foi calculada a porcentagem de sobrevivência das larvas nos períodos de 24, 48, 72 e 96 hpf mediante a observação direta sempre dos mesmos indivíduos em microscópio invertido, registrando como vivas as larvas que se movimentavam e apresentavam batimento cardíaco. A taxa de sobrevivência foi calculada como sendo o número de larvas vivas em relação ao número inicial de embriões incubados em cada tratamento. É importante destacar que, durante todo o experimento, os ovos não eclodidos foram contados como mortos.

3.5.3 Deformidades morfológicas

Para analisar os efeitos dos tratamentos na morfologia das larvas, foram observadas neste trabalho as seguintes deformidades após 48 e 96 hpf:

- 1) Lordose: Curvatura excessiva da espinha dorsal para fora (Figura 7C, E).
- 2) Cifose: Curvatura excessiva da espinha dorsal para dentro (Figura 7D, F).
- 3) Espinhal: Curvatura da espinha dorsal diferente de lordose e cifose (Figura 8C, D, E, F e Figura 9B, D).
- 4) Cefálica: Ausência dos olhos (Figura 9F), deformidade facial e bucal (Figura 9C).
- 5) Edema cardíaco: caracterizado por acúmulo de líquido na cavidade pericárdica (Figura 5F e Figura 6A, B).
- 6) Atrofia corporal: Pouco crescimento em espessura (Figura 6B).
- 7) Encurtamento corporal: extensão corpórea pouco desenvolvida (Figura 6C, D, E, F).
- 8) Nadadeiras: Consiste em danos estruturais nas nadadeiras (Figura 9E, F).
- 9) Saco vitelínico: extravasamento de vitelo ou saco vitelínico malformado (Figura 5C, D).
- 10) Barbilhões: curtos, malformados (Figura 7B e Figura 9E).

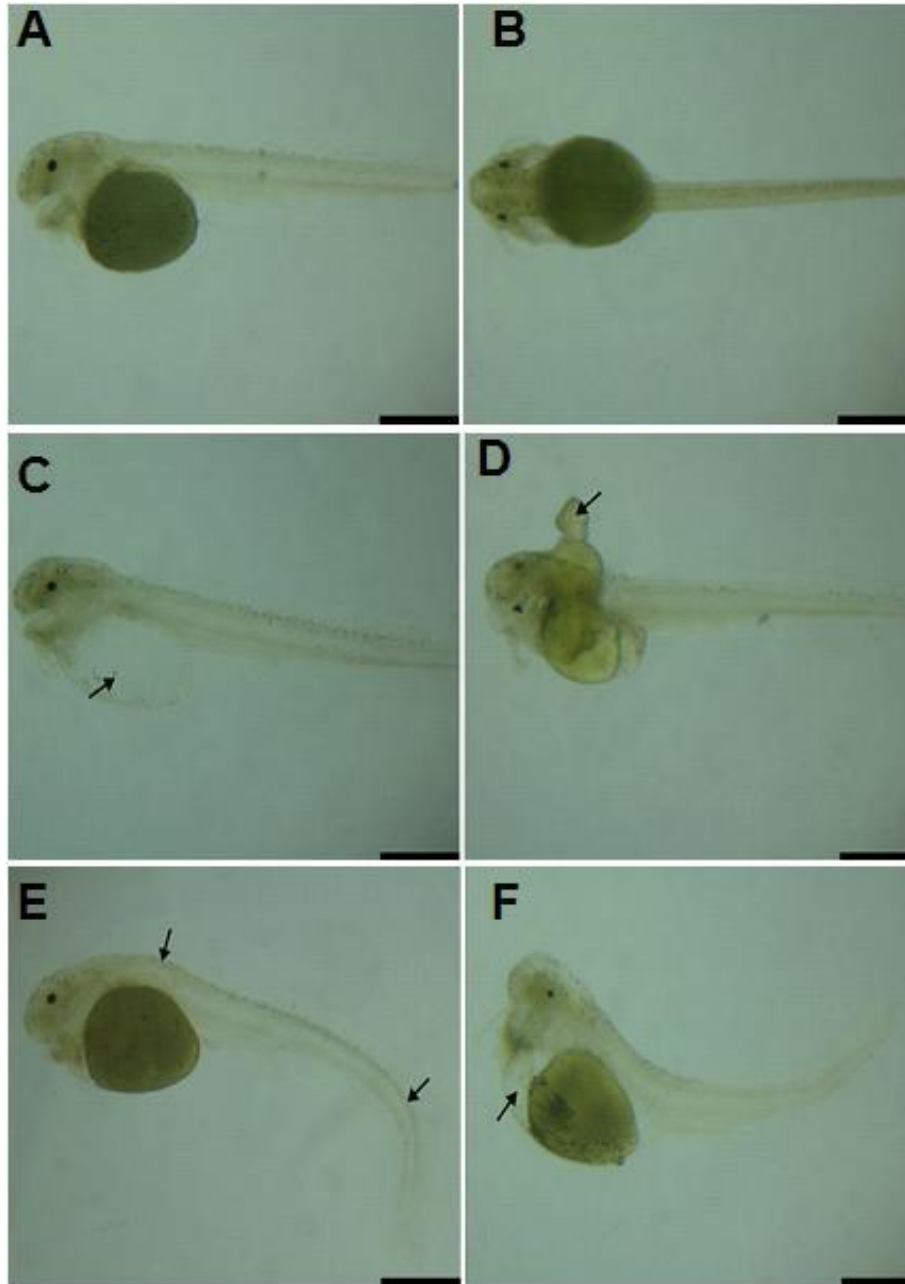


FIGURA 5. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 48 hpf. Controle (A-B), as setas indicam: extravasamento de vitelo (C), saco vitelínico malformado (D), cifose (E), edema cardíaco e lordose (F). Barra = 1 mm.

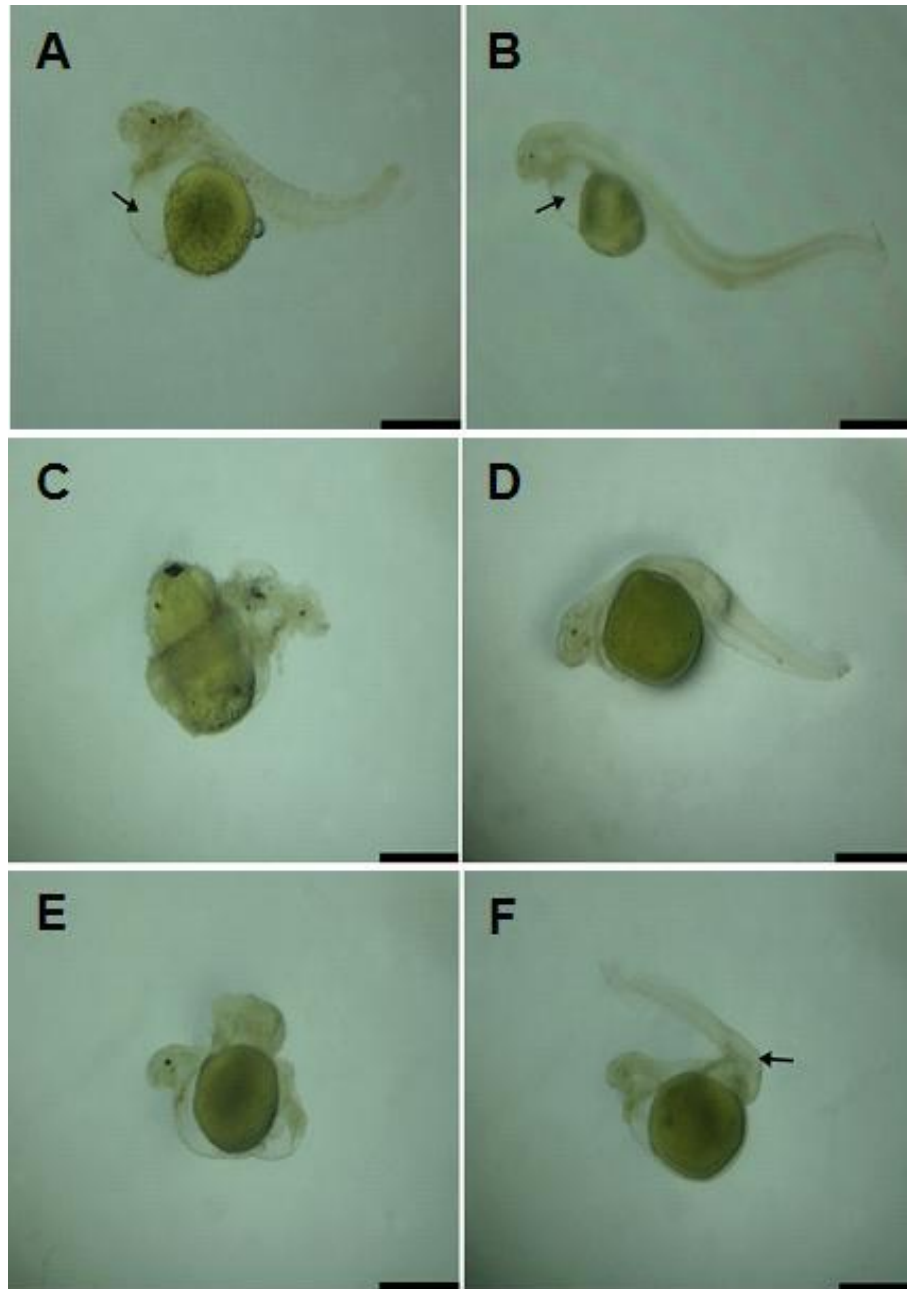


FIGURA 6. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 48 hpf. As setas indicam: Edema cardíaco (A-B) e esqueletos atrofiados (C-D-E-F). Barra = 1 mm.

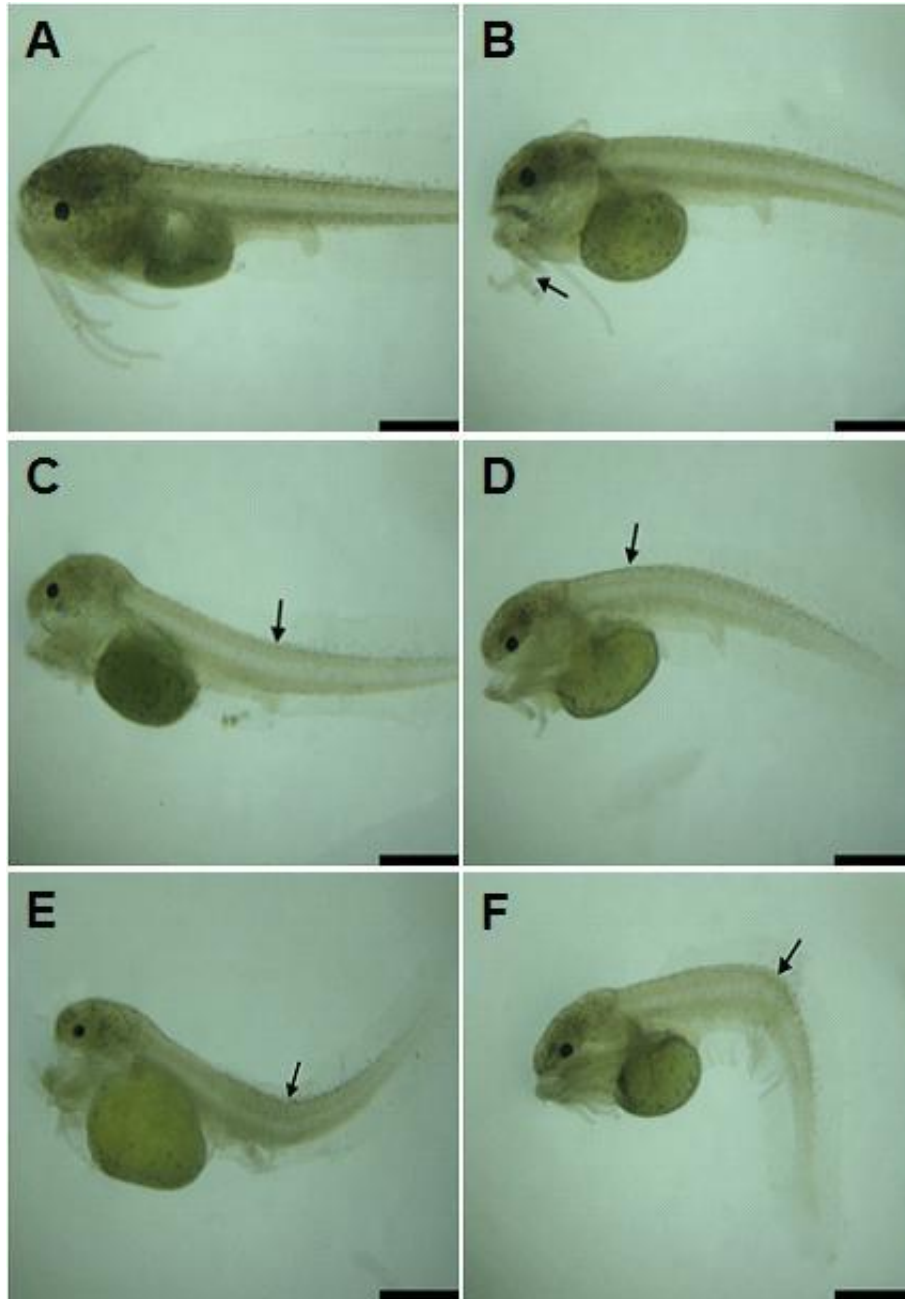


FIGURA 7. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 96 hpf. Controle (A), as setas mostram: barbilhões malformados (B), lordose (C-E) e cifose (D-F). Barra: 1 mm.

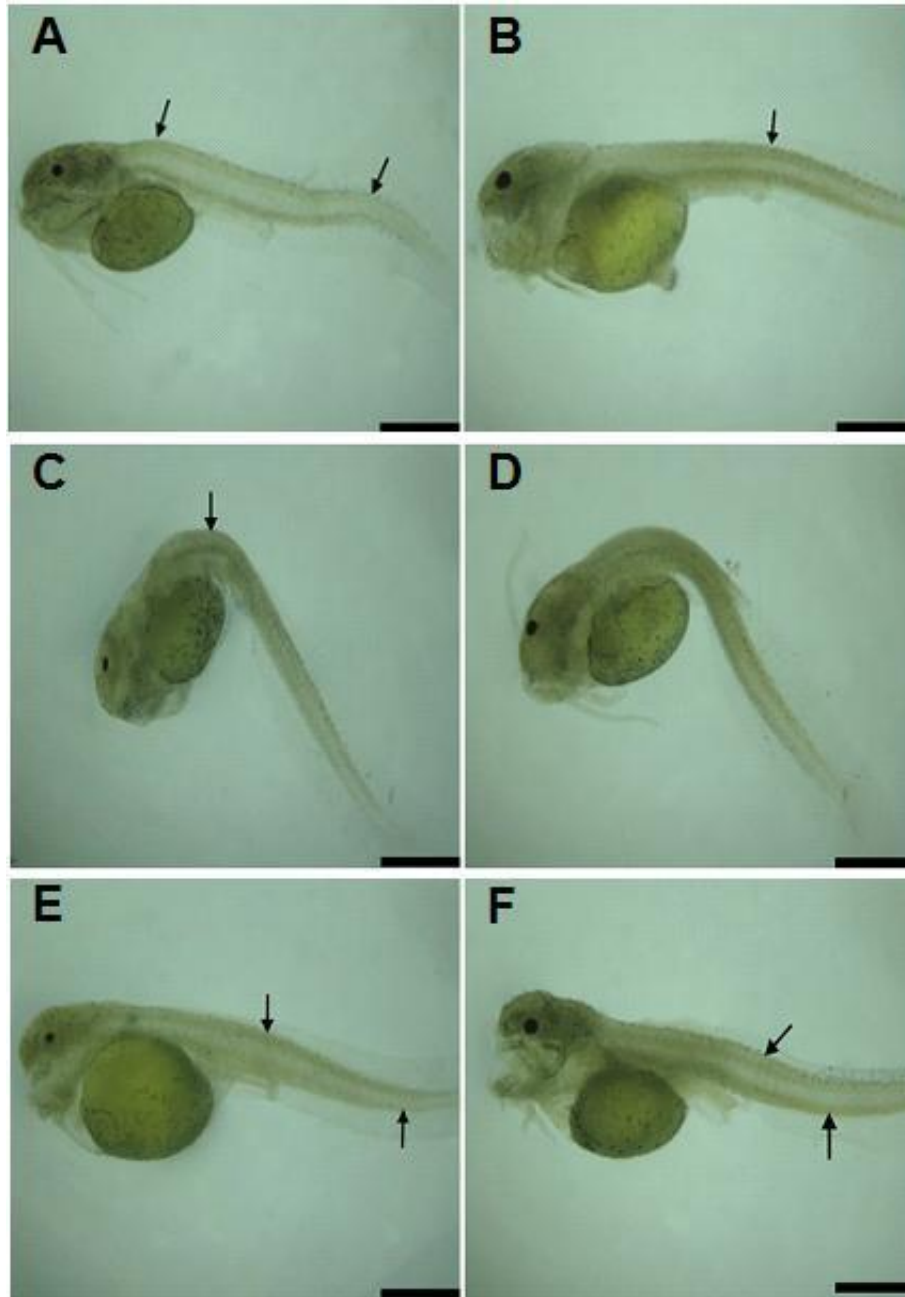


FIGURA 8. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 96 hpf. As setas mostram as alterações espinhais (A-B-C-D-E-F). Barra: 1 mm.

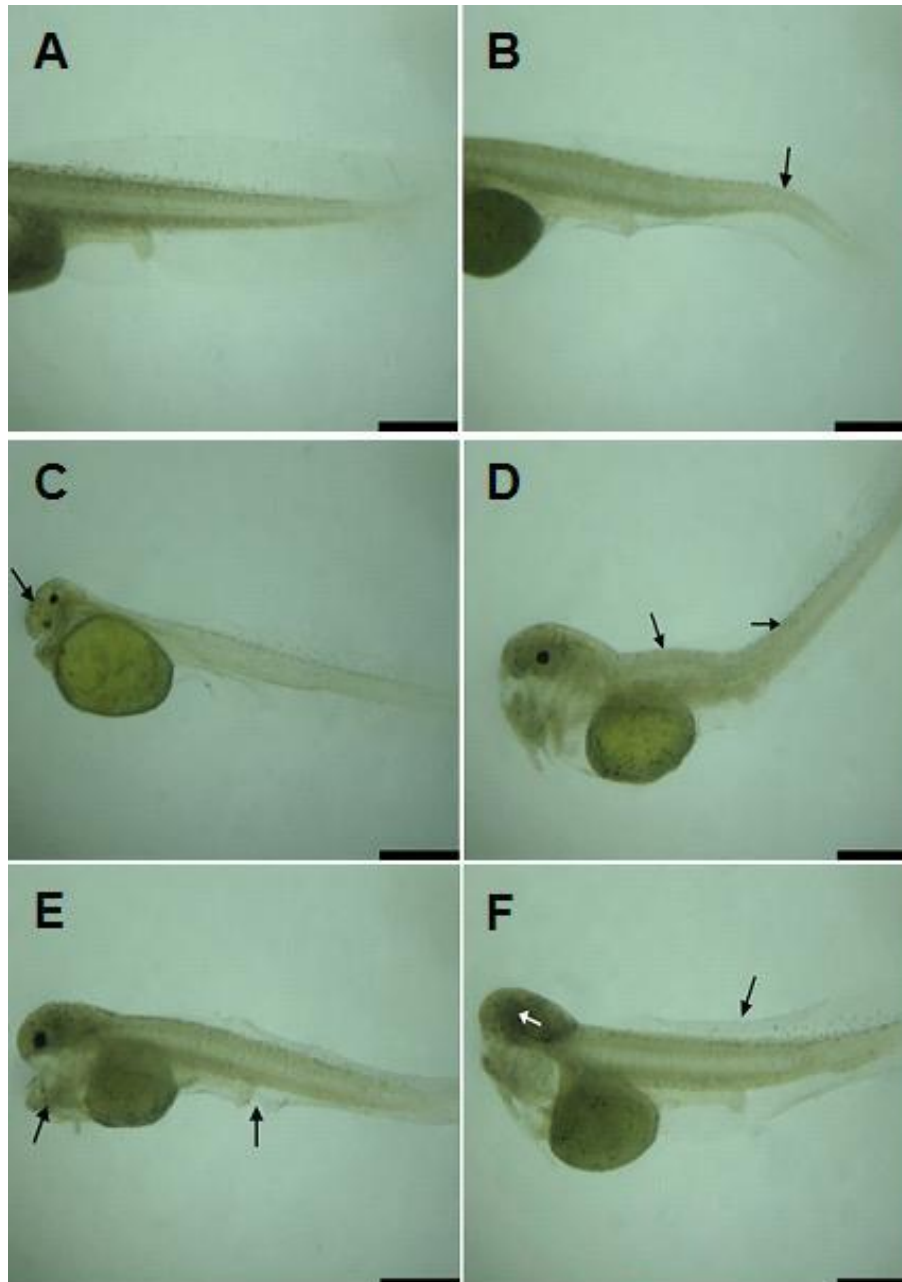


FIGURA 9. Alterações morfológicas encontradas nas larvas em 96 hpf. Controle (A), as setas indicam: espinhal (B-D), cefálico (C-F) nadadeiras danificadas (E-F) e anoftalmia (F- seta branca). Barra: 1 mm.

3.5.4. Análise Morfológica dos neuromastos

Os neuromastos são agrupamentos de células sensoriais e de suporte espalhadas pela superfície do corpo e da cabeça do peixe (GHYSEN e CHAUDIÈRE, 2002). São estruturas ciliadas mecanorreceptivas que permitem ao animal a capacidade de orientação em relação a corrente da água (COOMBS *et al.*, 2001). Alterações destas estruturas em peixes servem como biomarcadores para avaliar os efeitos de xenobióticos no ambiente aquático (FROEHLICHER *et al.*, 2009).

Nas amostras (amostragem de 3 indivíduos escolhidos aleatoriamente) coletadas para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas observações na região cefálica em larvas 96 hpf a fim de identificar alterações estruturais na superfície corporal, especificamente nas células sensoriais dos neuromastos (*hair cells*) que apresentam os cinécílios ou quinecílios (feixe de cílios longos) e de estereocílios (projeções mais curtas) proeminentes os quais são utilizados para avaliar os efeitos.

3.6. Análises dos dados

Para avaliar a diferença entre as médias das taxas de eclosão e porcentagem de ocorrência de deformidades em larvas de *Rhamdia quelen* entre diferentes níveis de exposição aos tratamentos, foi utilizada uma análise de variância unifatorial (ANOVA). Caso o pressuposto de homocedasticidade da ANOVA não sejam atendidos (teste de homogeneidade de variâncias de Levene, $P < 0,05$), foi utilizado um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre tratamentos, testes *a posteriori* (teste de Tukey para a ANOVA, e teste z para Kruskal-Wallis) foram aplicados para avaliar qual tratamento difere. Apesar de o teste de Kruskal-Wallis não ser baseado em médias, as médias dos tratamentos para cada deformidade sempre foram apresentadas nos resultados.

As taxas de sobrevivência das larvas de *Rhamdia quelen* foram comparadas entre tratamentos ao longo de quatro dias por uma análise de variância com

medidas repetidas (RM-ANOVA). Nesse caso, efeitos dos tratamentos, do tempo após a eclosão, e da interação tratamento x tempo foram testadas. Como há diversos níveis de tratamento, a interpretação de interação significativa se restringiu aos maiores e menores valores (teste *a posteriori* de Tukey, $P < 0,05$) no início e no final da exposição. Os testes foram realizados com o software STATISTICA 7.1 (StatSoft, 2005).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das nanopartículas de prata

A agregação das nanopartículas é um fator crítico que afeta o seu destino no ambiente aquoso. Os dados mostraram que neste trabalho, com o procedimento adotado, as nanopartículas de prata não foram desagregadas ou não se mantiveram desagregadas em nanopartículas primárias (<100 nm) quando dissolvidas em água mili-Q, independentemente da sonicação. Através dos resultados foi possível observar que a solução estava composta por agregados de prata maiores do que 200 nm distribuídos de forma homogênea. O potencial zeta permaneceu entre -30 e +30 e corrobora estes dados. Neste intervalo há maior capacidade de formar agregados, enquanto que abaixo de -30 haveria a capacidade de formar nanopartículas isoladas dada a maior capacidade de repulsão pela alta carga associada às nanopartículas (Figuras 10 e 11).

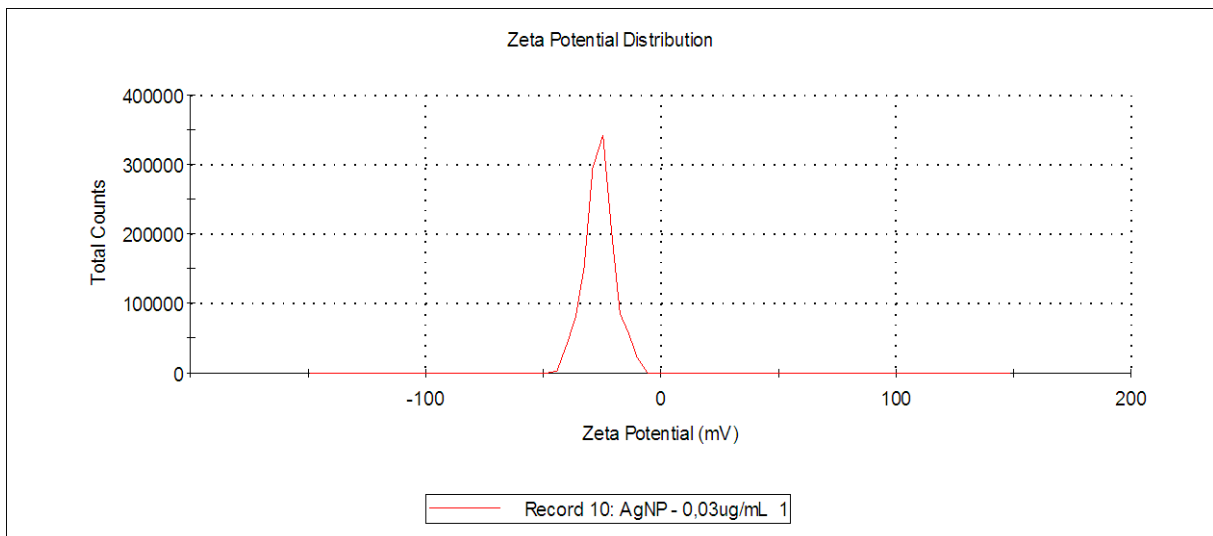


FIGURA 10. Magnitude do potencial zeta.

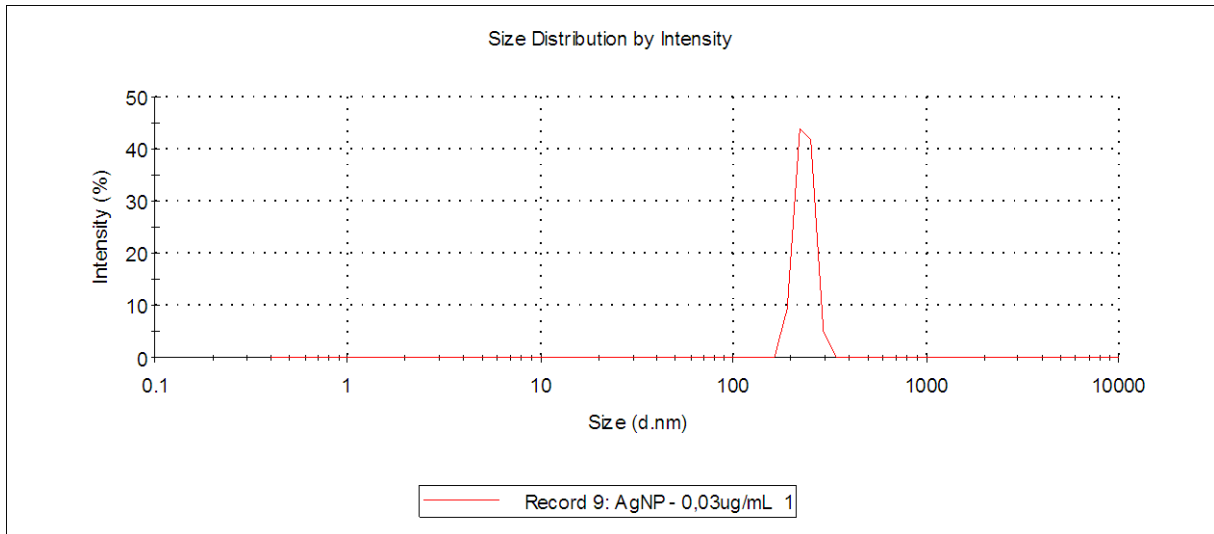


FIGURA 11. Tamanho e distribuição dos agregados de prata.

4.2. Taxa de eclosão

Os dados das taxas de eclosão estão sumarizados na Tabela 4, onde é observada uma variação significativa entre os tratamentos. Nesse caso, é possível observar respostas distintas em relação a este biomarcador. O controle, Pb1 e AgNP não apresentaram nenhuma eclosão após 24 horas da fecundação; o Pb2, Pb3, Pb1+AgNP, Mn1+AgNP, Hg1+AgNP e a mistura das menores concentrações dos metais apresentaram até 4% de aumento na taxa de eclosão em relação ao grupo controle, enquanto todas as concentrações de manganês e mercúrio apresentaram a taxa de eclosão variando de 15 a 50% e a mistura dos metais nas menores concentrações associado com AgNP atingiu mais de 93% de eclosão. Exceto pelos tratamentos Pb1 e AgNP, todos os outros apresentaram altas taxas de eclosão em relação ao grupo controle. As concentrações intermediárias de Mn e Hg apresentaram as maiores taxas de eclosão. Observa-se uma tendência a um padrão para todos os tratamentos onde, em maior ou menor escala, há primeiro um aumento nas concentrações intermediárias para depois diminuir nas concentrações mais altas. No entanto, estas permanecem mais altas do que as menores concentrações apenas para o manganês. As taxas de eclosão dos ovos expostos a estes metais nas diferentes concentrações variaram de 7 a 30 vezes em relação aos menores valores como os encontrados para o chumbo. Nas menores concentrações de Mn e Hg o aumento na taxa de eclosão foi superior a 15 vezes ao encontrado no controle, porém, verificou-se que ao associar a exposição destes metais nas

menores concentrações com a AgNP, ocorre uma redução na taxa de eclosão para a espécie em estudo de 9 e 8 vezes respectivamente. Quando misturados nas suas menores concentrações os metais não alteraram muito dos valores encontrados para o chumbo quando exposto isoladamente, no entanto, a taxa de eclosão aumenta aproximadamente em 24 vezes quando a mistura de metais na sua menor concentração é associada com a AgNP.

TABELA 4. Taxa de eclosão (%) dos tratamentos (concentrações de poluentes) após 24 horas da fecundação. Letras compartilhadas indicam médias similares e letras diferentes indicam médias diferentes (Teste de Tukey, $P > 0,05$). NA: não analisado por não ser verificado eclosão em nenhuma observação.

Tratamento	Taxa de eclosão
Controle	NA 0 (± 0)
Pb1	NA 0 (± 0)
Pb2	2,06 ($\pm 0,05$) ^a
Pb3	1,36 ($\pm 0,56$) ^a
Mn1	19,57 ($\pm 3,46$) ^{b, e}
Mn2	62,32 ($\pm 4,84$) ^c
Mn3	48,33 ($\pm 4,06$) ^d
Hg1	21,05 ($\pm 2,65$) ^e
Hg2	56,33 ($\pm 4,37$) ^{c, d}
Hg3	15,49 ($\pm 4,6$) ^{b, e}
AgNP	NA 0 (± 0)
Pb1+AgNP	1,04 ($\pm 1,04$) ^a
Mn1+AgNP	2,82 ($\pm 1,61$) ^a
Hg1+AgNP	2,59 ($\pm 1,34$) ^a
Mistura	3,97 ($\pm 0,57$) ^a
Mist+AgNP	93,5 ($\pm 2,6$) ^f

F = 314,4; $p < 0,01$

4.3. Taxa de sobrevivência

Próximo do período de eclosão, as larvas submetidas a todos os tratamentos com chumbo apresentaram taxa de sobrevivência maior que 85%, sendo que aquelas incubadas na concentração intermediária (30µg/L) apresentaram taxa mais semelhante ao do controle. Após 72 horas da fecundação, houve pouca variação na sobrevivência. Entretanto, após 96 horas, enquanto a sobrevivência do grupo controle manteve-se estável, ela caiu para 82,6% e 70,9% nos grupos Pb2 e Pb3 respectivamente. Já o grupo Pb1, que iniciou com 85%, após 24 horas da fecundação teve uma pequena queda para 84,5% (Figura 12).

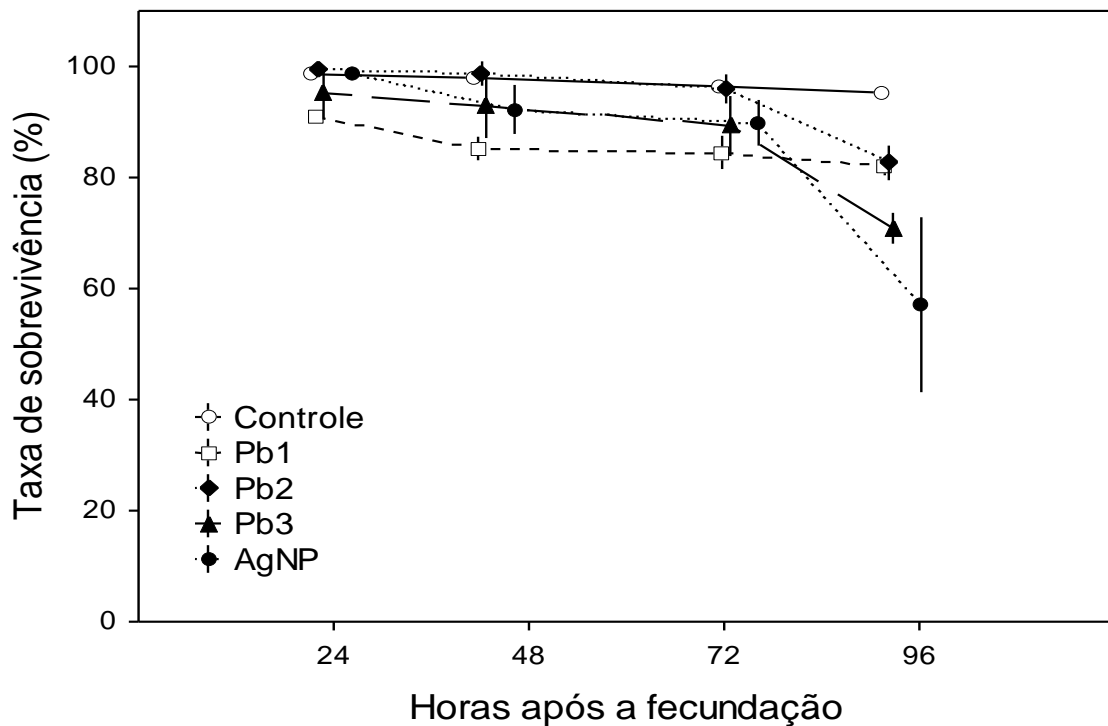


FIGURA 12. Taxa de sobrevivência média (barras indicam o desvio padrão) dos diferentes tratamentos de Pb e AgNP em diferentes períodos após a fecundação.

Próximo ao período da eclosão, a taxa de sobrevivência das larvas incubadas em Mn1 (100 µg/L) é semelhante ao do grupo controle (cerca de 96%), e

diminuí 10,6% em 96 hpf (Figura 13). Em contrapartida, os grupos Mn2 e o Mn3 apresentaram baixos percentuais em relação ao controle já nas primeiras 24 horas, cerca de 82% e 83% respectivamente. No Mn2 não foi observado uma queda gradual na taxa de sobrevivência entre 48 e 72 hpf mantendo-se quase constante, contudo, houve uma redução abrupta de 69,4% para 55,5% em 96 hpf. Ao contrário do Mn2, no Mn3 houve uma queda acentuada na taxa de sobrevivência das larvas entre 48 e 96 hpf, resultando a cerca de 10% de larvas vivas (Figura 13).

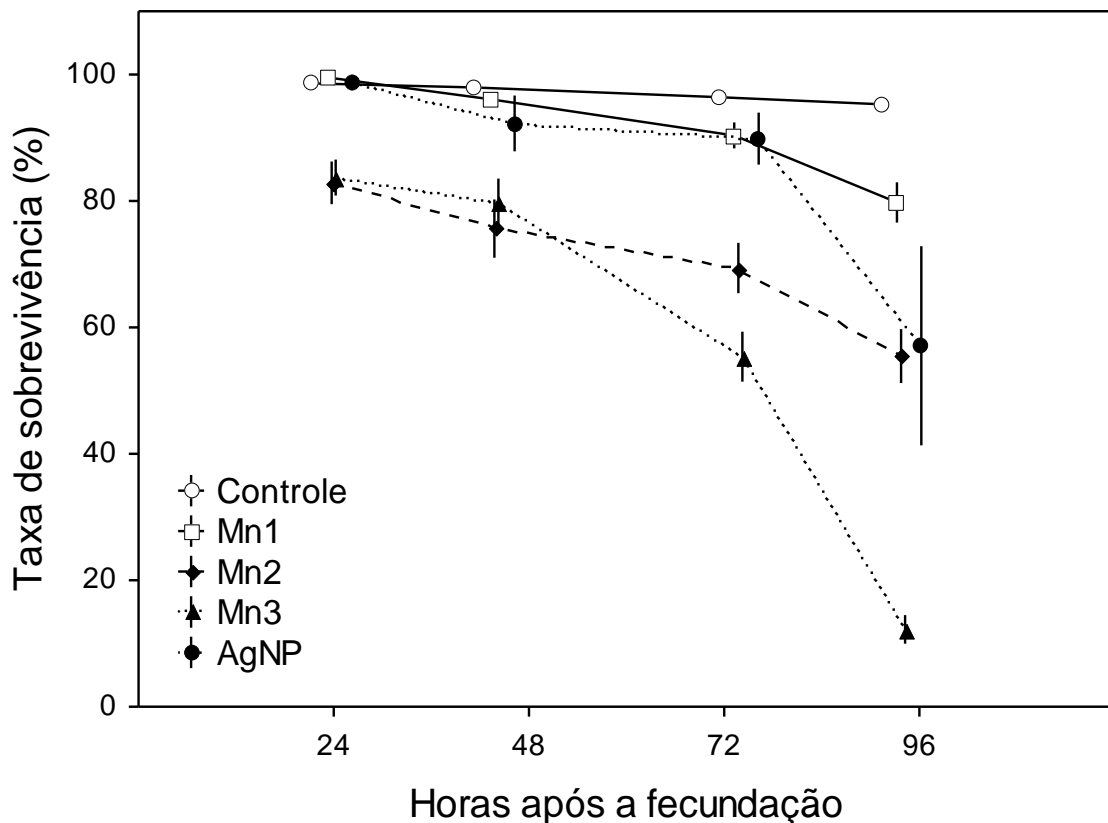


FIGURA 13. Taxa de sobrevivência média (barras indicam o desvio padrão) dos diferentes tratamentos de Mn e AgNP em diferentes períodos após a fecundação.

As taxas de sobrevivência para os grupos Hg1 e Hg3 variaram pouco quando comparadas com a taxa do grupo controle nas primeiras 72 hpf. De 72 a 96 hpf houve uma redução significativa de 91,6% para 79,9% em Hg1, e de 93,9% para 67,6% em Hg3 (Figura 14). O grupo Hg2 apresentou a menor taxa de sobrevivência desde as primeiras 24 hpf (87,5%), e ao longo do tempo este valor caiu até atingir a média de 62,3% ao final de 96 hpf (Figura 14).

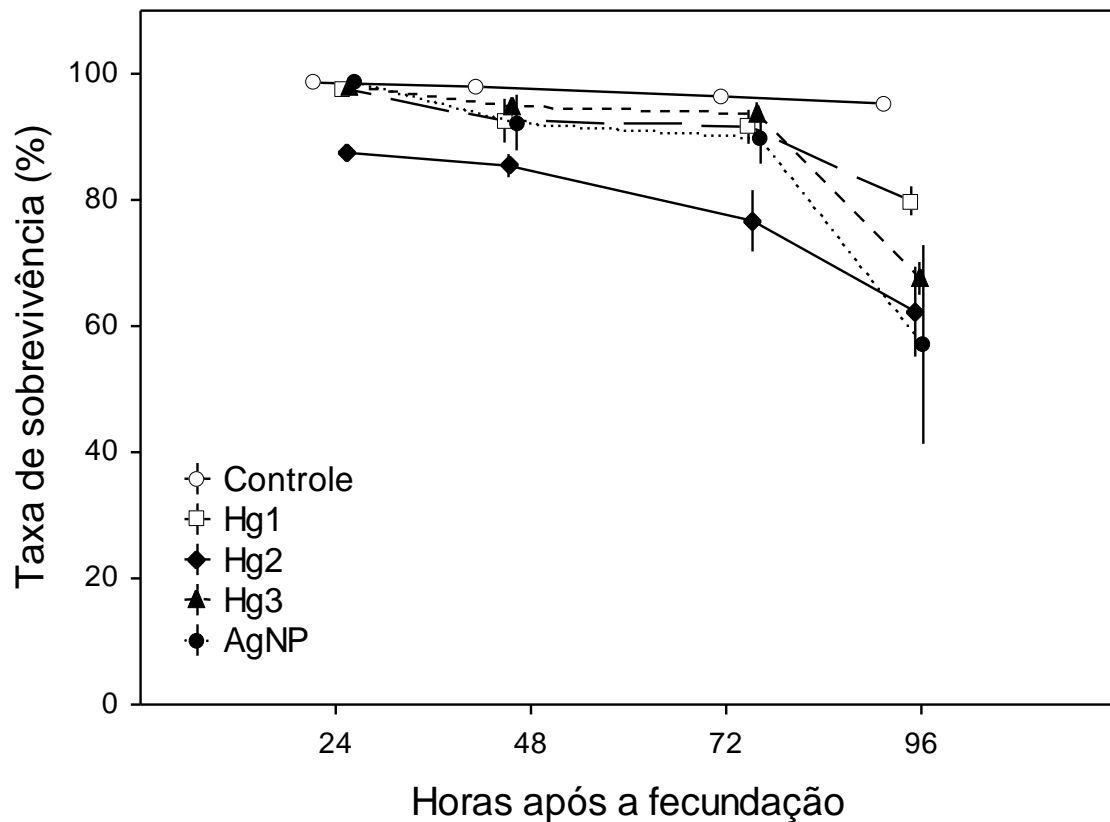


FIGURA 14. Taxa de sobrevivência média (barras indicam o desvio padrão) dos diferentes tratamentos de Hg e AgNP em diferentes períodos após a fecundação.

A queda na taxa de sobrevivência do grupo AgNP apresentou pouca variação em relação ao grupo controle durante as 72 hpf (Figura 14). Porém, entre 72 e 96 hpf houve uma redução de 32,8%, totalizando cerca de 57,1% de larvas vivas ao final do experimento (Figuras 12, 13 e 14).

As taxas de sobrevivência das misturas Mn1+AgNP e Hg1+AgNP foram similares entre elas e em relação às taxas observadas em Mn1 e Hg1, com uma redução significativa em relação ao grupo controle somente a partir das 72 hpf (de 91,3% para 81,6% e de 90,5% para 77,7%, respectivamente) (Figura 15).

Embora o grupo exposto apenas ao Pb1 não tenha apresentado grandes variações na taxa de sobrevivência ao longo do tempo de exposição, a mistura Pb1+AgNP obteve, de forma constante, a menor taxa durante todo o experimento (Figura 15).

A taxa de sobrevivência da mistura das menores concentrações dos metais sem a adição da AgNP foi diferente quando comparada com a exposição à cada metal individualmente, isto é, houve uma redução significativa já a partir de 24 hpf.

Na mistura associada à AgNP, a taxa de sobrevivência em 24 hpf foi de 87,7%, cerca de 10% a menos do que a taxa observada no grupo controle. Esta taxa permaneceu constante até 72 hpf em que se observa uma redução abrupta de 25% nas últimas 24 horas de experimento (Figura15).

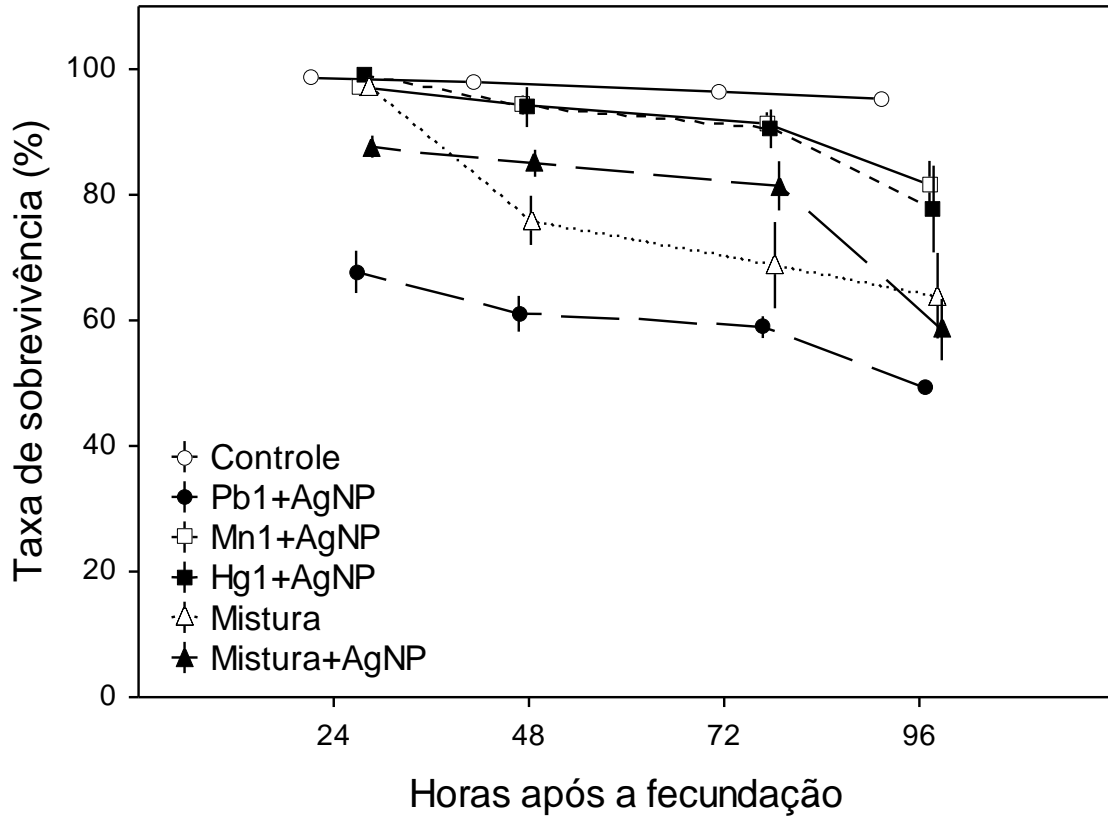


FIGURA 15. Taxa de sobrevivência média (barras indicam o desvio padrão) das diferentes misturas em diferentes períodos após a fecundação.

4.4. Frequência de deformidades

Quanto à ocorrência de deformidades em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Pb em 48 hpf, observa-se que há um aumento nos diferentes tipos de malformações, enquanto Pb1 apresenta apenas três tipos de deformidades, estas aumentam nas concentrações seguintes para cinco e sete respectivamente. As deformidades lordose e atrofia corporal tiveram incidência em todos os grupos, incluindo o controle. Em contrapartida, nenhum dos tratamentos com Pb apresentou encurtamento corporal e deformações no saco vitelínico. As alterações cefálicas e edema cardíaco ocorreram nas maiores concentrações Pb2 e Pb3 (30 e 90 µg/L respectivamente), enquanto que cifose e danos estruturais nas nadadeiras foram observadas somente em Pb3. Já as torções espinhais ocorreram em larvas controle, Pb1 e Pb3. Para todas as deformidades analisadas não foi observada nenhuma relação concentração dependente significativa em relação ao grupo controle (Tabela 5).

As deformidades cefálicas, atrofia corporal, lordose, cifose e outras torções espinhais ocorreram nos três tratamentos de Mn, porém, sem relação dose dependente significativa entre os tratamentos (Tabela 5). Dentre estas deformidades, apenas as cefálicas não foram observadas no grupo controle. Nenhum dos grupos avaliados apresentou edema cardíaco e alterações no saco vitelínico. Danos nas nadadeiras ocorreram nos tratamentos Mn1 e Mn2 (100 e 500 µg/L respectivamente), enquanto que encurtamento corporal esteve presente somente na concentração intermediária. O grupo Mn1 apresentou seis tipos de deformidades, estas aumentam para sete em Mn2 e diminuem para cinco na maior concentração Mn3.

Nos grupos tratados com Hg, a quantidade de deformidades aumentou na maior concentração. Hg1 (0,2 µg/L) e Hg2 (2 µg/L) apresentam quatro tipos de deformidades, e estas aumentam para seis em Hg3 (20 µg/L). A lordose e atrofia corporal tiveram incidências no grupo controle e nas três concentrações de Hg, sendo possível observar as maiores frequências destas duas deformidades no grupo exposto à menor concentração (39,68% e 71,02%, respectivamente) (Tabela 5). Em 48 hpf, alterações cefálicas e edema cardíaco não ocorreram no grupo controle e na concentração intermediária de Hg. Encurtamento corporal e cifose não ocorreram

nos três tratamentos, enquanto que as torções espinhais tiveram incidência em Hg2 e Hg3, malformações no saco vitelínico em Hg2 e alterações nas nadadeiras somente em Hg3 (Tabela 5). Destas, apenas as deformidades espinhais, no saco vitelínico e cifose também ocorreram no grupo controle.

O grupo exposto às AgNPs apresentou todos os tipos de deformidades com exceção do encurtamento corporal. As deformidades observadas na coluna vertebral da espécie em estudo (lordose, cifose e outras torções espinhais), no saco vitelínico e a atrofia corporal também estavam presentes no grupo controle, e apenas as frequências de lordose, cifose e espinhal foram maiores no tratamento com as AgNPs (Tabela 5).

Quanto a ocorrência de deformidades em larvas expostas à mistura Pb1+AgNP, observa-se que há uma redução na ocorrência de lordose, atrofia corporal e espinhal em relação ao grupo controle e à ação isolada do metal em 48 hpf. Já as deformidades cefálicas, edema cardíaco e cifose tiveram um aumento na ocorrência (Tabela 5). As alterações no saco vitelínico e nas nadadeiras não foram observadas tanto no grupo exposto à mistura Pb1+AgNP quanto no grupo exposto somente à menor concentração do chumbo, porém, observa-se ambas as deformidades no tratamento individual de AgNP. Não houve incidência de encurtamento corporal em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 5).

Em larvas expostas à mistura Mn1+AgNP observa-se um aumento nas frequências de lordose, alterações cefálicas, espinhais e de malformações no saco vitelínico quando comparadas aos grupos controle e Mn1. Em contrapartida, as frequências de danos estruturais nas nadadeiras, cifose e atrofia corporal diminuíram na associação deste metal com a AgNP. Edema cardíaco e encurtamento corporal não ocorreram nas larvas destes tratamentos (Tabela 5). No grupo tratado com Hg1+AgNP, observa-se uma queda nas ocorrências de lordose, edema cardíaco e de atrofia corporal e um aumento nas ocorrências de encurtamento corporal, cifose e de outras torções espinhais quando comparadas aos resultados da ação isolada do Hg1, enquanto que a frequência média de malformações cefálicas no tratamento Hg1 não variou do grupo exposto à soma deste metal com as AgNPs (2,78% e 2,75, respectivamente). Nenhuma larva apresentou modificações no saco vitelínico e nas nadadeiras nestes tratamentos (Tabela 5).

O grupo exposto à mistura das menores concentrações dos metais pesados apresentou cinco tipos de deformidades em 48 hpf. As frequências de lordose e de edema cardíaco foram maiores em relação ao grupo controle, enquanto que as deformidades no saco vitelínico, espinhais, cifose e atrofia corporal tiveram menores incidências. Assim como o grupo controle, nenhuma larva exposta à mistura apresentou encurtamento corporal, alterações cefálicas e danos nas nadadeiras (Tabela 5). Já no grupo exposto à mistura acrescida das AgNPs observa-se apenas quatro tipos de deformidades. As ocorrências de lordose, atrofia corporal, edema cardíaco e cifose diminuíram em relação ao grupo da mistura sem AgNP, enquanto que observa-se um aumento nas frequências de deformidades cefálicas e espinhais (Tabela 5). Nenhuma larva com 48 horas exposta à mistura+AgNP apresentou alterações no saco vitelínico, nas nadadeiras e encurtamento corporal, semelhante às larvas expostas somente à mistura das menores concentrações dos metais.

TABELA 5. Ocorrência de deformidades (%) dos tratamentos (concentrações de poluentes) após 48 horas da fecundação. Caso haja diferenças significativas, testes *a posteriori* indicam médias similares (letras compartilhadas, $P > 0,05$) ou médias diferentes estatisticamente (letras diferentes, $P < 0,05$). Veja a descrição dos tratamentos e de cada deformidade nos métodos.

Tratamento	Deformidade analisada								
	Lordose	Cifose	Espinal	Cefálico	Edema cardíaco	Saco Vitelínico	Atrofia corporal	Nadadeiras	Encurtamento corporal
	H = 16,32 P = 0,29	F = 1,36 P = 0,28	H = 4,34 P = 0,98	H = 11,37 P = 0,41	F = 1,86 P = 0,16	F = 0,22 P = 0,88	F = 5,41 P < 0,001	F = 0,52 P = 0,72	F = 0,65 P = 0,46
Controle	5,74 (±1,70)	2,56 (±4,44)	5,36(±5,8)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	3,18 (±2,76)	10,74 (±8,17) ^a	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)
Pb1	8,12 (±8,04)	NA 0 (±0)	7,3 (±3,02)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	5,39 (±6,8) ^a	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)
Pb2	24,32 (±22,5)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	10,58(±11,15)	5,55 (±5,88)	NA 0 (±0)	16,93 (±15) ^a	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)
Pb3	9,22 (±8,30)	1,19 (±2,06)	6,04 (±2,06)	1,28 (±2,22)	1,19 (±2,06)	NA 0 (±0)	6,11 (±4,7) ^a	2,47 (±2,14)	NA 0 (±0)
Mn1	4,36 (±4,18)	1,59 (±2,75)	3,17 (±5,49)	9,52 (±16,49)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	12,7 (±21,99) ^a	3,17 (±5,5)	NA 0 (±0)
Mn2	9,0 (±5,9)	9,67 (±2,69)	3,12 (±5,4)	5,8 (±7,5)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	5,8 (±7,5) ^a	3,47 (±3,18)	6,94 (±12,02)
Mn3	3,03 (±5,25)	9,97 (±10,44)	2,9 (±2,51)	4,42 (±4,55)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	4,29 (±4,17) ^a	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)
Hg1	39,68(±22,09)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	2,78 (±4,08)	1,19 (±2,06)	NA 0 (±0)	71,02 (±20,83) ^b	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)
Hg2	5,72 (±6,86)	NA 0 (±0)	11,91 (±13,55)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	4,44 (±7,7)	25,47(±26,74) ^a	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)
Hg3	11,10 (±5,55)	NA 0 (±0)	19,44 (±33,67)	20,37(±17,85)	8,33 (±2,78)	NA 0 (±0)	14,81 (±13,98) ^a	7,4 (±8,48)	NA 0 (±0)
AgNP	12,90 (±3,73)	4,17 (±7,22)	6,27 (±9,05)	12,9 (±5,77)	3,84 (±3,36)	1,75 (±3,03)	9,02 (±9,39) ^a	2,08 (±3,6)	NA 0 (±0)
Pb1+AgNP	NA 0 (±0)	3,8 (±3,84)	4,26 (±4,57)	7,11 (±6,83)	2,25 (±2,41)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)
Mn1+AgNP	10,24 (±9,1)	NA 0 (±0)	10,54 (±14,65)	19,42(±13,06)	NA 0(±0)	6,06(±10,49)	2,9 (±5,01) ^a	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)
Hg1+AgNP	2,47 (±2,14)	2,74 (±2,41)	2,47 (±4,27)	2,75 (±2,41)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	13,18 (±1,89) ^a	NA 0 (±0)	1,23 (±2,14)
Mistura	8,7 (±8,02)	1,44 (±2,5)	2,9 (±5,01)	NA 0 (±0)	1,45 (±2,5)	NA 0 (±0)	6,34 (±5,55) ^a	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)
Mist+AgNP	6,40 (±2,43)	NA 0 (±0)	6,39 (±6,25)	14,18 (±11,39)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	1,45 (±2,5) ^a	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)

Controle = sem adição de poluentes; NA =: não analisado por não ser observado deformidade (média = 0, desvio padrão = 0)

Após 96 horas da fecundação observa-se uma menor ocorrência na quantidade de deformidades nos diferentes tratamentos em estudo em relação à primeira análise feita em 48 hpf. Atrofia corporal, edema cardíaco, encurtamento corporal, danos estruturais nas nadadeiras e no saco vitelínico não foram mais observados em nenhuma larva avaliada ao final do experimento. Além disso, em 96 hpf foi possível observar alterações na morfologia dos barbilhões recém-formados (Tabela 6).

As frequências das deformidades verificadas na coluna vertebral (lordose, cifose e outras torções espinhais) foram menores no grupo controle em 96 hpf em relação a 48 hpf. Apesar de em ambos os períodos experimentais não ter sido observada nenhuma alteração cefálica, cerca de 2,38% das larvas do grupo controle apresentaram barbilhões malformados (Tabela 6).

Ao final do experimento, as ocorrências de lordose e alterações cefálicas foram maiores em Pb1 e Pb3, e menores em Pb2 quando comparadas com os mesmos tratamentos em 48 hpf, de modo contrário, observa-se que as frequências de deformidades espinhais foram maiores na concentração intermediária e menores em Pb1 e Pb3 (Tabela 6). Já a quantidade de larvas com cifose foi maior nas três concentrações de Pb em relação aos grupos avaliados em 48 hpf. Além disso, constatou-se que, independente da concentração, em média todas as larvas expostas ao chumbo possuíam barbilhões deformados (Tabela 6).

Nos grupos expostos ao Mn, observa-se que em 96 hpf a frequência de lordose aumentou em Mn1 e Mn2 e reduziu em Mn3 quando comparada com a avaliação feita em 48 hpf. Já o percentual de alterações cefálicas e espinhais diminuiu nos grupos Mn1 e Mn2 e aumentou em Mn3 cerca de oito e quinze vezes respectivamente. Semelhante ao chumbo, a quantidade de larvas com cifose foi maior nas três concentrações de Mn em 96 hpf e, em média, todas as larvas expostas ao Mn possuíam barbilhões deformados (Tabela 6). O grupo exposto à menor concentração de Hg apresentou uma frequência de lordose dez vezes menor ao observado em 48 hpf. Além disso, a frequência de deformidades espinhais foi maior em Hg1 e menor em Hg2 e Hg3, enquanto que nenhuma larva nas três concentrações apresentou alterações cefálicas. A partir da tabela 6, é possível observar que não houve a ocorrência de cifose em nenhuma larva exposta aos tratamentos de mercúrio em 48 hpf, em contrapartida, esta deformidade apareceu nos grupos Hg1, Hg2 e Hg3 avaliados após 96 horas da fecundação de forma

inversamente proporcional à concentração (63,36%, 48,6% e 21,95%, respectivamente). Nos três tratamentos de Hg houve uma variação nas ocorrências de barbilhões malformados de 96 a 100% (Tabela 6).

As frequências de lordoses e alterações cefálicas observadas no grupo exposto à AgNP (0,03 mg/L) em 96 hpf não foram diferentes das encontradas em 48 hpf. Além disso, observa-se que as ocorrências de cifose e outras torções espinhais aumentaram ao final do experimento. Todas as larvas expostas à AgNP apresentaram algum tipo de alteração nos barbilhões (Tabela 6). No grupo exposto à mistura Pb1+AgNP observa-se uma redução na frequência de lordose, e um aumento na ocorrência de torções espinhais e cifose quando comparadas com o grupo exposto somente ao Pb1 (10 µg/L) em 96 hpf. Assim como nos grupos tratados com Pb1 e AgNP, nenhuma larva exposta à mistura Pb1+ AgNP apresentou barbilhões normais (Tabela 6). Em 96 hpf as ocorrências de cifose e outras torções foram maiores em relação a 48 hpf, enquanto que nenhuma larva exposta ao Pb1+AgNP apresentou lordose em ambos os períodos. No grupo exposto à mistura Mn1+AgNP houve uma redução nas frequências de todas as deformidades, com exceção da cifose que aumentou cerca de 4 vezes em relação à ação individual da menor concentração de Mn. De acordo com a tabela 6, nenhuma larva exposta ao Mn1+AgNP possuiu alterações cefálicas e, apesar disso, 98,33% apresentou barbilhões deformados. Quando comparada com a análise deste grupo feita em 48 hpf, observa-se que somente a frequência de cifose foi maior em 96 hpf, cerca de 66 vezes. No tratamento Hg1+AgNP, as frequências das deformidades foram semelhantes às frequências observadas nas larvas expostas somente ao respectivo metal em 96 hpf, com exceção da cifose cuja frequência caiu pela metade. Praticamente todas as larvas expostas à esta mistura também apresentaram problemas relacionados aos barbilhões (Tabela 6). É importante destacar que apenas 2,74% das larvas observadas em 48 hpf apresentaram cifose, enquanto que em 96 hpf, cerca de 30,39% apresentaram tal deformidade.

No grupo exposto à mistura das menores concentrações dos metais observa-se que a frequência de lordose foi menor em relação ao grupo controle em 96 hpf, e menor do que a frequência observada nas larvas expostas ao mesmo tratamento avaliadas em 48 hpf. No entanto, as frequências de cifose e de outras deformidades espinhais aumentaram. Nenhuma larva apresentou alterações cefálicas ao final do experimento, mas em média 56% das larvas expostas à mistura

apresentaram barbilhões deformados. Já no grupo exposto à mistura das menores concentrações dos metais acrescida da AgNP observa-se aumento nas ocorrências das deformidades cefálicas, torções espinhais e de cifose em relação ao grupo da mistura sem adição de AgNP e ao controle. Além disso, observa-se que em média 50% das larvas expostas à mistura+ AgNP apresentaram barbilhões normais. Por fim, é possível observar a partir das tabelas 5 e 6 que as frequências de cifose e torções espinhais aumentaram e de lordose e malformações cefálicas diminuíram ao final das 96 horas.

TABELA 6. Ocorrência de deformidades (%) dos tratamentos (concentrações de poluentes) após 96 horas. Caso haja diferenças significativas, testes *a posteriori* indicam médias similares (letras compartilhadas, $P > 0,05$) ou médias diferentes (letras diferentes, $P < 0,05$). Veja a descrição dos tratamentos e de cada deformidade nos métodos.

Tratamento	Deformidade analisada				
	Lordose	Cifose	Espinal	Cefálico	Barbilhões
	H = 19,06 P = 0,06	H = 32,37 P = 0,03	H = 11,86 P = 0,46	H = 8,04 P = 0,23	F = 37,12 P < 0,001
Controle	2,26(±1,97)	NA 0(±0)	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	2,38 (±4,12) ^a
Pb1	14,55(±3,64)	0,92(±1,6) ^a	3,18 (±13,9)	1,11(±1,92)	100 (±0) ^c
Pb2	9,25 (±3,21)	9,25(±6,41) ^{a,b}	1,85 (±13,9)	NA 0 (±0)	100 (±0) ^c
Pb3	19,45 (±7,87)	4,11(±4,16) ^{a,b}	2,38 (±4,12)	5,33(±9,23)	98,8 (±2,06) ^c
Mn1	8,05 (±7,14)	16,47(±3,24) ^{a,b}	9,8 (±8,55)	1,75(±3,03)	96,49 (±6,07) ^c
Mn2	14,07(±7,6)	20,58(±11,3) ^{a,b}	3,7 (±6,41)	NA 0 (±0)	92 (±3,31) ^c
Mn3	NA 0 (±0)	27,77(±25,46) ^{a,b}	44,44 (±9,62)	33,33(±28,87)	100 (±0) ^c
Hg1	3,7 (±6,41)	63,36(±10,12) ^{a,b}	2,38 (±4,12)	NA 0 (±0)	100 (±0) ^c
Hg2	9,25 (±8,48)	48,6(±15,77) ^{a,b}	2,08 (±3,6)	NA 0 (±0)	100 (±0) ^c
Hg3	8,33 (±14,43)	21,95(±26,55) ^{a,b}	NA 0 (±0)	NA 0 (±0)	96,07 (±6,79) ^c
AgNP	14,29(±2,23)	14,8 (±3,68) ^{a,b}	NA 0 (±0)	14,84 (±1,91)	100 (±0) ^c
Pb1+AgNP	NA 0(±0)	33,66(±3,28) ^{a,b}	14,84 (±2,19)	NA 0 (±0)	100 (±0) ^c
Mn1+AgNP	NA 0 (±0)	66,19(±10,96) ^{a,b}	4,2(±3,9)	NA 0 (±0)	98,33(±2,88) ^c
Hg1+AgNP	NA 0 (±0)	30,39(±11,36) ^b	3,91 (±0,3)	1,33 (±2,3)	96,28 (±3,58) ^c
Mistura	1,51(±2,62)	9,54 (±8,29) ^{a,b}	4,07 (±3,86)	NA 0 (±0)	56,1 (±14,84) ^b
Mist+AgNP	1,39 (±2,4)	31,54 (±19,91) ^{a,b}	16,2 (±24,54)	1,85 (±3,20)	53,17 (±21,6) ^b

Controle = sem adição de poluentes; NA =: não analisado por não ser observado deformidade (média = 0, desvio padrão = 0) ou ser observado 100% de deformidade em todas as réplicas.

4.5. Alterações morfológicas dos neuromastos

Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram observadas alterações morfológicas em estruturas mecanorreceptoras (neuromastos). As células sensoriais dos neuromastos possuem cerca de 40-60 μm de largura na base e 20 μm de altura. Morfologicamente são estruturas circulares de onde partem um feixe de cílios mais longos denominados cinecílios (ou quinecílios) e outras projeções mais curtas (estereocílios) alinhadas na região central (Figura 16 B e D). Estas estruturas são particularmente visíveis na superfície da região cefálica, onde são mais numerosos e mais desenvolvidos nessa fase do desenvolvimento (A e C).

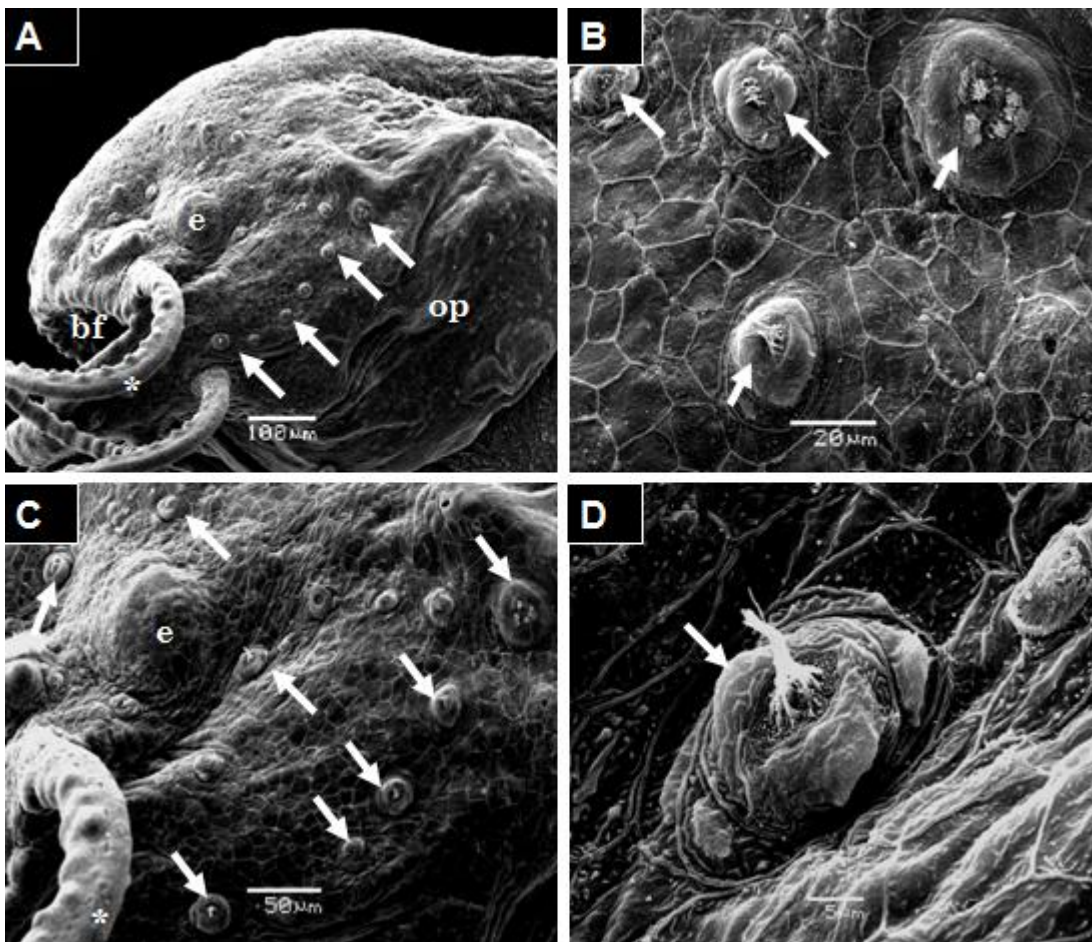


FIGURA 16. Microscopia eletrônica de varredura dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* do grupo controle (96 hpf) (A-D). (bf) cavidade bucofaringea (fenda oral), (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. Escala: A= 100 μm ; B= 20 μm ; C= 50 μm ; D= 5 μm .

As alterações morfológicas nos neuromastos foram observadas em indivíduos expostos aos diferentes tratamentos (Figuras 17-26). Foi observada uma redução no número de quinecílios (Figura 17B e C; Figura 18C; Figura 19C; Figura 20C; Figura 21C; Figura 22B-E; Figura 23B-D e F; Figura 24B-D, G e H; Figura 25B-F; Figura 26B-D), ausência de quinecílios (Figura 17B; Figura 18D; Figura 22D e E; Figura 23B), atrofia dos quinecílios (Figura 17E; Figura 18C; Figura 22C; Figura 23B-D; Figura 24D, G e H; Figura 25C-F; Figura 26B-D), ocorrência de agrupamentos de células formando estruturas esféricas nos neuromastos (Figura 22C; Figura 23D e G), redução no número de neuromastos visíveis na região cefálica e distribuição irregular dos mesmos. Além disso, foi verificado um epitélio desestruturado (Figura 18B; Figura 19D; Figura 20B e C; Figura 22D e E; Figura 23G; Figura 24G; Figura 26E) e pares de barbilhões malformados (Figura 18A; Figura 19A e B; Figura 20A; Figura 21A; Figura 22A; Figura 23E; Figura 24A e G).

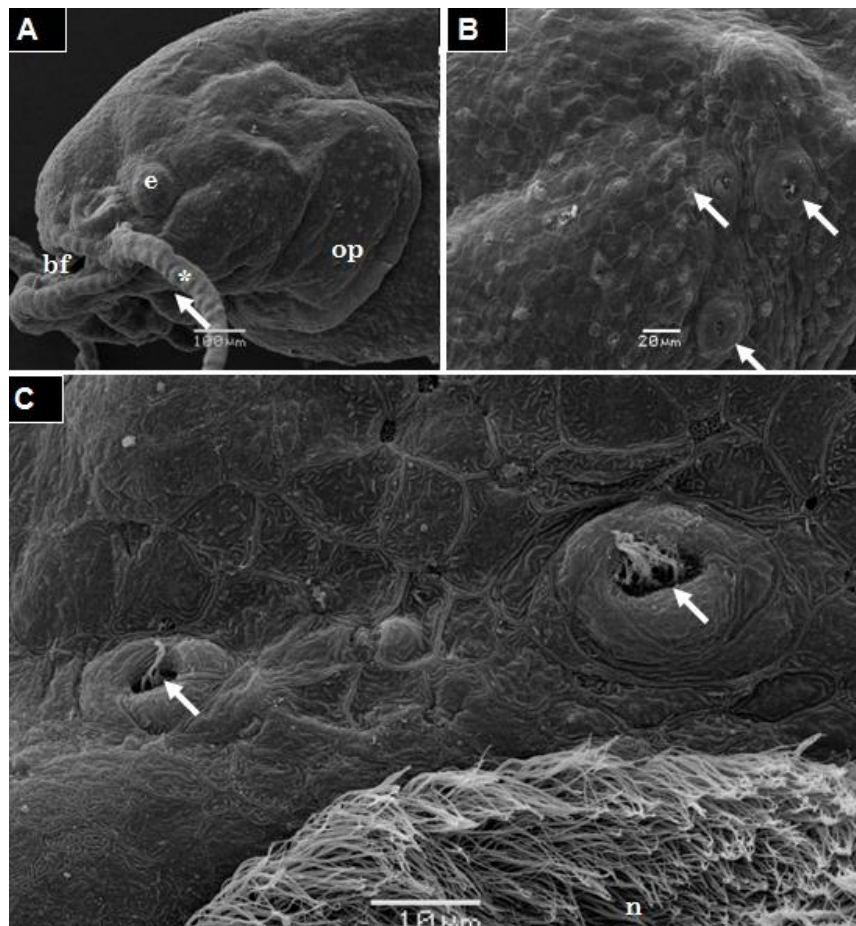


FIGURA 17. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Pb1 (96 hpf) (A-C). (bf) cavidade bucofaringea (fenda oral), (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, (n) narina, setas brancas: neuromastos. Escala: A= 100 μm; B= 20 μm; C= 10 μm.

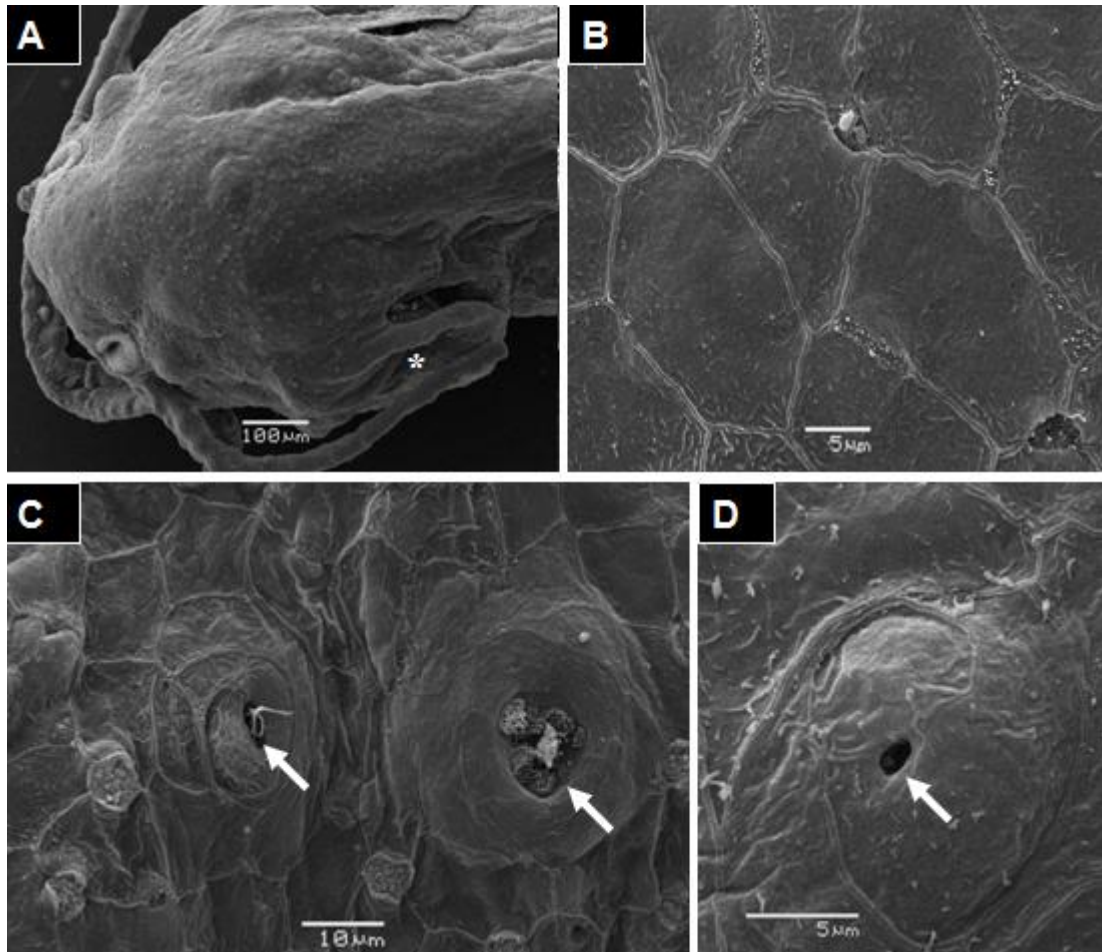


FIGURA 18. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Pb2 (96 hpf) (A-D). Superfície da região cefálica (B). (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. Escala: A= 100 μm; B= 5 μm; C= 10 μm; D= 5 μm.

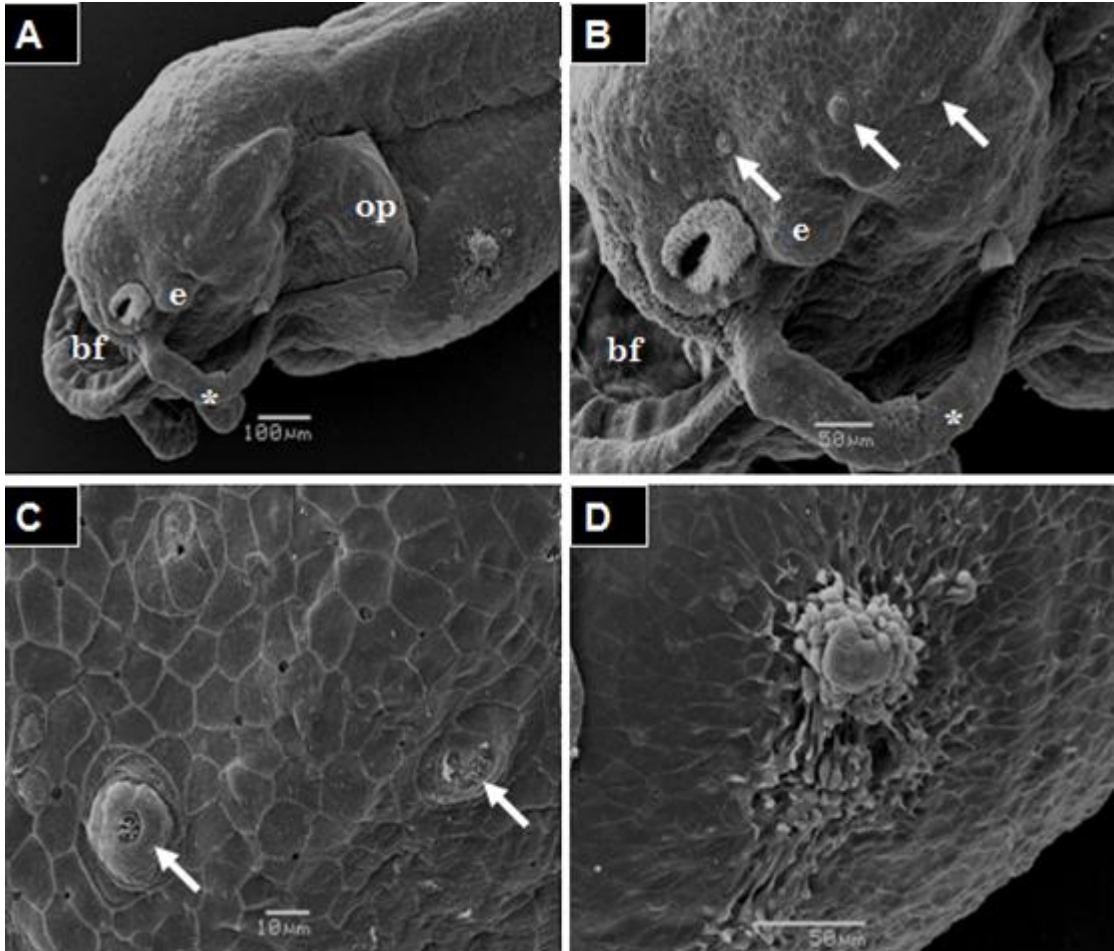


FIGURA 19. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Pb3 (96 hpf) (A-D). (bf) cavidade bucofaringea (fenda oral), (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. A figura D mostra uma lesão no epitélio. Escala: A= 100 μ m; B= 50 μ m; C= 10 μ m; D= 50 μ m.

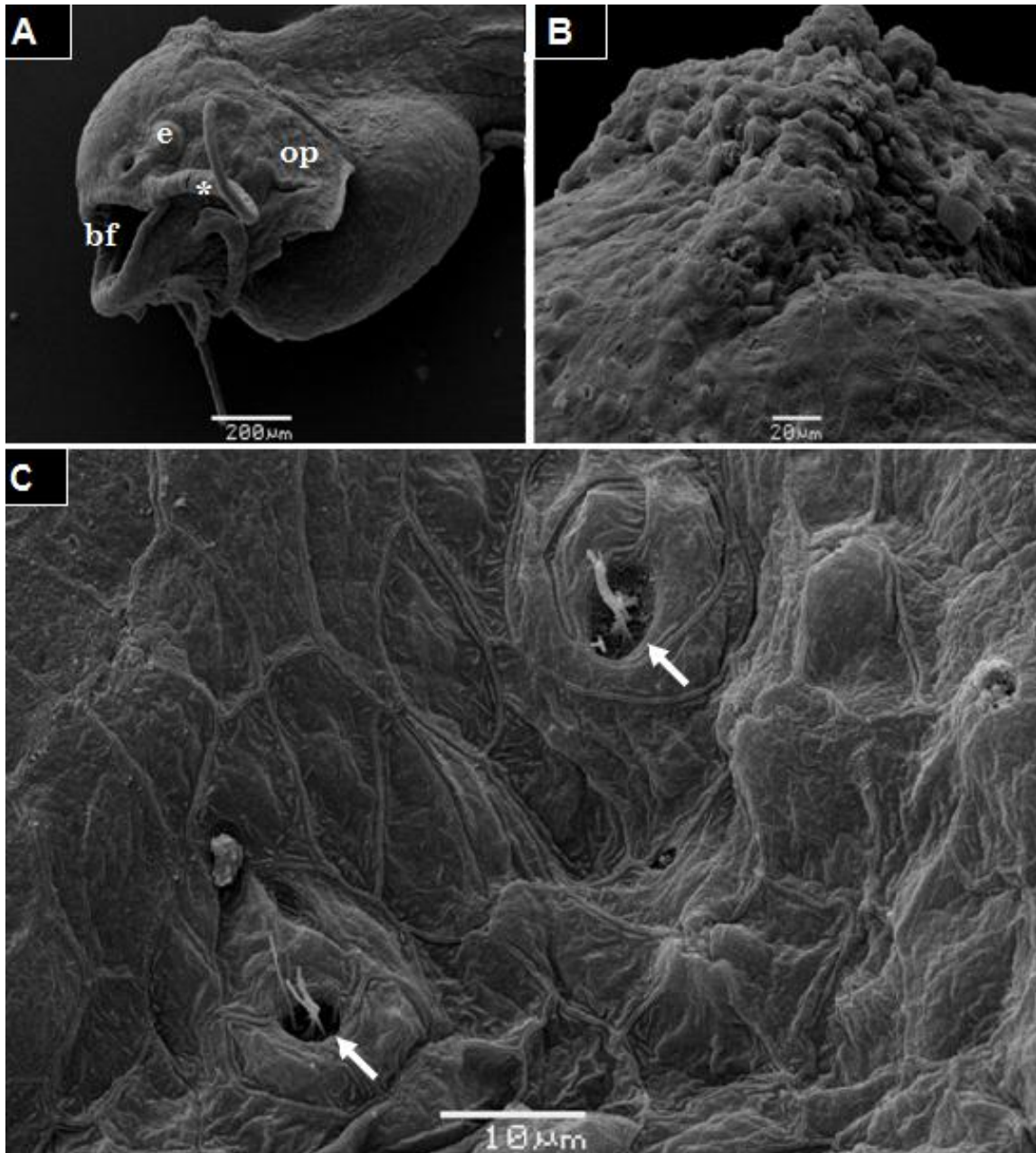


FIGURA 20. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Mn1 (96 hpf) (A-C). (bf) cavidade bucofaringea (fenda oral), (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. A figura B mostra uma proliferação de células na região dorsal da cabeça aumentada da figura A. Escala: A= 200 μm ; B= 20 μm ; C= 10 μm .

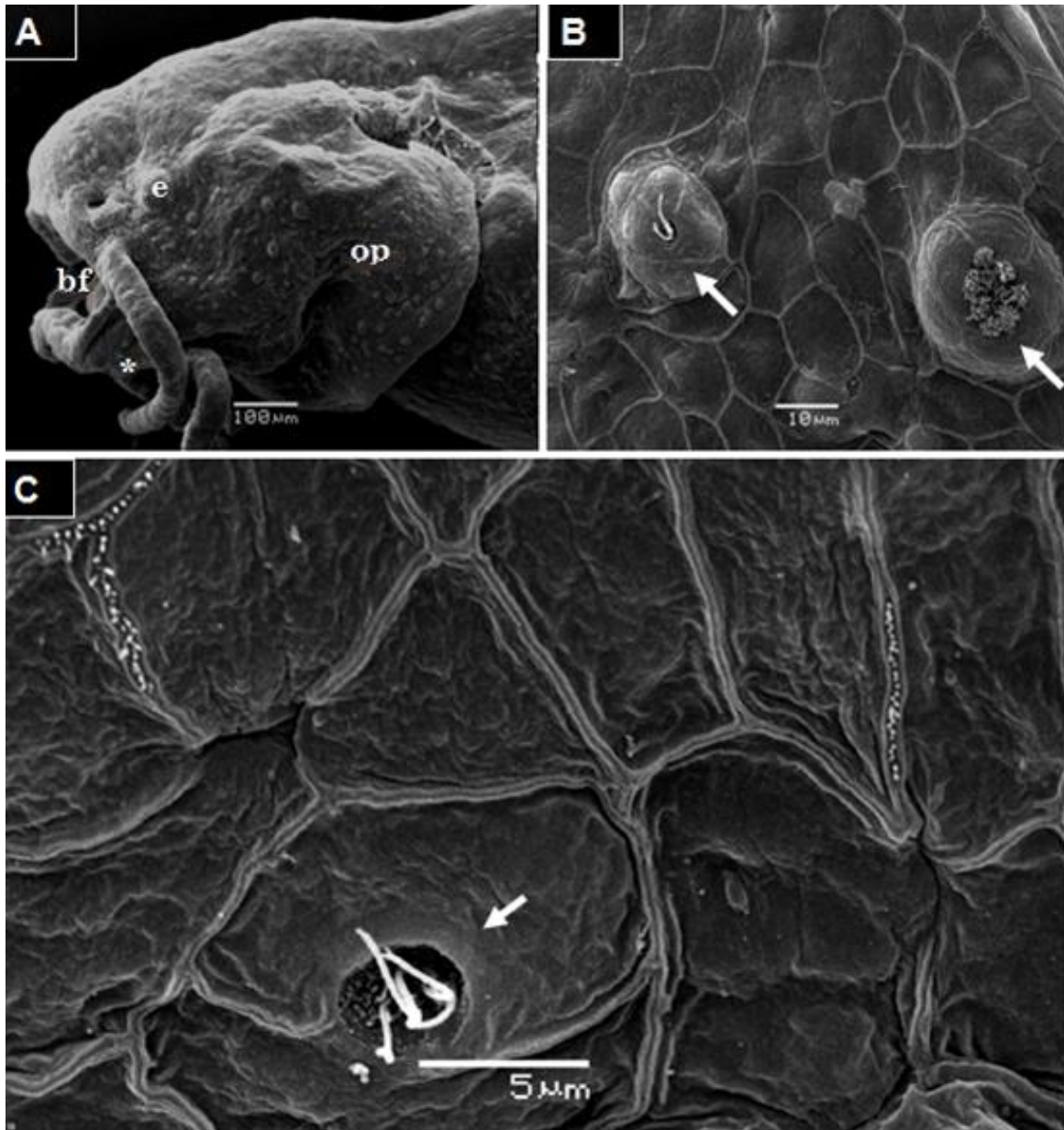


FIGURA 21. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Mn2 (96 hpf) (A-C). (bf) cavidade bucofaringea (fenda oral), (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. Escala: A= 100 µm; B= 10 µm; C= 5 µm.

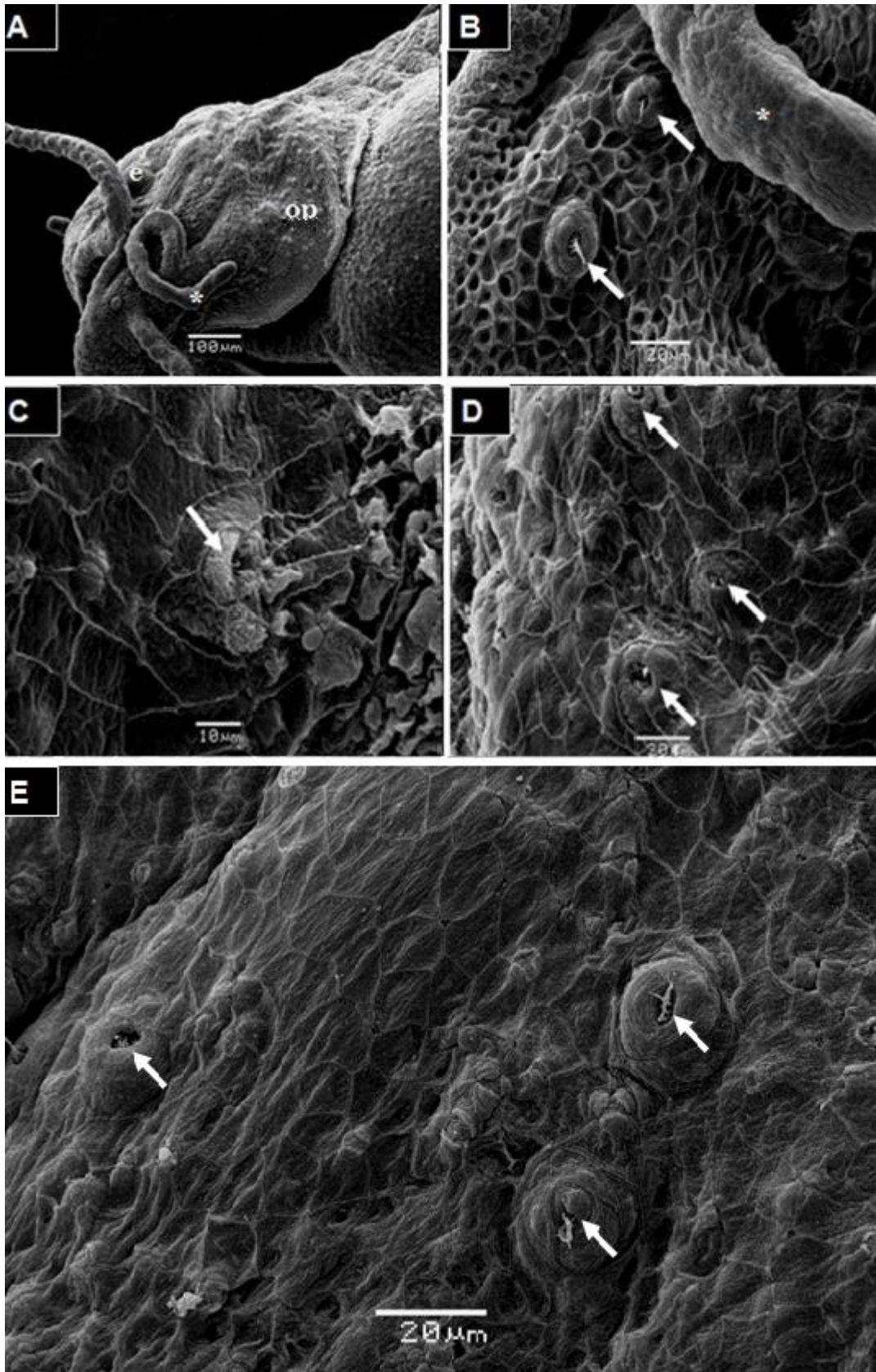


FIGURA 22. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Mn3 (96 hpf) (A-B), expostas ao Hg1 (C-D) e ao Hg2 (E). (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. Escala: A= 100 μ m; B= 20 μ m; C= 10 μ m; D= 20 μ m; E= 20 μ m.

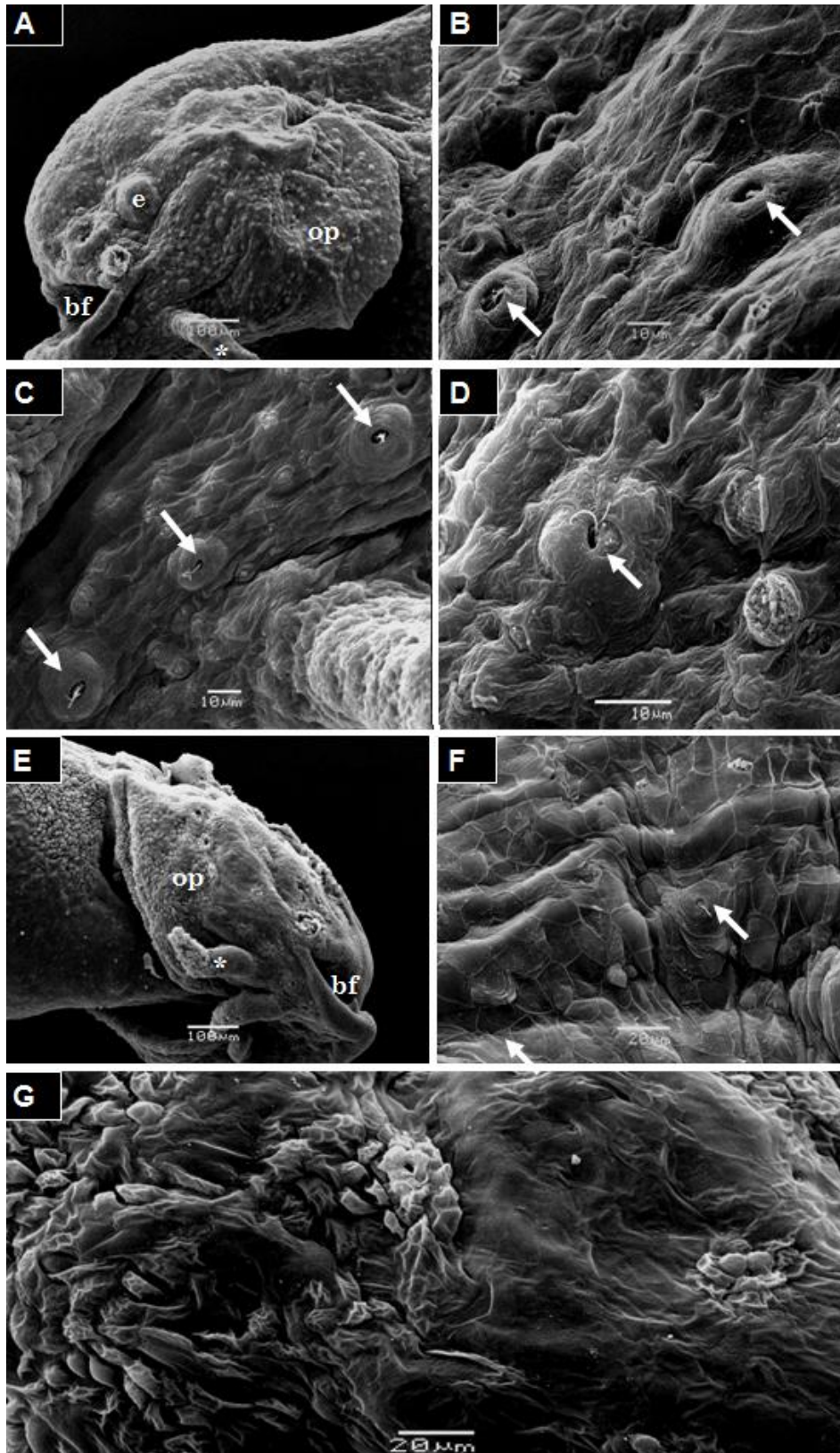


FIGURA 23. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Hg3 (A-D) e ao AgNP (E-G) (96 hpf). (bf) cavidade bucofaríngea (fenda oral), (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. Na figura G observe as áreas de hipertrofia celular da região cefálica. Escala: A= 100 μm; B= 10 μm; C= 10 μm; D= 10 μm; E= 100 μm ; F= 20 μm; G= 20 μm.

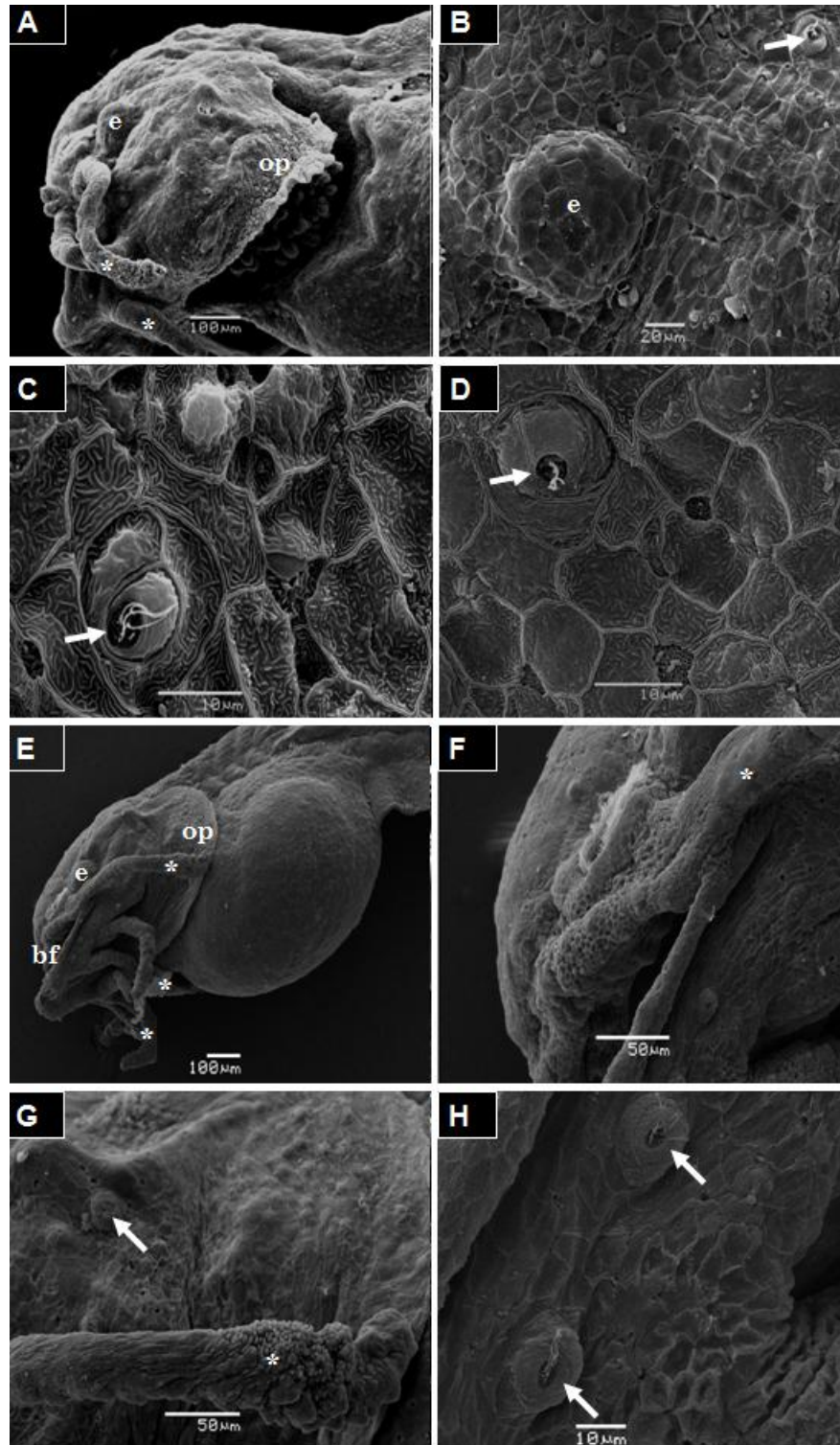


FIGURA 24. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Pb1+AgNP (A-D) e ao Mn1+AgNP (E-H) (96 hpf). (bf) cavidade bucofaríngea (fenda oral), (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. Escala: A= 100 μm ; B= 20 μm ; C= 10 μm ; D= 10 μm ; E= 100 μm ; F= 50 μm ; G= 50 μm ; H= 10 μm .

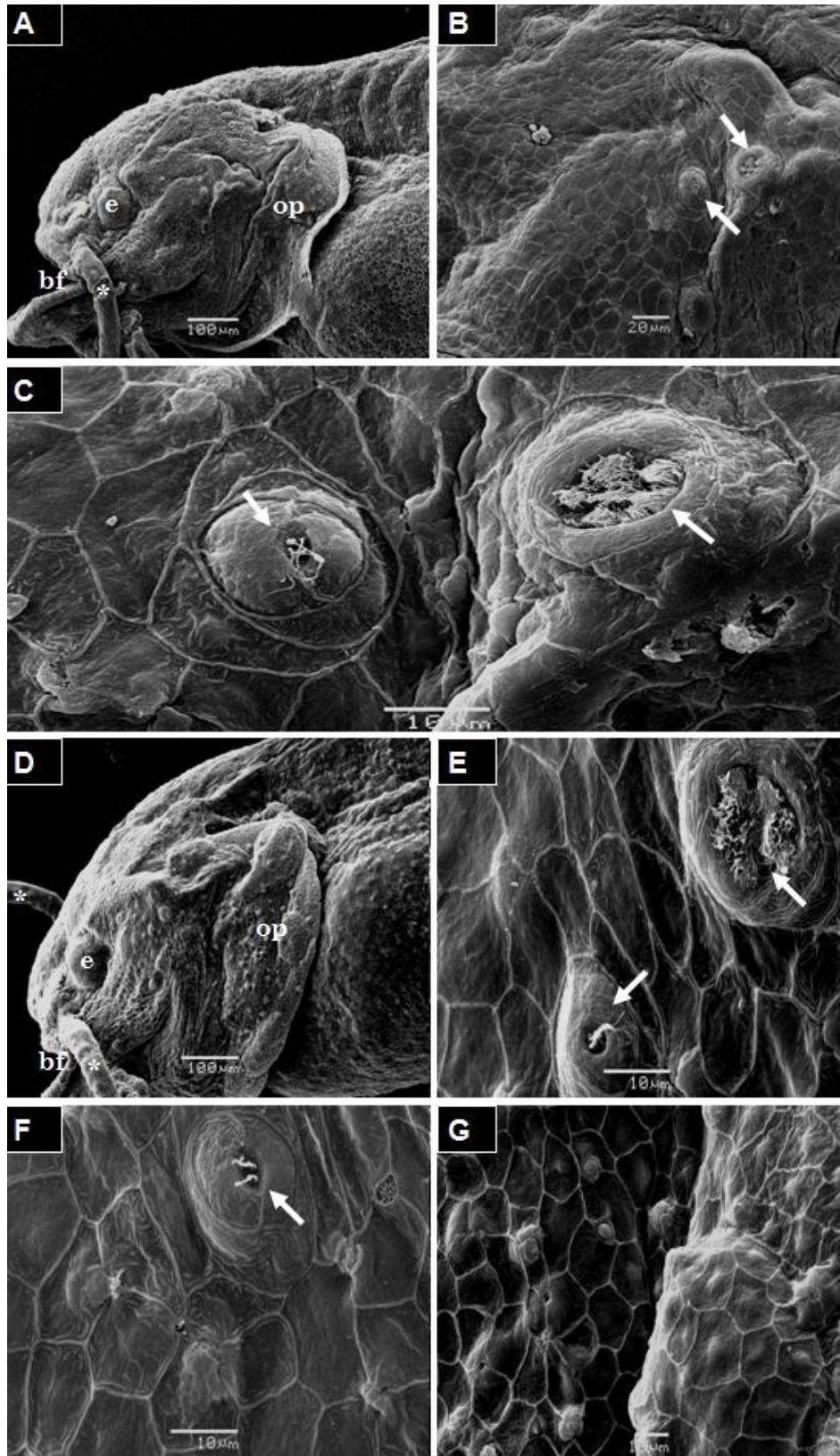


FIGURA 25. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas ao Hg1+ AgNP (A-C) e à mistura + AgNP (D-G) (96 hpf). (bf) cavidade bucofaringea (fenda oral), (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. Escala: A= 100 μ m; B= 20 μ m; C= 10 μ m; D= 100 μ m; E= 10 μ m; F= 10 μ m; G= 10 μ m.

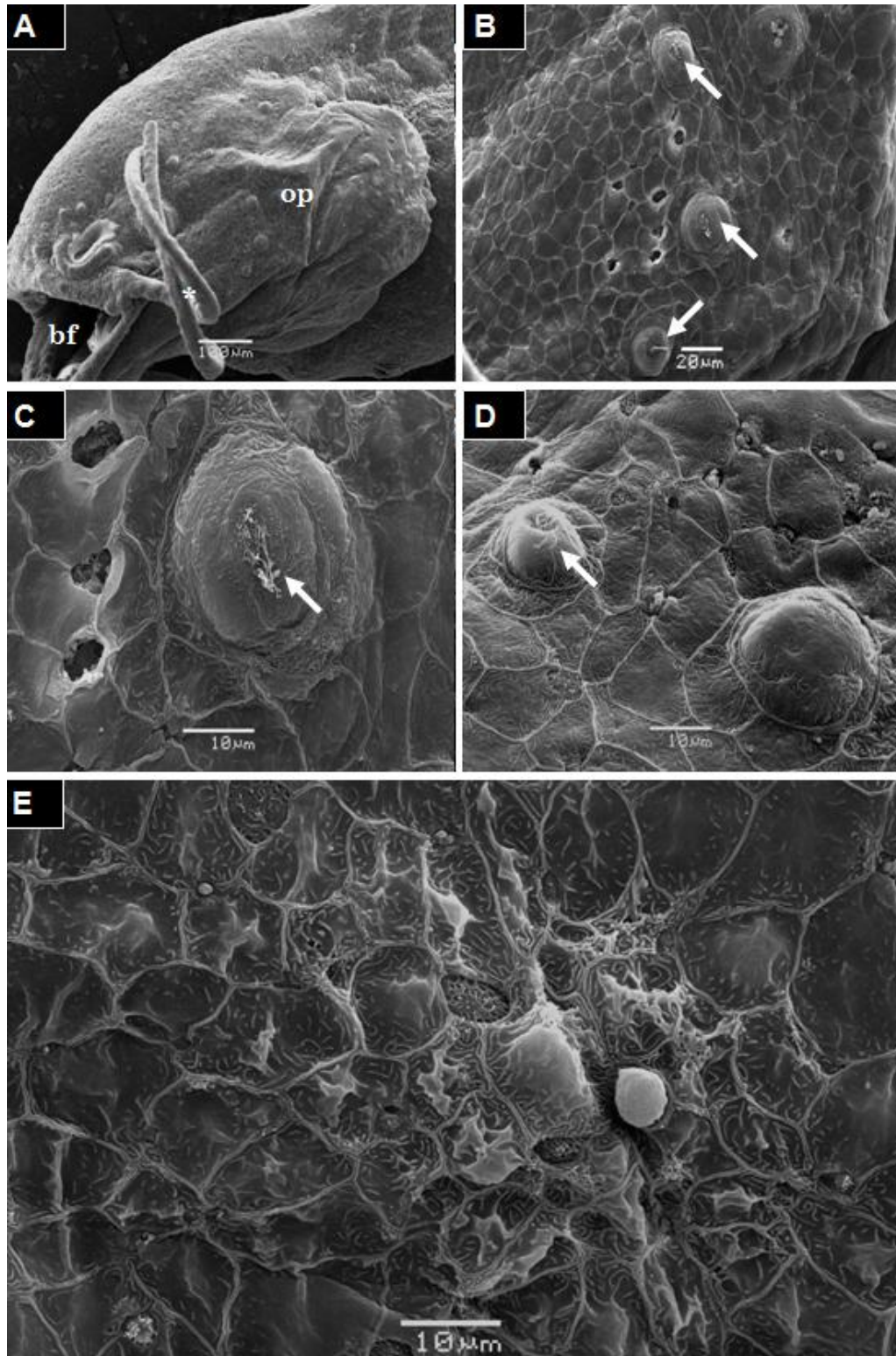


FIGURA 26. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas à mistura (A-D) (96 hpf). (bf) cavidade bucofaringea (fenda oral), (e) (olho), (op) (opérculo), (*) barbilhão, setas brancas: neuromastos. Na figura E observe a descamação epitelial evidente. Escala: A= 100 µm; B= 20 µm; C= 10 µm; D= 10 µm; E= 10 µm.

5. DISCUSSÃO

O período embrionário é uma fase essencial na criação de condições primárias de sobrevivência e é geralmente a fase mais sensível à toxicidade no ciclo de vida dos teleósteos. Algumas vantagens começam a emergir nessa fase dando suporte a esses procedimentos alternativos com fases iniciais de desenvolvimento: primeiro a disponibilidade de centenas ou milhares de ovos por fêmea na maioria das espécies, permite que os testes sejam executados a partir de grandes amostragens com total controle sobre as condições dos ovos. Segundo, devido ao pequeno tamanho dos embriões, estes podem ser facilmente adaptados em pequenas placas, o que permite um grande número de réplicas e terceiro, a transparência do córion. Todas essas vantagens foram fundamentais para o presente estudo, pois permitiu a comparação entre os efeitos causados por diferentes metais nas fases iniciais de desenvolvimento, com base nas estimativas de taxa de eclosão, taxa de mortalidade e as frequências de deformidades observadas nas larvas de *R. quelen*.

Neste estudo considerou-se que a exposição à prata foi na forma de agregados e não exatamente a nanopartículas de prata, como indicado nos estudos de caracterização das nanopartículas. Como o potencial zeta ficou em grande parte abaixo de -30, a repulsão entre as nanopartículas estaria diminuída e, sendo assim, a possibilidade de formar agregados é maior. Esta hipótese é confirmada pela medida no tamanho das nanopartículas que ficaram na sua totalidade acima de 100 nm, que por definição não poderiam ser consideradas nanopartículas (BEER *et al.*, 2011). Este é um aspecto importante, pois se acredita que a presença de nanopartículas no ambiente natural poderia ser dificultada pelas variáveis físico químicas encontradas nos ambientes aquáticos, e sendo assim, a avaliação no presente trabalho com os agregados torna-se mais realística.

Foram abordados quatro parâmetros metodológicos: (i) a taxa de eclosão dos organismos, (ii) a taxa de sobrevivência, (iii) a frequência de deformidades e (iv) alterações dos neuromastos. A eclosão pode ser considerada um ponto chave no ciclo de vida dos peixes. Com exceção das concentrações de chumbo, todas as outras utilizadas de manganês e mercúrio aceleraram significativamente o momento do processo da eclosão em relação ao grupo controle. Nestes casos, as maiores

taxas em 24 hpf foram observadas nos grupos tratados com as concentrações intermediárias de Mn e Hg (500 µg/L e 2 µg/L, respectivamente). Isto sugere que ambos os metais podem atravessar a membrana do ovo e afetar diretamente a eclosão de embriões de peixes e a qualidade das larvas. Nenhuma larva exposta aos agregados de prata à concentração de 0,03 µg/L eclodiu nas primeiras 24 hpf, mas, também, nenhuma larva do grupo controle, logo, esse dado não aponta para nenhum efeito tóxico das AgNPs.

Estudos com larvas de Zebrafish mostram que, em altas concentrações, a Ag^+ pode ter efeito no neurodesenvolvimento, crescimento, sobrevivência, além de inibir o comportamento natatório larval (POWERS *et al.*, 2010c). De forma semelhante, altas concentrações de AgNP podem diminuir a sobrevivência, aumentar a frequência de malformações nos embriões e atrasar a eclosão (ASHARANI *et al.*, 2008; BAR-ILAN *et al.*, 2009; GRIFFIT *et al.*, 2008). O processo de eclosão é uma combinação de fenômenos comportamentais e bioquímicos. Algumas enzimas são sintetizadas por uma glândula digestiva próxima ao córion. Tais enzimas são as Zn-metaloproteases nomeadas como *high choriolytic enzyme* (HCE) e *low choriolytic enzyme* (LCE) (De GASPAR *et al.*, 1999.). Após o ataque enzimático, os movimentos circulares do embrião ajudam no rompimento do córion, tornando-as pró-larvas livres (De GASPAR *et al.*, 1999; FRAYSSE *et al.*, 2006; JEZIERSKA *et al.*, 2009). Sendo os metais testados neste trabalho neurotóxicos, podem ter causado distúrbios no comportamento natatório da larva dentro do ovo, inibindo ou ativando funções enzimáticas essenciais para a homeostase metabólica (STOUTHART *et al.*, 1994), e até mesmo ocasionado a morte precoce do embrião.

Na mistura AgNP+Pb1, observa-se um aumento pouco significativo na taxa de eclosão das larvas em relação aos resultados das exposições individuais. Em contrapartida, foi registrado um decréscimo significativo nas taxas dos grupos expostos às misturas Mn1+AgNP e Hg1+AgNP em relação ao efeito isolado de cada metal. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que os agregados de prata interferem no tempo de eclosão quando adicionadas às menores concentrações de Pb, Mn ou Hg. A mistura destes três metais sem a adição dos agregados de prata também causou um efeito antagônico na taxa de eclosão das larvas em 24 hpf, isto é, apresentou uma redução no número de pro-larvas livres quando comparada com o efeito de cada composto individualmente. No entanto, quando analisamos a mistura destes metais com o acréscimo da AgNP constata-se

que mais de 90% dos embriões haviam eclodido ao final das 24 hpf. Neste caso, a presença da AgNP potencializou, ou foi por si responsável, o efeito da mistura ocasionando a maior quantidade de larvas eclodidas verificada no experimento.

A taxa de sobrevivência das larvas diminuiu em função do tempo de exposição dos contaminantes e da concentração. Nos grupos que ficaram expostos ao chumbo observou-se uma diminuição dependente do tempo. A maior taxa de mortalidade ocorreu na maior concentração (90 µg/L), atingindo cerca de 30% das larvas ao final das 96 hpf. O chumbo pode entrar nos organismos através do córion, da pele, brânquias e ser transportado via corrente sanguínea para outros tecidos (GOYER e CLARSKSOM, 2001; GWALTENEY-BRANT, 2002). Uma vez absorvido, este metal possui uma lista razoável de tecidos alvos, dentre os quais se destacam o fígado, os rins, sistema imunitário e sistema nervoso central (GOYER, 1993). De acordo com Victory *et al.* (1984), a absorção pelas células não se deve a nenhum carreador específico, mas pela atividade endocítica. Além disso, pequenas quantidades também podem ser co-transportadas com ânions orgânicos de baixo peso molecular (VANDER e JOHNSON, 1981). A queda na taxa de sobrevivência das larvas pode ser associada aos mecanismos de toxicidade do Pb. Tais mecanismos podem estar relacionados com a indução de danos oxidativos em diferentes células (ARIZA *et al.*, 1998) e de aberrações cromossômicas nos animais expostos (SILBERGERD, 2003; CESTARI *et al.*, 2004).

O chumbo também possui a capacidade de mimetizar o cálcio, levando a um desequilíbrio nos processos mediados por este íon. Neste contexto, Stouthart *et al.* (1994) observaram que, dependendo da concentração e de fenômenos físico-químicos da água, o Pb pode atravessar o córion de ovos de carpas (*Cyprinus carpio*) e possivelmente alterar características da permeabilidade seletiva, ocasionando distúrbios na capacidade de troca iônica entre o fluido perivitelínico e o ambiente aquoso. Em geral, alterações no córion são os principais efeitos adversos verificados durante o desenvolvimento embrionário. No presente trabalho as maiores taxas de mortalidade observadas nos grupos expostos aos tratamentos de Pb ocorreram a partir das 72 hpf.

De forma semelhante ao chumbo, a partir das 72 hpf foram observadas quedas abruptas nas taxas de sobrevivência das larvas que haviam sido expostas ao Mn e ao Hg. Os efeitos deletérios do mercúrio em embriões e larvas de peixes incluem a ruptura da membrana do saco vitelínico, malformações larvais e

embrionárias, inibição de atividades enzimáticas, anomalias cromossômicas e outros problemas genéticos (DAVE e XIU, 1991; HUANG *et al.*, 2010a, b; LATIF *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2001). Evidências têm demonstrado que um dos mecanismos de toxicidade do Hg também está relacionado com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a perturbação dos sistemas de defesa antioxidante (LAROSE *et al.*, 2008). Segundo estes autores, ROS podem reagir com diversas macromoléculas biológicas suscetíveis, e conseqüentemente resultar em peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos no DNA.

O impacto do Hg em fases iniciais de desenvolvimento do peixe dourado (*Carassius auratus*) foi recentemente descrito por Kong e colaboradores (2012). De acordo com estes autores, na concentração de 1 µg/L a atividade da enzima catalase foi reduzida em 72, 96 e 120 horas, enquanto que um declínio significativo foi observado na concentração de 2 µg/L após 96 horas. Além disso, outros parâmetros bioquímicos analisados como o aumento das atividades de fosfatases e de lisozimas revelam a habilidade do embrião em produzir mais enzimas na tentativa de atenuar os danos causados pelo Hg.

Dentre os metais estudados, a maior taxa de mortalidade foi observada no grupo exposto à maior concentração de manganês. Assim como o Pb e o Hg, estudos recentes sugerem que a toxicidade deste elemento traço esteja associada com a geração de ROS (ASCHNER *et al.*, 2007), com doenças neurogenéticas através da formação de radicais livres (CHEN *et al.*, 2006) e com a inativação de enzimas antioxidantes. Patridge e Lymbery (2009) constataram que em indivíduos juvenis da espécie *Argurosomus japonicus* o Mn acumulou-se nas brânquias, fígado e músculos onde causou alterações no metabolismo de carboidratos e na dinâmica dos íons encontrados no plasma sanguíneo como sódio, potássio e cloro. Um dos mecanismos propostos para a indução da neurotoxicidade seria através de uma cascata de danos oxidativos (ASCHNER, 1997).

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a exposição ao MnCl₂ produz um aumento dose dependente de ROS em diferentes regiões do cérebro (SOLIMAN *et al.*, 1995). De acordo com Gunter *et al.* (2006), os astrócitos são os alvos primários do Mn e as principais células que acumulam este metal no sistema nervoso central. Devido ao fato dessa célula auxiliar em diversas funções essenciais para a atividade normal dos neurônios e prover proteção contra o estresse oxidativo (WATTS *et al.*, 2005), alguns estudos sugerem que os efeitos do Mn nos astrócitos sejam

responsáveis pela toxicidade neuronal (LIU *et al.*, 2006). Além disso, estudos demonstraram que o Mn é capaz de induzir morte celular por apoptose em astrócitos de ratos (KOTLER *et al.*, 2005; YIN *et al.*, 2008), possivelmente relacionado com estresse oxidativo e disfunção mitocondrial.

A taxa de sobrevivência das larvas expostas aos agregados de prata também diminuiu como uma função do tempo principalmente a partir das 72 hpf. As AgNPs e os íons de Ag^+ podem induzir espécies reativas de oxigênio (FOLDBJERG *et al.*, 2011), morte celular por apoptose e necrose (BEER *et al.*, 2011). Além disso, de acordo com Wang *et al.* (2010), os efeitos da bioacumulação de AgNP na sobrevivência de zebrafish estão relacionadas com a perda da integridade da membrana celular.

Em relação ao efeito isolado da menor concentração de Pb, a exposição à mistura de Pb1+AgNP resultou em um efeito sinérgico sobre a taxa de sobrevivência das larvas, atingindo o maior percentual de mortalidade em 96 hpf. Em contrapartida, não houve variações significativas nas taxas de sobrevivência das misturas Mn1+AgNP e Hg1+AgNP quando comparadas com as exposições a cada composto individualmente. Diferente de todos os outros tratamentos, a taxa de sobrevivência do grupo exposto à mistura das menores concentrações dos três metais sofreu um decréscimo abrupto já a partir das 48 hpf. Esta soma da exposição aos metais resultou em sinergismo em relação às toxicidades individuais do Pb, Mn e Hg. A adição dos agregados de prata na mistura também resultou em uma queda na taxa de sobrevivência das larvas ao longo do tempo, porém, a maior redução na taxa foi observada a partir de 72 hpf. Apesar disso, ambas as misturas obtiveram resultados semelhantes no final do experimento.

As frequências de anormalidades detectadas nas larvas não expostas a contaminantes, isto é, o grupo controle utilizado durante o experimento foram baixas. As condições apropriadas de temperatura, água, intensidade da luz e genitores saudáveis são fundamentais para baixa taxa de mortalidade dos embriões e para baixa heterogeneidade morfológica das larvas. Na espécie em estudo, as frequências de deformidades foram significativas a partir de 48 hpf. As deformidades observadas nas larvas expostas ao chumbo não correspondeu a uma concentração dependência. As maiores frequências de deformidades na área cefálica, lordose, atrofia corporal e edema cardíaco ocorreram nas larvas expostas à concentração intermediária (30 $\mu\text{g/L}$). Apesar da lordose ter sido a deformidade mais

representativa deste grupo, atingindo cerca de 24% das larvas, somente 1% apresentou cifose na maior concentração.

As larvas expostas às três concentrações de Mn adquiriram deformidades espinhais (lordose, cifose e outras torções), na região cefálica e atrofia corporal, independente da concentração administrada. Assim como o grupo controle, nenhuma larva exposta ao manganês apresentou edema cardíaco nas 48 e 96 hpf, sugerindo que esta deformidade não seja uma resposta à ação deste metal. Contudo, o encurtamento corporal apenas ocorreu de forma significativa nas larvas expostas à concentração intermediária de Mn (500 µg/L), estando ausente nos demais tratamentos. De acordo com Rouleau *et al.* (1995), cérebro, músculos e as nadadeiras são receptores deste metal e podem ter suas estruturas e funções alteradas. Mais estudos serão necessários para investigar se deformidades como o encurtamento corporal teria origem nos precursores das células ósseas, na musculatura ou no próprio sistema nervoso, causando contrações musculares inadequadas.

O mercúrio causou, na menor concentração, as maiores frequências de lordose e atrofia corporal deste estudo, atingindo em média 40 e 70% das larvas respectivamente, ou seja, inversamente proporcional à concentração do metal. Também foi constatado que na maior concentração de Hg ocorreram as maiores frequências de alterações encontradas na região cefálica e nas nadadeiras, indicando uma forte relação entre o Hg e estas deformidades.

O grupo exposto aos agregados de prata desenvolveu todas as deformidades observadas neste estudo com exceção do corpo atrofiado, sendo que as mais comuns foram as lordoses e as cefálicas, o que reforça a hipótese de perturbação neurotóxica e comportamental relacionada com a exposição à AgNP (POWERS *et al.*, 2011). Estudos recentes demonstraram que nanopartículas de metais resultam em efeitos adversos em indivíduos adultos e em desenvolvimento de zebrafish, reflexo, em parte, pela toxicidade do próprio metal (GRIFFIT *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2008). De acordo com Powers e colaboradores (2010a), as AgNPs interferem na replicação e diferenciação das células neurais, o que comprometeria o desenvolvimento e a sobrevivência dos indivíduos da espécie.

Na mistura do Pb1 com os agregados de prata (Pb1+AgNP) houve ocorrências de alterações na região cefálica, edema cardíaco e cifose, sendo estas deformidades ausentes nas larvas expostas somente ao Pb1. Em contrapartida,

nenhuma larva exposta à mistura obteve lordose e atrofia corporal, malformações que estavam presentes no tratamento Pb1. A soma Mn1+AgNP também resultou no aumento da frequência de deformidades na área cefálica, cerca de 10% a mais. Estudos mostram que o cérebro é um alvo específico da Ag⁺ (BONDY e CAMPBELL, 2005) e, segundo Rungby *et al* (1987), este metal é capaz de alterar a neuroanatomia de roedores em desenvolvimento. Além disso, sabe-se que as AgNPs podem causar morte celular por apoptose na região cefálica e alterar a expressão de genes (ASHARANI *et al.*, 2008; YEO e YOON, 2009). Já os indivíduos expostos à mistura Hg1+AgNP tiveram uma redução significativa de lordose e atrofia corporal quando comparados com o efeito individual do Hg. Além disso, as frequências das deformidades cefálicas de ambos os tratamentos foram iguais, atingindo a média de apenas 2,75% das larvas. É interessante citar que, 1,23% das larvas expostas ao Hg1+AgNP apresentaram encurtamento corporal, característica ausente em Hg1.

Nenhuma larva exposta à mistura das menores concentrações dos metais em estudo apresentou deformidades na região cefálica, enquanto que a adição dos agregados de prata a esta mistura intensificou para 14% a quantidade de larvas com essas alterações. Este dado reforça ainda mais o papel tóxico dos agregados de Ag⁺ nos primeiros estádios de desenvolvimento, corroborando o potencial efeito no neurodesenvolvimento da espécie.

Apesar de não haver uma relação evidente de dose dependência, as deformidades adquiridas durante o desenvolvimento embrionário variaram em função do tempo. A atrofia corporal, edema cardíaco, encurtamento corporal, danos estruturais nas nadadeiras e no saco vitelínico não foram constatadas em nenhuma larva viva ao final das 96 hpf. A ausência de certas deformidades, como as cefálicas e o edema cardíaco, nas larvas sobreviventes indica que são alterações severas a ponto de serem letais aos indivíduos até o final do experimento, uma vez que não foram identificadas nos indivíduos sobreviventes. Além disso, a associação de várias deformidades em uma única larva também foi um fator relevante para a sobrevivência dos indivíduos utilizados neste estudo. Outro aspecto que surgiu foi o efeito de cada tratamento, com exceção do controle, sobre o desenvolvimento dos barbilhões nas larvas de jundiá. Os resultados mostraram que o sistema sensorial nas fases iniciais de peixes é um alvo em potencial nas concentrações testadas de Pb, Mn, Hg, agregados de pratas, isolados ou em misturas.

As deformidades encontradas nos primeiros dias pós-eclosão de *R. quelen*, a partir dos metais isolados ou das misturas, podem acarretar em consequências imprevisíveis para a sobrevivência do organismo nos ambientes naturais. Neste período, a alimentação é endógena, sendo obtida do vitelo. Quando esta reserva endógena se esgota, a alimentação deve ser obtida de uma fonte exógena para satisfazer demandas crescentes de energia. Desta forma, a larva requer estruturas da área cefálica como mandíbulas formadas, olhos pigmentados e sistema sensorial organizado (NAKATANI *et al.*, 2001) para que os alimentos sejam selecionados, capturados, digeridos e absorvidos. A quimiorrecepção e a mecanorrecepção tem um papel fundamental na adaptação das larvas a águas abertas após a eclosão, e participa na detecção de estímulos químicos e mecânicos, identificando a aproximação das partículas móveis ao seu redor. Isto é fundamental para as larvas recém-eclodidas, as quais ainda não têm desenvolvido a visão completa, ou para aquelas que se desenvolvem em ambientes com pouca luminosidade, como os bagres (LIEM *et al.*, 2001). As alterações encontradas nos neuromastos e nos barbilhões das larvas de *R. quelen*, podem afetar a locomoção na coluna d'água, funções gustativas e a detecção de presas e predadores, uma vez que a espécie apresenta hábito forrageiro e baixa acuidade visual. Os possíveis efeitos associados às lesões encontradas nestas estruturas sensoriais podem representar consequências negativas para o comportamento e conseqüentemente para a manutenção da população de teleósteos.

Deformidades nas nadadeiras e na coluna vertebral, estruturas fundamentais para o equilíbrio corporal e o direcionamento na coluna d'água, podem comprometer a habilidade de fuga e a capacidade natatória que acontece nos estádios iniciais de desenvolvimento (PINDER e GOZLAN, 2004). As frequências das torções espinhais, incluindo lordose e cifose, aumentaram em todos os grupos experimentais ao longo das 96 hpf variando no grau de severidade e na associação com outras deformidades. No ambiente natural, estes fatores poderiam prejudicar as larvas através da perda da autonomia de movimentação, alimentação e percepção do meio, aumentando ainda mais a suscetibilidade à predação.

A partir disso, sugere-se que novos estudos sejam realizados para que possam elucidar os efeitos dos processos de contaminação dos corpos hídricos sobre as comunidades aquáticas e especialmente proporcionar maiores conhecimentos sobre os mecanismos que governam os efeitos dos metais pesados

e suas misturas sobre as fases iniciais. Conseqüentemente os resultados de novas pesquisas poderão subsidiar futuramente as instituições de fiscalização quanto aos níveis de contaminação toleráveis e suas conseqüências aos ambientes naturais. A avaliação do impacto sobre os primeiros estádios de desenvolvimento em peixes pode de forma preditiva ter um significado muito promissor, visto que a condição de sucesso da população está vinculada ao sucesso também nos estádios iniciais do ciclo de vida daquela espécie.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho adotou uma metodologia que pode contribuir para a preservação e auxiliar o manejo de espécies nativas em ambientes potencialmente impactados. A partir do desenho experimental proposto foi possível avaliar sob condições realísticas a exposição aos metais elencados e as respectivas misturas, fornecendo dados inéditos sobre os seus efeitos no processo de eclosão, na ocorrência de deformidades e conseqüentemente na sobrevivência em embriões e larvas de *R. quelen*:

- Com exceção do Pb1 (10 µg/L) e AgNP (0,03 mg/L), os demais tratamentos anteciparam a eclosão em 24 hpf à temperatura de 24°C. Por algum motivo não investigado, as exposições às concentrações intermediárias dos metais (Pb2: 30 µg/L, Mn2: 500 µg/L e Hg2: 2 µg/L) resultaram as maiores taxas de eclosão neste período. Além disso, os agregados de prata interferiram na variação da taxa de eclosão das larvas quando misturados com os metais (Pb1+AgNP, Mn1+AgNP, Hg1+AgNP e Mistura+AgNP).
- As taxas de sobrevivência das larvas diminuíram em função do tempo, principalmente a partir de 72 hpf. Em 96 hpf as taxas de sobrevivência foram inversamente proporcionais à concentração de Pb, Mn e Hg. A mistura Pb1+AgNP foi mais tóxica para as larvas do que as exposições isoladas de Pb1 e AgNP.
- As freqüências das deformidades observadas durante desenvolvimento embrionário variaram em função do composto e do tempo de exposição. As malformações axiais (lordose, torções e cifose) foram as mais freqüentes em 96 hpf e, dentre essas deformidades, a cifose foi a de maior ocorrência.
- A toxicidade dos agregados de prata pode estar fortemente associada com as deformidades cefálicas.
- As diferentes concentrações de Pb, Mn, Hg e AgNP e as misturas tiveram efeitos sobre o desenvolvimento de estruturas sensoriais tais como os barbilhões e os neuromastos. Estes, que são formados por

neurônios, indicam o potencial neurotóxico desses compostos em estádios iniciais de desenvolvimento.

- As concentrações apresentadas pelo CONAMA como limites máximos permissíveis causaram efeitos adversos sobre os parâmetros analisados em larvas de *R. quelen*. Os dados deste trabalho poderão ser utilizados em modelagem ecológica e favorecer medidas de conservação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELHA, M. C. F., AGOSTINHO, A. A. GOULART, E. Plasticidade trófica em peixes de água doce. **Acta Scientiarum**. v. 23, n. 2, p. 425-434, 2001.

ADAM, C., GARNIER-LAPLACE, J., BAUDIN, J. P. Uptake from water, release and tissue distribution of 54 Mn in the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). **Environ. Pollut.** v.97, p. 29–38, 1997.

AHAMED, M., ALSALHI, M.S., SIDDIQUI, M.K.J. Silver nanoparticle applications and human health. **Clin. Chim. Acta**. v. 411, p. 1841–1848, 2010.

ALADOS, C.N.L., WEBER, D.N. Lead effects on the predictability of reproductive behavior in fathead minnows (*Pimephales promelas*): a mathematical model. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 18, p. 2392–2399, 1999.

AMUNDSEN, P., STALOVICK, F. J., LUKIN, A. A., KASHULIN, N. A., POPOVA, O. A., RESHETNIKOV, Y. S. Heavy metal contamination in freshwater fish from the border region between Norway and Russia. **Sci. Total Environ.** v. 201, p. 211-224, 1997.

ARABI, M. Analyses of impact of metal ion contamination on carp (*Cyprinus carpio*) gill cell suspension. **Biol. Tra. Elem. Res.** v. 100, p. 229–245, 2004.

ARIZA, M., BIJUR, G. N., WILLIAMS, M. V. Lead and mercury mutagenesis: role of H₂O₂, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 31, p. 352 – 361, 1998.

ARORA, S., JAIN, J., RAJWADE, J.M., AND PAKNIKAR, K. M. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. **Toxicol. Lett.** v. 179, p. 93–100, 2008.

ASHARANI, P., WU, Y., GONG, Z., VALIYAVEETTIL, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnol.** v. 19, p. 255102–10, 2008.

ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity and oxidative damage. In: Connor, J. R. **Metal and oxidative Damage: neurological disorder**. New York: Plenum Press, 1997. p. 77 – 93.

ASCHNER, M., GUILARTE, T. R., SCHNEIDER, J. S., ZHENG, W. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 221, p. 131–147, 2007.

BALDISSEROTTO, B. & RADÜNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004. p. 67-72.

BARCELLOS, L. J. G., WASSERMANN, G. F., SCOTT, A. P., WOEHL, V. M., QUEVEDO, R. M., ITTZÉS, I., KRIEGER, M. H. & LULHIER, F. Steroid profiles in cultures female jundiá the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces

Teleostei), during the first reproductive cycle. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 121, p. 325-332, 2001b.

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

BAR-ILAN, O., ALBRECHT, R. M, FAKO, V. E, FURGESON, D. Y. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. **Small**, v. 5, p. 1897-920, 2009.

BEER, C., FOLDBJERG, R., HAYASHI, Y., SUTHERLAND, D. S., AUTRUP, H. Toxicity of silver nanoparticles - Nanoparticle or silver ion? **Toxicol. Lett.**, v. 208, n.3, p.286 - 292, 2012.

BENN, T. M., WESTERHOFF, P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. **Environ. Sci. Technol.** v. 42, p. 4133–4139, 2008.

BOCKMANN, F. A., GUAZZELLI, G. M. Heptapteridae. In.: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O., FERRARIS, JR. C. J. (Orgs.) **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUC RS, 2003. p. 406-431

BOMBARDELLI R. A., MÖRSCHBÄCHER, E. F., CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A., SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.4, p.1251-1257, 2006a.

BONDY, S. C, CAMPBELL, A. Developmental neurotoxicology. **J. Neurosci. Res.** v. 81, p. 605–12, 2005.

BROOKS, S. et al. Egg quality in fish: what makes a good egg? **Rev. Fish Biol. Fish.** London, v. 7, p. 387-416, 1997.

BUCKUP PA, MENEZES NA, GHAZZI MS. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.

CARNEIRO, P. C. F., MIKOS, J. D. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. **Acta Scientiarum, Animal Sci.** v.30, n.3, p. 345-350, 2008.

CHEN, M. T., CHENG, G. W., LIN, C. C., CHEN, B. H., HUANG, Y. L. Effects of acute manganese chloride exposure on lipid peroxidation and alteration of trace metals in rat brain. **Biol. Trace Elem. Res.** v. 110, p. 163–177, 2006.

CHEN, J., CHEN, Y., LIU, W., BAI, C., LIU, X., LIU, K., LI, R., ZHU, J-H., HUANG, C. Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 34, p. 581 – 586, 2012.

CHORUS, I. **Literaturrecherche und Auswertung zur Notwendigkeit chronischer Tests-insbesondere des Reproduktions tests—am Fisch für die Stufe II nach dem Chemikaliengesetz.** Berlin: Umweltbundesamt(UBA), 1987. I, 4, 316.

COOMBS, S., BRAUN, S. B., DONOVAN, B. The orienting response of Lake Michigan mottled sculpin is mediated by canal neuromasts. **J. Exp. Biol.** v. 204: p. 337-348, 2001.

CORNELIS, R., NORDBERG, M. General Chemistry, sampling, Analytical Methods, and Speciation. In: **HANDBOOK of toxicology metals.** New York: Elsevier, 2007. p.11-38.

COSSARINI-DUNIER, M., DEMAEL, A., LEPOT, D., GUERIN, V. Effect of manganese ions on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) against *Yersinia ruckeri*. **Dev. Comp. Immunol.** v. 12, p. 573–579, 1988.

DALLINGER, R., PROSI, F., SENGER, H., BACK, H. Contaminated food and uptake of heavy metals by fish (a review and proposal for further research). **Oecol.** (Berlin). v. 73, p. 91-98, 1987.

DAVE, G., R. XIU. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Arch. Environ. Contain. Toxicol.** v. 21, p. 126-134, 1991.

De GASPAR, I., BLANQUEZ, M. J., FRAILE, B., PANIAGUA, R., ARENAS, M. I. The hatching gland cells of trout embryos: characterization of N- and O-linked oligosaccharides. **J. Anat.** v. 194, p. 109–118, 1999.

DITTMAN, E., BUCHWALTER, D. Manganese bioconcentration in aquatic insects: Mn oxide coatings, molting loss, and Mn (II) thiol scavenging. **Environ. Sci. Technol.** v. 44, p. 9182–9188, 2010.

EMBRY, M. R *et al.* The fish embryo toxicity test as na animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquat. Toxicol.** v. 97, p. 79 – 87, 2010.

FATMA - FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE. **Relevância dos parâmetros de qualidade de água aplicados a águas correntes.** Parte I: características gerais, nutrientes, elementos traço e substâncias nocivas e inorgânicas, características biológicas. Florianópolis: Fundação de Meio Ambiente de Santa Catarina, 1999.

FISH, J.T. Groundwater water treatment for iron and manganese reduction and fish rearing studies applied to the design of the Ruth Burnett Sport Fish Hatchery, Fairbanks, Alaska. **Aqua. Eng.** v. 41, p. 97–108, 2009.

FOLDBJERG, R., DANG, D. A., AUTRUP, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Arch. Toxicol.** v. 85, p. 743–750, 2011.

FRACALOSSO, D. M., MEYER, G., SANTA MARIA, F. M., WEINGARTNER, M., ZANIBONI FILHO, E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal. Sci.** v.26, n.3, p. 345-352, 2004.

FRAYSSE, B., MONS, R., GARRIC, J. Development of a zebrafish 4-day embryonal bioassay to assess toxicity of chemicals. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 63, p. 253–267, 2006.

FROELICHER, M., LIEDTKE, A., GROH, K. J., NEUHAUSS, S. C., SEGNER, H. EGGENRI. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. **Aquat. Toxicol.** v. 95, p. 307 – 319, 2009.

GHYSEN, A. CHAUDIÈRE, D. C. Development of the zebrafish lateral line. **Curr. Op. Neurobiology.** v. 14, p. 67-73, 2004.

GODINHO, H.M., BASILE-MARTINS, M.A., FENERICH, N. **et al.** Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Biologia.** v. 38, n. 1, p. 151-156, 1978.

GOMES, L.C., GOLOMBIESKI, J.I., GOMES, A. R. C. & BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185. 2000.

GOMIERO, L. M., SOUZA, U. P., BRAGA, F. M. S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serrado Mar, São Paulo, SP. **Biol. Neotropica**, v.7, n.3, p. 127-133, 2007.

GOYER, R. A. Lead toxicity: current concerns. **Environ. Health Perspect.** v. 100, p. 177 – 187, 1993.

GOYER, R.A., CLARSKSOM, W.T. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.), **Casarett and Doull's Toxicology: basic science of poisons.** New York: McGraw-Hill, 2001. p. 811- 867

GRIFFITT, R. J., LUO, J., GAO, J., BONZONGO, J. C., BARBER, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 27, p. 1972–8, 2008.

GUEDES, D. S. **Contribuição ao estudo de sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae).** 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1980.

GUILHERME, S., VALEGA, M., PEREIRA, M. E., SANTOS, M. A., PACHECO, M. Antioxidant and biotransformation responses in *Liza aurata* under environmental mercury exposure relationship with mercury accumulation and implications for public health. **Mar. Pollut. Bull.** v. 56, p. 845–859, 2008a.

GUILHERME, S., VALEGA, M., PEREIRA, M. E., SANTOS, M. A., PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 70, p. 411–421, 2008b.

GUIMARÃES, J. R. D., ROULET, M., LUCOTTE, M., MERGLER, D. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. **Scie. Total Environ.** v. 261, p. 91 – 98, 2000.

GUNTER, K. K., ASHNER, M., MILLER, L. M., ELISEEV, R., SALTER, J., ANDERSON, K., GUNTER, T. E. Determining the oxidation states of manganese in NT2 cells and cultured astrocytes. **Neurobiol. of Aging** v. 27, p. 1816-1826, 2006.

GWALTENEY-BRANT, S. M. Heavy metals. In: HASCHEK, W. M., ROSSEAUX, C. G., WALLIG, A. M. **Handbook of toxicologic pathology**. New York: Academic Press, 2002. p. 701-732

HALLARE, A. V., KOSMEHL, T., SCHULZE, T., HOLLERT, H., KOEHLER, H. R., TRIEBSKORN, R., Assessing the verity of sediment contamination in Laguna Lake, Philippines, using a sediment contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Sci. Total Environ.** v. 347, p. 254–271, 2005a.

HOLLERT, H., KEITER, S., KÖNIG, N., RUDOLF, M., ULRICH, M., BRAUNBECK, T. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **J. Soils Sediments** v. 3, p. 197–207, 2003.

HOWE, P. D., MALCOLM, H. M., DOBSON, S. **Manganese and its Compound: Environmental Aspects**. Geneva:WHO, 2004. 63 p. (WHO Concise International Chemical Assessment Document, 63)

HUANG, W., CAO, L., YE, Z., YIN, X. B., DOU, S. Z. Antioxidative responses and bioaccumulation in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic mercury exposure. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 152 (C), p. 99–106, 2010a.

HUANG, W., CAO, L., LIU, J.H., LIN, L.S., DOU, S.Z. Short-term mercury exposure affecting the development and antioxidant biomarkers of Japanese flounder embryos and larvae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 73, p. 1875–1883, 2010b.

JEZIERSKA, B. et al. Malformations of newly hatched common carp larvae. **Electron. J. Pol. Agric. Univ.**, Fisheries, Wroclaw, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2000.

JEZIERSKA, B., LUGOWSKA, K., WITESKA, M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish. **Fish Physiol. Biochem.** v. 35, p. 625–640, 2009.

JUNG, W. K., KIM, S. H., KOO, H. C., SHIN, S., KIM, J. M., PARK, Y. K., HWANG, S. Y., YANG, H., PARK, Y. H. Antifungal activity of the silver ion against contaminated fabric. **Mycoses** v. 50, p. 1208-1219, 2007.

KATTI, S.R., SATHYANESAN, A.G. Lead nitrate induced changes in the brain constituents of the freshwater fish *Clarias batrachus* (L). **Neurotoxicol.** v. 7, p. 47–51, 1986.

KELLY, M. **Mining and freshwater environment.** London: Elsevier, 1988. 231 p.

KIME, D.E. *et al.* Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. **Aquat. Toxicol.** Amsterdam, v. 36, p. 223-237, 1996.

KONG, X., WANG, S., JIANG, H., NIE, G., LI, X. Responses of acid/ alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus*. **Aquat. Toxicol.** p. 120 – 121; p. 119 – 125, 2010.

KOTLER, M. L., GONZALEZ, L. E., CORTINA, M. E., JUKNAT, A. A. Astrocytes fate: oxidative stress versus HO1/MAPK. **Biocell.** v. 29, p. 109, 2005.

KÜTTER, M. T., BEMVENUTI, M. A., MORESCO, A. Feeding strategy of the jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) in costal lagoons of southern Brazil. **Acta Scientiarum, Biol. Sci.** v.31, n.1, p. 41-47, 2009.

LAMMER, E., KAMP, H.G., HISGEN, V., KOCH, M., REINHARD, D., SALINAS, E.R., WENDLER, K., ZOK, S., BRAUNBECK, T. Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicol. In Vitro**, v. 23, p. 1436–1442, 2009b.

LAHNSTEINER, F. *et al.* The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. **J. Fish Biol.** London, v. 65, p. 1283-1297, 2004.

LAROSE, C., CANUEL, R., LUCOTTE, M., Di GIULIO, R. T. Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.147, n.2, p. 147, p.139 – 149, 2008.

LATIF, M. A., BODALY, R. A., JOHNSTON, T. A., FUDGE, R. J. P. Effects of environmental and maternally derived methylmercury on the embryonic and larval stages of wall eye (*Stizostedion vitreum*). **Environ. Pollut.** v. 111, p. 139–148, 2001.

LÓPEZ-BARRERA, E. A. **Avaliação da exposição de Nanopartículas de prata (NPAg) e do Benzo[a]pireno (BaP) em *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae).** 160 f Tese (Doutorado) Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

LI, Q. L., MAHENDRA, S., LYON, D. Y., BRUNET, L., LIGA, M. V., LI, D., ALVAREZ, P. J. J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water. Res.** v. 42, p. 4591-4602, 2008.

LIEM, K. F., BEMIS, W. E., WALKER, JR. W. F., GRANDE, L. **Functional anatomy of vertebrates: an evolutionary perspective**. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, c2001. 703 p

LIU, X., SULLIVAN, K. A., MADL, J. E., LEGARE, M., TJALKENS, R. B. Manganese induced neurotoxicity: the role of astroglial derived nitric oxide in striatal interneuron degeneration. **Toxicol. Sci.** v. 91, p. 521-531.

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

MARDINI, C. V., SILVEIRA, M. A., BARENHO, D. H. L. **Técnica de indução da desova em jundiá (*Rhamdia quelen*) empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1981. 14 p (Documento ocasional. n, 4)

MCNEELY, R.N., NEIMANIS, V.P., DWYER, L. **Water quality sourcebook: a guide to water quality parameters**. Ottawa : Environnement Canada. Dir Generale des Eaux Interieures, 1979.

MEURER, S., ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 12., 1997, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: SBI, 1997. p. 29,

MIRANDA, A. L., ROCHE, H., RANDI, M. A. F., MENEZES, M. L., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological and immunological findings. **Environ. Int.** v. 34, p. 939 – 949, 2008.

MORILLO, J., USERO, J. Trace metal bioavailability in the waters of two different habitats in Spain: Huelva estuary and Algeciras Bay. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 71, p. 851–859, 2008.

NAGEL, R. The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* — a general model in ecotoxicology and toxicology. **ALTEX** v. 19, p. 38–48, 2002.

NAKATANI, K. *et al.* **Ovos e larvas de peixes de água doce**. Maringá: Eduem, 2001. 378 p.

NARAHARA, M.Y., GODINHO, H.M., FENERICH-VERANI, N. & ROMAGOSA, E. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **B. Inst. Pesca** v. 12, n. 4, p. 13-22, 1985a.

NYBERG, P., ANDERSSON, P., DEGERMAN, E., BORG, H., OLOFSSON, E. Labile inorganic manganese—an overlooked reason for fish mortality in acidified streams? **Water Air Soil Pollut.** v. 85, p. 333–340, 1995.

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT.) **Guidelines for testing of chemicals:Section 2: Effects on biotic systems. Test n.203: fish, acute toxicity test.** Paris, 1992. 10 p.

PARTRIDGE, G. J., LYMBERY, A. J. Effects of manganese on juvenile mullet (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity—implications for inland mariculture. **Aquacult.** v. 290, p. 311–316, 2009.

PINDER, A. C. *et al.* Early ontogeny of sunbleak. **J. Fish Biol.** v. 64, p. 762-775, 2004.

POUGH, H.; Janis, C. M. Heiser, J. B. **A vida dos vertebrados.** São Paulo, Atheneu, 2003. p. 89 – 95.

POURANG, N. Heavy metal bioaccumulation in different tissues of two fish species with regards to their feeding habits and trophic levels. **Environ. Monitor. Assess.** v. 35, p. 207-219, 1995.

POWERS, C. M., BADIREDDY, A. R., RYDE, I. T., SEIDLER, F. J., SLOTKIN, T. A. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating and composition. **Environ. Health Perspect.** v. 119, p. 37–44, 2010a.

POWERS, C. M., YEN, J., LINNEY, E. A., SEIDLER F. J., SLOTKIN, T. A. Silver exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*): persistent effect on larval behavior and survival. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 32, p. 391–7, 2010c.

POWERS, C. M., SLOTKIN, T. A., SEIDLER, F. J., BADIREDDY, A. R., PADILLA, S. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 33, p. 708 – 714, 2011.

RABITTO, I. S., BASTOS, W. R., ANJOS, R. A. A., HOLANDA, Í. B. B., GALVÃO, R. C. F., FILIPAK NETO, F., MENEZES, M. L., SANTOS, C. A. M., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environ. Int.** v. 37, p. 56 – 65, 2011.

RADEMACHER, D.J., STEINPREIS, R.E., WEBER, D.N. Short-term exposure to dietary Pb and/or DMSA affects dopamine and dopamine metabolite levels in the medulla, optic tectum, and cerebellum of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 70, p. 199–207, 2001.

RADEMACHER, D.J., STEINPREIS, R.E., WEBER, D.N. Effects of dietary lead and/or dimercaptosuccinic acid exposure on regional serotonin and serotonin metabolite content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Neurosci. Lett.** v. 339, p. 156–160, 2003.

RODRIGUES-GALDINO, A.M., MAIOLINO, C.V., FORGATI, M., DONATTI, L., MIKOS, J.D., CARNEIRO, P.C., RIOS, F.S. Development of the neotropical catfish

Rhamdia quelen (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**. v. 18, n. 2, p. 131-44, 2010.

ROULEAU, C., TJ., ALVE, H., GOTTOFREY, J., PELLETIER, E. Uptake, distribution and elimination of 54 Mn (II) in the brown trout (*Salmo trutta*). **Environ.Toxicol. Chem.** v. 14, p. 483–490, 1995.

RUNGBY, J., SLOMIANKA, L., DANSCHER, G., ANDERSEN, A. H., WEST, M. J. A quantitative evaluation of the neurotoxic effect of silver on the volumes of the components of the developing rat hippocampus. **Toxicol.** v. 43, p. 261–8, 1987.

RURANGWA, E. et al. The minimum effective spermatozoa:egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **J. Fish Biol.** London. v. 53, p. 402-413, 1998.

SALOMONS, W., U. FÖRSTNER. **Metals in the hydrocycle**. Berlin: Springer, 1984. 349 p

SAMPAIO, E. V., SATO, Y. Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco. **Acta Scientiarum. Bio. Sci.** v.28, n.3, p. 263-268, 2006.

SAMSON, J.C., SHENKER, J. The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. **Aquat.Toxicol.** v. 48, p. 343–354.

SANTOS, E. C. O., MAURA de JESUS, I., BRADO, E. S., LOUREIRO, E. B., MASCARENHAS, A. F. S., WEIRICH, J., CÂMARA, V. C., CLEARY, D. Mercury exposures in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. **Environ. Res.** section, v. 84, p. 100-107, 2002.

SARYAN LA & ZENZ C. Lead and its compounds. In:Zenz, C.; Dickerson, O.B. & EP HORVATH, E.P. (eds.). **Occupational medicine**. Saint Louis: Mosby-Year, 1994. p. 506-541.

SCHOLZ, S., FISCHER, S., GÜNDEL, U., KÜSTER, E., LUCKENBACH, T., VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment–applications beyond acute toxicity testing. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v. 15, p. 394–404, 2008.

SCHULTE, C., NAGEL, R. Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachy danio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results. **ATLA**. v. 22, p. 12–19, 1994.

SKERFVING, S ; BERGDAHL I.A. Lead. In: NORDBERG, G.F, FOWLER, B.A, NORDBERG M.; FRIBERG L.T. **Handbook on the toxicology of metals**. 3.ed. New York: Academic Press; 2007. p.599–643.

SILVA, L. V. F. Reprodução de jundiá. In: BALDISSEROTTO, B. e RADÜNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. p. 95-106.

STOUTHART, A. J. H. X., SPANINGS, F. A. T., LOCK, R. A. C., WENDELAAR BONGA, S. E. Effects of low water pH on lead toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquat. Toxicol.** v. 30, p. 137 – 151, 1994.

SOLIMAN, E. F., SLIKKER Jr., W., ALI, S. F. Manganese-induced oxidative stress as measured by fluorescent probe: an in vitro study. **J. Neurosci. Res. Commun.** v. 17, p. 185 – 193, 1995.

SUN, L., SINGH, A. K., VIG, K., PILLAI, S. R., SINGH, S. R. Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus. **J. Biomed. Nanotechnol.** v. 4, p. 149-158, 2008.

ULRICH, M., SCHULZE, T., LEIST, E., GLAß, B., MAIER, M., MAIER, D., BRAUNBECK, T., HOLLERT, H. Okotoxikologische Untersuchung von Sedimenten und Schwebstoffen: Abschätzung des Gefährdungspotenzials für Trinkwasser und Korrelation verschiedener Expositionspfade (Acetonischer Extrakt, Natives Sediment) im Bakterienkontakttest und Fischeitest. **Umweltwiss Schad Forsch.** v. 14, p. 132–137, 2002.

ULUTURHAN, E., KUCUKSEZGIN F. Heavy metal contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey. **Water Res.** v. 41, p. 1185-92, 2007.

UNDERWOOD, E.J. **Trace elements in human and animal nutrition.** New York, Academic Press, 1977. 558 p

VANDER, A. J., JOHNSON, B. Accumulation of lead by renal slices in the presence of organic anions. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 166, p. 583, 1981.

VERLECAR, X.N., JENA, K. B., CHAINY, G. B. N. Modulation of antioxidant defenses in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. **Chem.** v. 71, p. 1977–1985, 2008.

VICTERY, W., MILLER, C. R., FOWLER, B. A. Lead accumulation by rat renal brush border membrane vesicles. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 231, p. 589, 1984.

XIE, Y., CHIBA, M., SHINOHARA, A., WATANABE, H., INABA, Y, **Ind, Health.** v. 36, p. 234, 1998.

WANG, Y., SEEBALD, J. L., SZETO, D. P., IRUDAYARAJ, J. Biocompatibility and biodistribution of surface-enhanced Raman scattering nanoparticles in zebrafish embryos: *in vivo* and multiplex imaging. **ACS Nano.** V. 27, n. 4 (7): p. 4039 – 53, 2010.

WATTS, L. T., RATHINAM, M. L., SCHENKER, S., HENDERSON, G. L. Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death. **J. Neurosci. Res.** v. 80, p. 655 – 666, 2005.

WEBER, D.N., RUSSO, A., SEALE, D.B., SPIELER, R.E. Waterborne lead affects feeding abilities and neurotransmitter levels of juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Aquat. Toxicol.** v. 21, p. 71–80, 1991.

WEBER, D.N. Exposure to sublethal levels of waterborne lead alters reproductive behavior patterns in fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Neurotoxicol.** v. 14, p. 347–358, 1993.

WEDEKIND, C., MÜLLER, R., SPICHER, H. Potential genetic benefits of mate selection in whitefish. **J. Evol. Biol.** v. 14, p. 980 - 986, 2001.

WEDEKIND, C., MÜLLER, R. Risk-induced early hatching in salmonids. **Ecology.** v. 86, p. 2525 - 2529, 2005.

WEIS, J S., WEIS, P. Effects of embryonic exposure to methylmercury on larval prey-capture ability in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 14, p. 153–156, 1995.

WITECK, L. Influência do cádmio na fertilização artificial do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). **Monografia** (Especialização em Desenvolvimento e Meio Ambiente)-Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2007.

WOLTERING, D.M. The growth response in chronic fish and early life stage toxicity tests: a review. **Aquat. Toxicol.** v. 5, p. 1–21, 1984.

WOYNAROVICH, E., HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão.** Brasília; FAO/CODEVASF/CNPq; 1983. 220 p.

WU Y, ZHOU Q, LI H, LIU W, WANG T, JIANG G. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. **Aquat. Toxicol.** v. 100, p.160–7, 2010.

YEO, M. K, YOON, J. W. Comparison of the effects of nano-silver antibacterial coatings and silver ions on zebrafish embryogenesis. **Mol. Cell. Toxicol.** v. 5, p. 23–31, 2009.

YI, Y. J., YANG, Z. F., ZHANG, S. H. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. **Environ. Pollut.** 2011.

YIN, Z., ASCHNER, J. L., dos SANTOS, A. P., ASCHNER, M. Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. **Brain. Res.** v. 1203, p. 1 – 11, 2008.

YU, Y. J., ZHANG, S. H. The relationship between fish heavy metal concentration and fish size in the upper and middle reach of Yangtze river. **Procedia Environ. Sci.** v. 13, p. 1699-1707, 2012.

ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** São Carlos, SP, RIMA, 2006. 463 p

ZHANG, L., WONG, M. H. Environmental mercury contamination in China: Sources and impacts. **Environ. Int.** v. 33, p. 108 – 121, 2007.

ZHOU, T., SCALI, R., WEIS, J. S. Effects of methylmercury on ontogeny of prey capture ability and growth in three populations of larval *Fundulus heteroclitus*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 41, p. 47–54. 2001.

ZHU, X., ZHU, L., DUAN, Z., QI, R., LI, Y., LANG, Y. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. **J. Environ. Sci. Health. A.** v. 43, p. 278–84, 2008.