



**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Curso de Pós-Graduação em Zootecnia**

**CRESCIMENTO, PARÂMETROS METABÓLICOS E ENZIMÁTICOS
EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS AO COBRE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vera Maria Machado da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**CRESCIMENTO, PARÂMETROS METABÓLICOS E ENZIMÁTICOS
EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS AO COBRE**

por

Vera Maria Machado da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal
de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS, Brasil

2006

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Curso de Pós-Graduação em Zootecnia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CRESCIMENTO, PARÂMETROS METABÓLICOS E ENZIMÁTICOS
EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS AO COBRE**

elaborada por

Vera Maria Machado da Silva

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Bernardo Baldisserotto
(Presidente/Orientador)

Dr. Leonardo José Gil Barcellos

Dr^a. Maria Amália Pavanato

Santa Maria, 13 de dezembro de 2006

Dedico esta dissertação à minha filha Juliana, luz da minha vida.

À minha família

À minha querida mãe, Gessi.

Sei que de onde estás,

torces por mim.

Nunca deixarei de te agradecer

pela vida preciosa que me destes.

Tentarei sempre ser digna de ser tua filha.

À meu pai, Daves

aos meus irmãos, seus pares

e descendentes,

agradeço o apoio e presença

constante de vocês em minha vida.

Ao meu marido, Mauro,

obrigada pela paciência,

amor e carinho.

Sem estes elementos

este trabalho não seria possível.

Agradecimentos

Agradeço à Deus que, com sua bondade infinita, me permitiu estar entre os poucos eleitos que podem realizar um estudo neste nível;

À Universidade Federal de Santa Maria, aos Programas de Pós-Graduação em Zootecnia e Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, pelo espaço e oportunidade para desenvolver este trabalho;

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, pela sua competência, tranquilidade e preciosos ensinamentos. Sem dúvida, professor, o senhor está no lugar certo. Obrigada!

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a Vania Lucia Loro, por ter me aberto as portas da Universidade após eu ter ficado tanto tempo afastada. Sua orientação e amizade foram fundamentais para a realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. João Radünz Neto, querido mestre que, com sua sabedoria e simpatia, sempre esteve disponível nos momentos necessários;

Ao Prof. Dr. José Henrique Sousa da Silva, que me mostrou, com suas aulas, que quando se faz algo por vocação e escolha, o tempo não é limite;

À secretária executiva do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Olirta Giuliani, pela sua disponibilidade e conhecimento, que muito agilizaram as questões burocráticas;

Às colegas do Laboratório de Bioquímica Avançada, Alexandra, Bibiana, Carolina, Charlene, Daiana, Denise, Joseânia, , Lissandra, Milene , Rita e Róli, meu muito obrigada!

À querida colega e amiga Alexandra pelas análises de laboratório, meu agradecimento especial. Com certeza as maneiras que eu poderei te retribuir serão infinitamente insignificantes se comparadas com as que, sem dúvida nenhuma, a vida vai te beneficiar;

Aos amigos Joseânia, Carolina e Leandro, meu eterno carinho e agradecimento. Vocês foram para mim, não só colegas, mas amigos de verdade. Este trabalho também lhes pertence;

À Gabriella, que muito me ajudou na parte experimental, obrigada;

Ao Rafael , Fábio, Neiva , Ronaldo e Mauro, meu carinho.

Gostaria de agradecer ao Colégio Militar de Santa Maria que estimulou a realização deste trabalho, disponibilizando tempo para que ele fosse executado;

Um agradecimento carinhoso aos colegas e amigos da Seção de Ensino “C” do CMSM, pelo apoio e companheirismo;

À banca examinadora, Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos e Prof^ª. Dr^ª. Maria Amália Pavanato, pela participação nesta dissertação, objetivando a melhora do trabalho.

Ao meu querido sobrinho Estêvão da Silva Marinho, pelas preciosas dicas de informática, meu carinho e agradecimento;

A meu sobrinho Daniel da Silva Silveira, anjo que mesmo com a asa quebrada conseguiu voar e nos deixou aqui loucos de saudade, agradeço pela instalação do Programa “STATÍSTICA”, com o qual analisei todos os meus resultados;

Aos jundiás pelo sacrifício involuntário;

Meu agradecimento especial a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

ACREDITO NISSO...

“ SEJA O QUE FOR QUE VOCÊ POSSA FAZER; OU SONHE FAZER, COMECE.

A OUSADIA ENVOLVE TALENTO, PODER E MAGIA. OUSE FAZER E O PODER

LHE SERÁ DADO.”

Goethe

“A ALEGRIA DO TRIUNFO JAMAIS PODERIA SER EXPERIMENTADA SE NÃO

EXISTISSE A LUTA, QUE É O QUE DETERMINA A OPORTUNIDADE DE

VENCER.”

Gonzáles Pecotche

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1Objetivo geral	15
2.2Objetivo específico	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
Anexo 1	19
4. Manuscrito	24
Abstract	25
Introdução	26
Material e metodologia	27
Resultados	30
Tabela 1.....	31
Tabela 2.....	32
Tabela 3.....	33
Figura 1	34
Discussão	35
Referências	38
5. Conclusões	44
6. Referências bibliográficas	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE- Acetilcolinesterase

Cu - Cobre

CL₅₀- Concentração letal para 50% dos animais

CuSO₄- Sulfato de Cobre

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Curso de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO, PARÂMETROS METABÓLICOS E ENZIMÁTICOS EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS AO COBRE

Autora: Vera Maria Machado da Silva
Orientador: Bernardo Baldisserotto
Local e data de defesa: Santa Maria, 13 de dezembro de 2006.

O objetivo deste estudo foi verificar a concentração letal média em 96 h (CL₅₀) para o cobre, bem como o efeito da exposição ao cobre sobre o crescimento, parâmetros metabólicos (glicogênio, glicose, lactato e proteína) em alguns tecidos (fígado, músculo e cérebro) e a atividade da acetilcolinesterase (AChE) (cérebro e músculo), amilase e maltase (intestino) em jundiás (*Rhamdia quelen*). A CL₅₀ para o cobre foi 0,4 mg/L. Nos experimentos de crescimento os peixes foram expostos durante 45 dias a 10 e 20% da CL₅₀, ou seja, 0,04 e 0,08 mg/L respectivamente. A adição de cobre não alterou os parâmetros de crescimento avaliados (peso, comprimento e biomassa). No fígado, os níveis de lactato aumentaram nos exemplares expostos a 0,04 mg/L e diminuíram nos mantidos em 0,08 mg/L, enquanto que os níveis de proteína diminuíram em ambas as concentrações em relação ao grupo controle. No músculo houve redução na atividade do glicogênio nos exemplares mantidos nas duas concentrações testadas, a glicose e o lactato aumentaram nos expostos a 0,04 mg/L e diminuíram nos expostos a 0,08 mg/L, e a proteína aumentou nos mantidos em 0,08 mg/L. Os níveis de glicose e lactato no plasma foram maiores nos exemplares mantidos em 0,04 mg/L e diminuíram os níveis de proteína nos expostos a ambas as concentrações de cobre. A atividade da amilase foi menor nos juvenis expostos a ambas as concentrações, enquanto a da maltase foi maior em 0,04 mg/L quando comparada ao grupo controle. A atividade da AChE cerebral foi menor nos exemplares expostos a ambas as concentrações, enquanto que a AChE muscular não sofreu alterações após os 45 dias de exposição. Conclui-se que o cobre mesmo em concentrações subletais pode alterar diversos parâmetros metabólicos e enzimas de interesse toxicológico e alimentar.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post - Graduate Course on Animal Husbandry
Universidade Federal de Santa Maria

SURVIVAL, GROWTH, METABOLIC AND ENZYMATIC PARAMETERS IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) EXPOSED TO WATERBORNE COPPER

Author: Vera Maria Machado da Silva
Adviser: Bernardo Baldisserotto

Place and date of defense: Santa Maria, December 13th, 2006.

The aim of this study was to determine the mean lethal concentration (96 h) for waterborne copper (LC₅₀), as well as the effect of the exposure to copper on growth, metabolic parameters (glycogen, glucose, lactate, and protein) in some tissues, activity of acetylcholinesterase (AChE) (brain and muscle), amylase and maltase (intestine) in silver catfish (*Rhamdia quelen*). The LC₅₀ for copper was 0.4 mg/L. On growth experiments fish were exposed to 10 and 20% LC₅₀, i.e., 0.04 and 0.08 mg/L respectively. Exposure to copper did not change growth parameters (weight, length and biomass). In the liver, lactate levels increased in juveniles exposed to 0.04 mg/L and decreased in those maintained at 0.08 mg/L, while protein levels decreased in those exposed to both concentrations compared to unexposed specimens. Glycogen levels in the muscle were lower in fish exposed to both concentrations, glucose and lactate were higher in those exposed to 0.04 mg/L and decreased in juveniles maintained at 0.08 mg/L, while protein was higher in those exposed to 0.08 mg/L. Glucose and lactate plasma levels were higher in juveniles exposed to 0.04 mg/L, but protein levels were lower in those maintained at both copper concentrations. Amylase activity was lower in juveniles exposed to both concentrations, but maltase was higher in those exposed to 0.04 mg/L than control group. Brain AChE activity was lower in fish exposed to both concentrations while muscle AChE activity was not affected after 45 days of exposure. It can be concluded that copper can change several metabolic parameters and enzymes of toxicological and feeding interest even at sublethal concentrations.

Keywords: lethal concentration, growth, metabolic parameters, acetylcholinesterase, amylase, maltase, silver catfish (*Rhamdia quelen*).

1.INTRODUÇÃO

Processos naturais e atividades antropogênicas liberam para o ambiente aquático uma grande variedade de produtos tóxicos, dentre eles o cobre (Cu), que pode vir a causar danos ao ecossistema (Bentley, 1992; Rashed, 2001; Bordajandi et al., 2003). O cobre é classificado como micronutriente, sendo em alguns casos requerido para a função celular (Karan et al., 1998; McGeer et al., 2000). Ele é largamente utilizado, na forma de sulfato de cobre, no controle de protozoários, trematodos monogêneos, fungos e bactérias externas. Porém, em concentrações elevadas, o cobre pode se tornar tóxico aos peixes e a outros organismos aquáticos (Bentley, 1992; Romani et al., 2003; Celik & Oehlenschlager, 2004).

Dentre os parâmetros utilizados para avaliar a toxicidade por metais em peixes, cita-se a medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). As colinesterases são amplamente distribuídas nos tecidos animais, e estudos demonstraram alterações na atividade da enzima AChE em resposta à exposição a metais em peixes (Nemcsók et al., 1984; Dautremepuits et al., 2000; Lionetto et al., 2003; Romani et al., 2003). Alterações fisiológicas causadas em peixes devido à exposição a compostos tóxicos também podem ser avaliadas pelo estudo de parâmetros metabólicos (glicogênio, glicose, lactato e proteína). Se ocorrerem alterações dos parâmetros avaliados, elas poderão indicar acomodação ao cobre, que envolvem múltiplos mecanismos regulatórios (Pelgrom et al., 1995).

Altos níveis de cobre também interferem no crescimento e prejudicam a conversão alimentar em peixes (Marr et al, 1996; Schlenk et al., 2001). No entanto, alguns autores (Seim et al., 1984; Taylor et al., 2000) verificaram que a exposição ao cobre pode não influenciar no crescimento, especialmente quando a ração for oferecida em grande quantidade ou à vontade.

O presente trabalho visa contemplar uma espécie de interesse para a piscicultura na região Sul. O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de peixe encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México. Segundo Radünz Neto (1981), apresenta boa produtividade em açudes, boa aceitação no mercado

consumidor e apresenta alto potencial de comercialização, tornando-se uma opção para o fomento da piscicultura, pois apresenta ótimos resultados ao produtor, resiste bem às temperaturas baixas e continua crescendo inclusive no inverno.

O estudo de possíveis alterações bioquímicas frente a contaminantes aquáticos também é de grande relevância se considerarmos que estes podem vir a comprometer a sobrevivência de espécies aquáticas. Considerando a escassez de estudos sobre a toxicologia e efeitos do cobre em peixes nativos do Brasil, consideramos de grande importância determinarmos os efeitos que esse produto pode causar.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O presente estudo tem por objetivo verificar a ação do cobre sobre a atividade de enzimas digestivas, crescimento, sobrevivência e parâmetros metabólicos em jundiás (*Rhamdia quelen*).

2.2 Objetivos específicos:

1. Verificar a concentração letal média (CL₅₀) do cobre para jundiá;
2. Verificar possíveis alterações no crescimento e ganho de peso de jundiás expostos a diferentes concentrações de cobre dissolvido na água;
3. Verificar se o cobre afeta parâmetros metabólicos em fígado, músculo e plasma destes peixes;
4. Medir a influência do cobre na atividade de carboidrases como a amilase e maltase no intestino de jundiás;
5. Verificar se o cobre altera a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebro e músculo de jundiás

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Potencial de contaminação ambiental

A contaminação de águas por metais é geralmente oriunda da descarga de poluentes da agricultura e das atividades industriais e urbanas (Bentley, 1992; Rashed, 2001; Bordajandi et al., 2003; Siraj Basha & Usha Rani, 2003). As águas são drenadas para os rios transportando diferentes resíduos e uma variedade de produtos tóxicos que podem causar danos ao ecossistema e aos organismos que aí vivem (Barak & Manson, 1990; Hamilton et al., 1998; Bordajandi et al., 2003; Romani et al., 2003). O aumento da contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais tem causado diversas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em organismos aquáticos (Dethloff et al., 1999; Campana et al., 2003; Bordajandi et al., 2003; Siraj Basha & Usha Rani, 2003; Dautremepuits et al., 2000). Poluentes aquáticos também podem influenciar negativamente na reprodução de peixes. Além disso, os efeitos subletais deixam peixes juvenis e adultos mais suscetíveis à predação e/ou menos capazes de tolerar outro agente estressante, como baixas concentrações de oxigênio dissolvido (Muller & Lloyd, 1996).

Atualmente, diversos estudos indicam que Hg, Pb, Cd, Cu, Zn, Al, Mn e Cr são os principais metais presentes no ambiente aquático (Schlenk & Benson, 2001). A toxicidade dos metais em peixes depende das características físico-químicas da água, da concentração, do tipo de metal, bem como do tempo de exposição. Além disso, a toxicidade pode variar de acordo com a espécie de peixe, estágio de vida e hábito alimentar (Campana et al., 2003; Papagiannis et al., 2004; Sanchez et al., 2004).

Peixes têm sido freqüentemente usados como indicadores de poluição ambiental em sistemas aquáticos, pois são sensíveis a mudanças nos diferentes ambientes (Paris-Palacios et al., 2000; Roméo et al., 2000; Whitfield & Elliott, 2002). Eles são geralmente considerados o topo da cadeia alimentar aquática e podem concentrar grandes quantidades de metais em seus tecidos (Barak & Manson, 1990; Mansour & Sidky, 2002). Diferentes espécies de peixes capturadas em lagos, próximos a áreas urbanas, apresentaram altas concentrações de zinco e cobre em diferentes tecidos analisados (Bordajandi et al., 2003; Papagiannis et al., 2004).

A absorção de metais, como o cobre, pode se dar diretamente através da água ou indiretamente através da cadeia alimentar (Bentley, 1992; Hamilton et al., 1998). Nos peixes, as brânquias são um importante alvo de metais, mas estes também podem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal e pele (Watanabe et al., 1997; Schlenk & Benson, 2001). Nas brânquias, os metais podem causar danos ao epitélio branquial, resultando assim em distúrbios respiratórios e osmorregulatórios (Hogstrand & Wood, 1995; McGeer et al., 2000; Handy, 2003).

3.2 cobre

O cobre é um metal de transição, considerado micronutriente essencial, sendo em alguns casos requerido para a função celular (Karan et al., 1998; McGeer et al., 2000). Apesar disso, em altas concentrações pode vir a ser prejudicial ao organismo (Bentley, 1992; Camakaris et al., 1999; Schlenk & Benson, 2001; Celik & Oehlenschlager, 2004).

O cobre é considerado um importante elemento para os animais, pois é utilizado como cofator enzimático, além de estar envolvido no processo de transferência de elétrons na cadeia respiratória (Watanabe et al., 1997, Camakaris et al., 1999; Celik & Oehlenschlager, 2004) e em reações redox em enzimas tais como citocromo oxidase e superóxido dismutase (figura 1) (Watanabe et al., 1997, Camakaris et al., 1999; Paris-Palacios et al., 2000).

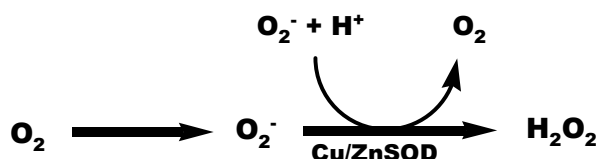


Figura 1- Reação da superóxido dismutase.

Esta enzima tem como função a remoção do ânion superóxido.

A monoamina oxidase, responsável pela maturação do colágeno e elastina, também é uma enzima dependente de cobre. Acrescenta-se ainda, a ceruloplasmina, uma importante enzima que está envolvida na mobilização e na utilização de ferro estocado no fígado (Sharma et al., 2005). O cobre é um componente desta enzima,

e ligado a ela não interage com outras moléculas. Órgãos como o fígado, cérebro e coração contêm quantidades consideráveis de cobre (Watanabe et al., 1997). Estudos demonstraram que efeitos adversos foram observados em peixes expostos ao cobre. Por exemplo, podem-se citar alterações nas funções respiratórias e ionoregulatórias devido aos danos em órgãos alvos como as brânquias. Esta modificação no metabolismo aeróbico aumentou o consumo de oxigênio e este aumento, por sua vez, reduziu o desempenho natatório (McGeer et al., 2000; Handy, 2003). Além disso, McGeer et al. (2000) demonstraram que a exposição crônica ao cobre aumentou a atividade da Na^+K^+ -ATPase branquial, implicando em um maior custo energético para a osmorregulação. Pelgrom et al. (1995) expuseram exemplares de *Oreochromis mossambicus* a 50, 100, 200 $\mu\text{g Cu/L}$ e observaram um aumento no número de células de cloreto conforme se aumentava a concentração do metal. Neste estudo também foi observado um diâmetro aumentado destas células e um aumento das concentrações de cobre nas brânquias e no plasma. Além disso, altos níveis de cobre diminuem o crescimento e prejudicam a conversão alimentar em peixes (Marr et al., 1996; Schlenk & Benson, 2001).

3.3. Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O jundiá, pertencente à família Heptapteridae, é uma espécie endêmica do sul da América e pode resistir ao frio do inverno e crescer rapidamente no verão. Quando cultivado a uma densidade de 2 a 4 peixes/ m^2 e pode alcançar de 600-800g em oito meses (Barcellos et al., 2004). Possui uma coloração que varia de marrom-avermelhado claro à cinza ardósia (Gomes et al., 2000). Este peixe possui hábito alimentar onívoro com uma preferência por crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. Esta característica contribui para a adaptação deste peixe ao alimento artificial, facilitando a sua domesticação e condicionamento às condições de cultivo. Vive em lagos e poços fundos de rios. Esconde-se entre pedras e troncos apodrecidos, junto às margens e vegetação. Possui hábitos noturnos, saindo à noite, à procura de alimento (Baldisserotto, 2004).

O crescimento do jundiá é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida e seu cultivo tem se intensificado no sul do Brasil, pois sua reprodução induzida apresenta bons resultados e altas taxas de fecundidade (Gomes et al., 2000). Além disso, o jundiá também apresenta grande aceitação pelo mercado consumidor devido à sua carne saborosa e ausência de espinhos intramusculares. No Brasil, poucos estudos avaliaram os efeitos de metais em peixes, principalmente em espécies nativas como os jundiás

ANEXO 1.

Exemplares de jundiá (*Rhamdia quelen*)



3.4. Acetilcolinesterase (AChE)

O estudo de parâmetros bioquímicos, tais como a medida da atividade de enzimas, reflete as condições funcionais da célula, tecidos e órgãos, e no caso de exposições a compostos tóxicos, as possíveis alterações causadas por estes.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima que tem sido usada como um biomarcador, indicando estresse em organismos não alvos como peixes, pela presença de agentes tóxicos, como metais (Nemcsók et al., 1984; Dautremepuits et al., 2000; Fernández-Vega et al., 2002; Lionetto et al., 2003). A AChE é uma classe de serina hidrolase que catalisa a hidrólise da acetilcolina, envolvida na neurotransmissão colinérgica do tecido nervoso e muscular (Voet et al., 2000; Romani et al., 2003). Em vertebrados, as colinesterases são classificadas como acetilcolinesterases (AChE, EC. 3.1.1.7) e butirilcolinesterases (BuChE, EC 3.1.1.8) com base no substrato específico e sensibilidade a agentes inibidores (Massoulie et al., 1993; Chuiko, 2000). A importância em se estudar esta enzima se deve ao fato de que o sistema nervoso é um dos tecidos mais vulneráveis do organismo, e que quando danificado pode provocar anormalidades comportamentais, afetando até mesmo a sobrevivência de peixes (Dautremepuits et al., 2000).

Nemcsók et al. (1984) estudaram a atividade da AChE em cérebro, coração, músculo e soro de *Cyprinus carpio* expostos a 1,1 e 50 mg/L de cloreto de zinco e sulfato de cobre. Os peixes expostos ao cloreto de zinco não demonstraram alterações na atividade da AChE, mas, aqueles expostos ao sulfato de cobre demonstraram inibição na atividade desta enzima. Romani et al. (2003) também observaram mudanças na atividade da AChE nos tecidos cerebrais e musculares de *Sparus auratus* após 20 dias de exposição a concentrações subletais de cobre (100 e 500 µg/L). Porém, este estudo demonstrou que a exposição ao cobre conduziu a um aumento da atividade específica da AChE, melhorando a eficiência catalítica. Além destes estudos, Lionetto et al. (2003) avaliaram a atividade da AChE em organismos marinhos, tentando verificar suas alterações pela ação de diferentes agentes químicos, tais como metais pesados e pesticidas. A espécie de peixe estudada, *Mullus barbatus*, apresentou inibição na atividade da AChE no cérebro

dos peixes coletados próximos a áreas urbanas, provavelmente pela presença de metais pesados.

3.5. Enzimas digestivas

O peixe é um produto de alto valor nutricional, principalmente por sua proteína possuir elevado valor biológico. Outro fator importante em termos nutritivos seria a fração lipídica da carne, a qual é composta de ácidos graxos com elevado grau de insaturação, que é benéfico para a saúde humana (Huss, 1988). O conteúdo protéico de dietas comerciais para peixes, distinto de outras espécies domésticas, é geralmente alto, variando de 30 a mais de 50% de proteína bruta em base de matéria seca (Kikuchi, 1999; Panserat et al., 2002). O aspecto mais interessante seria uma capacidade digestiva para o melhor aproveitamento desta proteína. O jundiá altera seus níveis de protease ácida de acordo com o aumento da quantidade de proteína na dieta (Melo et al., 2002).

Até o momento não se detectou nenhuma atividade enzimática na cavidade bucal de teleósteos. Uma atividade proteolítica foi detectada na mucosa do esôfago de *Girella tricuspidata* (perca preta). Contrastando com a ampla variedade em termos anatômicos, o estômago da maioria dos peixes secreta enzimas proteolíticas, sendo a pepsina a mais comum. Esta enzima é importante para as espécies carnívoras, como a traíra, pois inicia a digestão de proteínas (Baldisserotto, 2002).

Como em outros vertebrados, a habilidade dos peixes em aproveitar os alimentos ingeridos depende da presença de sistemas enzimáticos ao longo do sistema digestório (Tengjaroenkul, 2000). Assim sendo, o processo de digestão é possibilitado pela ocorrência de enzimas digestivas, as quais atuam sobre o alimento ingerido, ao longo do trato gastrintestinal (Jobling, 1994). Tem sido verificado que o padrão das enzimas digestivas reflete a capacidade de aproveitamento dos alimentos pelos peixes e também que a indução de determinadas enzimas está diretamente relacionada ao tipo de dieta do peixe (Torrissen et al., 1994). Barrington (1957) e Kapoor et al. (1975) observaram significativas mudanças na atividade das enzimas digestivas em diferentes períodos

do ciclo anual dos peixes, sendo a temperatura o fator que mais influenciou nessas alterações.

O hábito alimentar dos peixes pode influenciar os processos digestivos e também a distribuição das enzimas ao longo do trato digestivo, mas de acordo com Stevens (1988), as adaptações do sistema digestório das espécies estão mais relacionadas com o alimento ingerido do que com o ambiente e a categoria taxonômica a que pertencem. Em geral, peixes carnívoros demonstram uma alta atividade de proteases, enquanto peixes onívoros e herbívoros demonstram atividade de carboidrases alta (Ugolev & Kuz'mina, 1994). Desta maneira, o estudo mais detalhado do perfil de enzimas que atuam nos processos digestórios das espécies de peixes utilizadas em piscicultura é de fundamental importância para a redução de custos e aumento na eficiência de produção.

Os processos enzimáticos-digestivos são específicos para o tipo de alimento e envolvem a quebra de proteínas, lipídios e carboidratos. As proteínas são hidrolisadas em aminoácidos livres ou cadeias peptídicas e os carboidratos em açúcares simples e as gorduras em ácidos graxos e glicerol. A maior parte da digestão dos alimentos nos peixes ocorre no intestino. Uma grande quantidade de enzimas é produzida pelo pâncreas, como tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidase (proteolíticas), amilases, lipases e quitinases (De Silva e Anderson, 1995). O intestino também produz algumas enzimas para completar a digestão das proteínas (dipeptidases), carboidratos (dissacaridases) e lipídios (lecitinases) (Jobling, 1995). A digestão dos carboidratos é realizada no intestino por uma variedade de enzimas. A mais comum é a amilase, que ataca ligações glicosídicas α -1,4, encontradas no amido, produzindo uma variedade de oligossacarídeos (Lovell, 1989). O aumento na produção de amilase pancreática pode ocorrer em resposta à presença de carboidratos no lúmen do trato digestório ou dos produtos de sua hidrólise. A glicose pode influenciar diretamente a produção desta enzima pelo tecido pancreático, ou indiretamente, estimulando a liberação de insulina, a qual aumentará a secreção de amilase (Jobling, 1995). A digestão final dos carboidratos é realizada por oligossacarídeos associados às microvilosidades do epitélio intestinal, como é o caso da maltase (Tengjaroenkul et al., 2000).

Os peixes, em geral, possuem baixa capacidade de aproveitamento dos carboidratos. Algumas enzimas, como a amilase e a maltase, apresentam-se com

variações de atividade em espécies com diferentes hábitos alimentares. Peixes onívoros tendem a possuir maior capacidade de digestão dos carboidratos que os carnívoros. Em piava (*Leporinus obtusidens*), uma espécie onívora, por exemplo, a amilase e maltase ocorrem em grande quantidade no intestino (Gioda et al., 2005).

Os peixes herbívoros, como a carpa capim, possuem uma boa capacidade de digestão de celulose, devido à presença de enzimas celulíticas, produzidas por bactérias simbióticas, que auxiliam na digestão de forragens (Lesel et al., 1986). O mesmo autor salienta que esta capacidade digestória deve ser observada principalmente em relação aos carboidratos presentes na dieta. Para a carpa capim, Das & Tripathi (1991) recomendam a incorporação de proteína animal na dieta desta espécie, onde encontraram altas atividades de amilases e também de proteases. Entretanto, avaliando a atividade de amilase em três espécies de peixes tropicais, Seixas Filho et al. (1999) observaram maior atividade específica de amilase no surubim (carnívoro) que na piracanjuba e piau (onívoros), o que sugere a possibilidade de uma certa adaptação do complexo enzimático devido às condições de criação. Sabapathy & Teo (1993) explicam que isto pode estar relacionado com a necessidade de digerir o glicogênio do tecido do alimento. Na maioria dos peixes, boa parte das enzimas é reabsorvida na região posterior do intestino.

4. MANUSCRITO

Sobrevivência, crescimento e parâmetros metabólicos e enzimáticos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao cobre

Vera Maria Machado da Silva¹, Alexandra Pretto¹, Joseânia Salbego¹, Carolina Rosa Gioda¹, Vania Lúcia Loro¹, João Radunz Neto², Bernardo Baldisserotto³.

Departamentos de Química (1), Zootecnia (2), Fisiologia e Farmacologia (3), Universidade Federal de Santa Maria.

Autor para correspondência

Bernardo Baldisserotto
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria
97105.900 – Santa Maria, RS, Brasil
Fone: 55 55-220 – 8342
e – mail: bernardo@smail.ufsm.br

Abstract

The aim of this study was to determine the mean lethal concentration (96 h) for waterborne copper (LC_{50}), as well as the effect of the exposure to copper on growth, metabolic parameters (glycogen, glucose, lactate, and protein) in some tissues, activity of acetylcholinesterase (AChE) (brain and muscle), amylase and maltase (intestine) in silver catfish (*Rhamdia quelen*). The LC_{50} for copper was 0.4 mg/L. On growth experiments fish were exposed to 10 and 20% LC_{50} , i.e., 0.04 and 0.08 mg/L respectively. Exposure to copper did not change growth parameters (weight, length and biomass). In the liver, lactate levels increased in juveniles exposed to 0.04 mg/L and decreased in those maintained at 0.08 mg/L, while protein levels decreased in those exposed to both concentrations compared to unexposed specimens. Glycogen levels in the muscle were lower in fish exposed to both concentrations, glucose and lactate were higher in those exposed to 0.04 mg/L and decreased in juveniles maintained at 0.08 mg/L, while protein was higher in those exposed to 0.08 mg/L. Glucose and lactate levels were higher in juveniles exposed to 0.04 mg/L, but protein levels were lower in those maintained at both copper concentrations. Amylase activity was lower in juveniles exposed to both concentrations, but maltase was higher in those exposed to 0.04 mg/L than control group. Brain AChE activity was lower in fish exposed to both concentrations while muscle AChE activity was not affected after 45 days of exposure. It can be concluded that copper can change several metabolic parameters and enzymes of toxicological and feeding interest even at sublethal concentrations.

Keywords: lethal concentration, growth, metabolic parameters, acetylcholinesterase, amylase, maltase, silver catfish, *Rhamdia quelen*..

1. Introdução

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México. Segundo Radünz Neto (1981), apresenta boa produtividade em açudes, boa aceitação no mercado consumidor, e apresenta alto potencial de comercialização, tornando-se uma opção para o fomento da piscicultura. Dentre as espécies nativas do Rio Grande do Sul, o jundiá está se destacando como uma das mais promissoras para o cultivo, pois apresenta crescimento rápido com fácil adaptação ao manejo em criações intensivas. Esta espécie foi escolhida, por ser nativa, facilmente cultivada em cativeiro e apresentar ótimos resultados ao produtor.

Vários tipos de metais podem poluir os ecossistemas aquáticos, entre eles, o cobre (Cu), que é classificado como micronutriente essencial, sendo em alguns casos requerido para a função celular normal (Bentley et al., 1992; Karan et al., 1998). É utilizado como cofator enzimático, por exemplo, em enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e na síntese da hemoglobina (Harris, 2003; Celik & Oehlenschlager, 2004). Uma variedade de alterações comportamentais e fisiológicas como perda de apetite, crescimento reduzido e mortalidade foram observados em peixes expostos ao cobre em concentrações superiores às requeridas pelo organismo (De Boeck et al., 1995; McGeer et al., 2000).

Este metal está freqüentemente presente em ambientes aquáticos, sendo que a contaminação é geralmente oriunda da descarga de poluentes da agricultura e das atividades industriais e urbanas (Bordajandi et al., 2003; Papagiannis et al., 2004). As águas são drenadas para os rios transportando diferentes resíduos e uma variedade de produtos tóxicos, que podem causar danos ao ecossistema e aos organismos que aí vivem, como os peixes (Barak & Mason, 1990; Bordajandi et al., 2003). Em ambientes naturais, os metais estão presentes geralmente em concentrações subletais.. No entanto, de um modo geral, os efeitos da exposição crônica ao cobre sobre o crescimento e a atividade de enzimas digestivas, em peixes é pouco conhecido. Para os peixes nativos da região Sul, especialmente

para a espécie em estudo, poucos trabalhos avaliaram os efeitos de metais no cultivo destes peixes

O processo de digestão é possibilitado pela ocorrência das enzimas digestivas, atuando sobre o alimento ingerido, ao longo do trato gastrointestinal (Jobling, 1994). Tem sido verificado que o padrão das enzimas digestivas reflete a capacidade de aproveitamento dos alimentos pelos peixes e também que a indução de determinadas enzimas está diretamente relacionada ao tipo de dieta do peixe (Torrissen et al., 1994). Barrington (1957) e Kapoor et al. (1975) observaram significativas mudanças na atividade das enzimas digestivas em diferentes períodos do ciclo anual dos peixes, sendo a temperatura o fator que mais influenciou nessas alterações. Vários estudos mostram que altos níveis de cobre diminuem o crescimento e prejudicam a conversão alimentar em peixes (Marr et al., 1996; Schlenk et al., 2001)

Segundo Marr et al. (1996) o crescimento da truta arco – íris (*Oncorhynchus mykiss*) apresentou-se reduzido em exemplares expostos ao cobre. Esta redução no crescimento foi atribuída ao aumento das demandas metabólicas associadas com o processo de detoxificação deste metal nos tecidos. Em geral os organismos, incluindo peixes, têm desenvolvido uma variedade de mecanismos para protegê-los dos efeitos tóxicos de metais (Siraj Basha and Usha Rani, 2003).

Considerando a importância econômica e ecológica do jundiá e a constante presença do cobre no ambiente aquático, o presente trabalho visou contribuir no esclarecimento de seus efeitos sob alguns aspectos bioquímicos e fisiológicos deste peixe, bem como avaliar se este metal interfere no crescimento desta espécie.

2. Materiais e Metodologia

2.1. Animais

Foram utilizados peixes coletados na piscicultura Bela Vista, São João do Polêsine, RS ($4,12 \pm 0,63$ g e $6,84 \pm 1,26$ cm). Os exemplares foram transportados para o laboratório de Bioquímica Adaptativa (UFSM), onde foram pesados, medidos e mantidos em caixas de 250 L, com temperatura e aeração controladas, durante

aproximadamente quinze dias para aclimação. Durante o período experimental os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial peletizada, contendo 42% de proteína bruta (Purina, Ribeirão Preto – São Paulo). A quantidade diária de alimento oferecida foi correspondente a 5% da biomassa. Fezes e resíduos alimentares foram removidos diariamente por sifonagem.

2.2. Experimento 1 - Determinação da CL_{50} - 96h

Após a aclimação foram utilizados quarenta peixes, distribuídos em cinco caixas de plástico, de 45 litros, com oito peixes cada, onde permaneceram por quatro dias (96 h) para testes de sobrevivência, expostos a cinco diferentes concentrações de cobre (em mg/L): 0,3; 0,5; 0,8; 1,2 e 1,5. Durante este período os parâmetros da água foram: temperatura $20,2 \pm 0,8$ °C, pH $7,3 \pm 0,5$, oxigênio dissolvido $5,3 \pm 0,2$ mg/L, amônia não ionizada $7,0 \pm 0,1$ µg/L, nitrito $0,08 \pm 0,004$ mg/L, dureza 22 ± 2 mg/L $CaCO_3$ e alcalinidade $42,3 \pm 2,5$ mg/L $CaCO_3$.

Em intervalos de 6-8 horas foram feitas observações para verificar se houve mortalidade. Em caso positivo, o número de mortos foi registrado para estimativa da percentagem de sobrevivência e concentração letal. Os mortos foram retirados e encaminhados para incineração. A CL_{50} foi calculada pelo método dos probitos de acordo com Finney (1971) e o valor obtido foi de 0,4 mg/L. Após a determinação do valor da CL_{50} , foi realizada a segunda etapa do experimento.

2.3. Experimento 2 – Exposição de jundiás à diferentes concentrações de cobre por 45 dias.

Os peixes foram expostos durante 45 dias às concentrações de 0,0 (controle), 10 e 20% da CL_{50} obtida no experimento 1 para o cobre (em mg Cu/L): 0,0; 0,04 e 0,08. O cobre foi adicionado na água, na forma de $CuSO_4$, no início do experimento e a reposição, a cada sifonagem, realizada diariamente para retirada de fezes e resíduos alimentares, foi realizada a partir de uma solução-mãe previamente

preparada a cada 7 dias. Os tratamentos foram feitos em duplicata, com trinta e cinco peixes em cada caixa, com volume de 250 L cada, totalizando seis caixas e duzentos e dez animais.

Durante o período experimental foram monitorados as características físico-químicas da água e os valores estimados e mantidos foram os seguintes: temperatura $20,7 \pm 0,6$ °C, pH $7,3 \pm 0,2$, oxigênio dissolvido $5,3 \pm 0,2$ mg/L, amônia não ionizada $6,0 \pm 0,1$ µg/L, nitrito $0,048 \pm 0,005$ mg/L, dureza $26,3 \pm 3,1$ mg/L CaCO₃ e alcalinidade $43,8 \pm 1,6$ mg/L CaCO₃. Para a aferição da temperatura e oxigênio dissolvido utilizou-se oxímetro YSI (modelo Y5512 YSI Inc., Yellow Springs, USA) e para pH, pHmetro (Hanna HI 8424). Os valores de amônia total foram verificados através do reagente de Nessler, segundo Jeffery et al. (1992), e os de nitrito, alcalinidade e dureza foram determinados através dos métodos descritos em Sipaúba-Tavares (1994). A água utilizada para a realização das análises foi sempre coletada antes da sifonagem. O abastecimento dos tanques foi de poço artesiano, sendo que a água era previamente aerada (no mínimo 24 h) antes da utilização.

2.4. Procedimentos de análise

Ao final do período experimental, foram coletados 20 exemplares de cada tratamento para análise, sendo 10 de cada caixa. Os peixes foram pesados e medidos no início e final do experimento para a estimativa dos parâmetros de crescimento. Foi verificado que o peso médio inicial dos peixes era 10,1g e o comprimento médio 10,6 cm. Após a pesagem, os animais foram puncionados na veia caudal para coleta de sangue e obtenção do plasma. Em seguida, foram sacrificados através de punção cerebral, e os tecidos (fígado, intestino,, músculo e cérebro), foram removidos para as análises de metabólitos e enzimáticas.

O conteúdo digestivo foi descartado e os respectivos órgãos homogeneizados com solução tampão Tris pH 7,0, utilizando-se homogenizador Potter-Elvehjem a 1000 x g durante 2 minutos e centrifugado a 1500 x g / 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados como fonte enzimática.

A atividade amilohidrolítica foi estimada segundo o método proposto por Bernfeld (1955), modificado por Vieira et al. (2005). A atividade da maltase foi estimada de acordo com o método proposto por Gioda et al. (2005). A atividade da

acetilcolinesterase foi ensaiada conforme descrito por Ellman et al. (1961) e modificado por Miron et al. (2005). Os intermediários metabólicos foram dosados conforme as metodologias a seguir: lactato (Harrower & Brown, 1972), glicose (Park and Johnson, 1994), proteína (Bradford, 1976) e glicogênio (Bidinotto et al., 1998).

2.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Como as variâncias foram sempre homogêneas, utilizou-se análise de variância de um fator, seguida do teste de Tukey, através do programa "Statistica". O nível mínimo de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$)

Resultados

A $CL_{50}(96-h)$ obtida foi 0,4 mg/L, com um intervalo de confiança compreendido entre 0,08 e 0,59. A presença de cobre nas concentrações testadas não interferiu no crescimento dos peixes (tabela 1).

A adição de cobre não alterou significativamente os níveis de glicogênio e glicose no fígado. No músculo o glicogênio foi menor nos jundiás expostos às duas concentrações, mas a glicose foi maior nos expostos a 0,04 e menor nos mantidos em 0,08 mg/L em relação ao controle. No plasma, o nível de glicose aumentou na concentração 0,04 mg/l em relação ao controle. O nível de lactato aumentou em fígado e músculo na concentração 0,04 mg/l e diminuiu em ambos os órgãos nos expostos a 0,08 mg/l, enquanto que no plasma houve aumento nos níveis dos expostos a 0,04 mg/l. A proteína diminuiu em ambas as concentrações no fígado e plasma, enquanto que no músculo ocorreu aumento nos mantidos em 0,08 mg/L (tabela 2).

A atividade da amilase foi menor nos juvenis expostos a ambas concentrações de cobre, quando comparadas ao grupo controle. A maltase teve uma atividade significativamente maior nos expostos a 0,04 mg/L que nos mantidos em condições de controle. Os peixes expostos à concentração de 0,08 mg/L não apresentaram

diferença significativa na atividade da enzima maltase quando comparados aos do grupo controle (tabela 3).

A atividade da AChE no cérebro dos peixes expostos ao cobre foi significativamente menor que os peixes controle. No músculo, a atividade da AChE não foi alterada pela exposição ao cobre (figura 1)

Tabela 1. Parâmetros de crescimento de alevinos de jundiás expostos a diferentes níveis de cobre na água por 45 dias. Comprimento inicial (CI), comprimento final (CF), peso inicial (PI), peso final (PF), biomassa total (BT), taxa de crescimento específico (G) e fator de condição (FC).

	cobre (mg/L)		
	0	0,04	0,08
CI (cm)	6,7 ± 1,19	7,2 ± 1,37	6,5 ± 1,23
CF(cm)	10,6 ± 0,44	11,2 ± 0,01	10,2 ± 0,01
PI (g)	4,4 ± 0,56	4,1 ± 0,67	3,9 ± 0,64
PF(g)	10,6 ± 2,14	11,2 ± 2,1	8,5 ± 2,33
BT(g)	149,6 ± 4,45	153,0 ± 3,35	124,0 ± 3,1
G (%/dia)	13,77 ± 3,7	15,77 ± 3,8	10,22 ± 3,2
FC (g/cm ³)	0,011 ± 0,1	0,009 ± 0,1	0,01 ± 0,1

Tabela 2. Metabólitos em fígado, músculo e plasma de jundiás expostos a diferentes níveis de cobre na água durante 45 dias. Glicogênio, glicose e lactato expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido e proteína em mg/g de tecido.

	cobre (mg/L)		
	0	0,04	0,08
FÍGADO			
Glicogênio	45,0 \pm 0,20 ^a	43,0 \pm 0,36 ^a	36,3 \pm 0,06 ^a
Glicose	26,2 \pm 1,10 ^a	26,1 \pm 0,53 ^a	26,3 \pm 2,37 ^a
Lactato	0,3 \pm 0,01 ^a	0,4 \pm 0,04 ^b	0,2 \pm 0,03 ^c
Proteína	79,2 \pm 6,32 ^a	52,5 \pm 0,52 ^b	42,8 \pm 2,63 ^b
MÚSCULO			
Glicogênio	2,1 \pm 0,01 ^a	1,8 \pm 0,33 ^b	1,9 \pm 0,46 ^b
Glicose	10,2 \pm 0,10 ^a	11,0 \pm 0,01 ^b	6,3 \pm 1,07 ^c
Lactato	0,2 \pm 0,01 ^a	0,2 \pm 0,0 ^b	0,1 \pm 0,01 ^c
Proteína	80,9 \pm 4,74 ^a	80,7 \pm 7,63 ^a	89,0 \pm 2,63 ^b
PLASMA			
Glicose	60,5 \pm 11,30 ^a	122,0 \pm 1,95 ^b	69,1 \pm 9,96 ^a
Lactato	2,1 \pm 0,90 ^a	4,8 \pm 0,48 ^b	2,3 \pm 0,39 ^a
Proteína	28,9 \pm 3,02 ^a	13,6 \pm 0,37 ^b	13,8 \pm 1,70 ^b

Os dados representam a média \pm erro padrão. Letras diferentes na linha indicam diferença entre os tratamentos por análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$), ($n=20$)

Tabela 3. Enzimas digestivas de jundiás, após 45 dias de exposição a diferentes concentrações de cobre na água.

Enzimas	Cobre (mg/L)		
	0	0,04	0,08
Amilase	6,01 ± 1,45 ^a	4,40 ± 0,39 ^b	4,81 ± 0,56 ^b
Maltase	35,7 ± 4,25 ^a	57,1 ± 5,25 ^b	47,2 ± 8,23 ^a

Os valores estão expressos com média ± erro padrão da média e a unidade é $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (n=8)

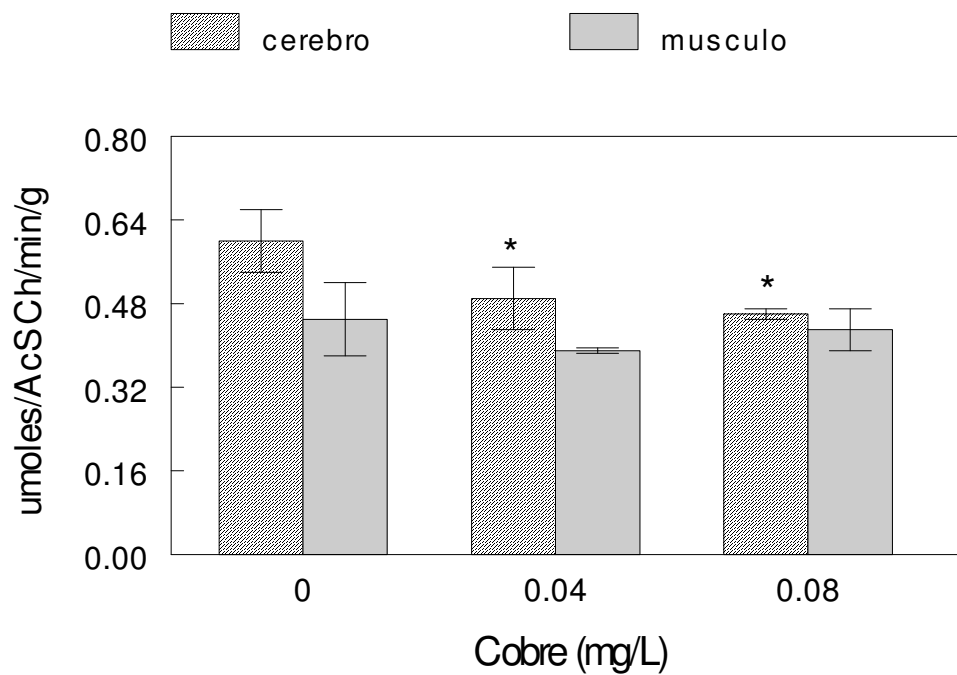


Figura 1. Atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo de jundiás expostos a diferentes concentrações de cobre por 45 dias. Os valores representam a média \pm erro padrão (n= 8). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Discussão

As alterações celulares podem ser medidas através de avaliações bioquímicas, que são ferramentas utilizadas para se verificar o estado geral de um organismo (Nemcsók et al., 1984; Pelgrom et al., 1995; Burden et al., 1998; McGeer et al., 2000; Roméo et al., 2000). Neste estudo os parâmetros avaliados foram o crescimento, a atividade de enzimas e índices metabólicos em peixes expostos ao cobre. Os parâmetros analisados, com exceção dos de crescimento, mostraram-se de uma maneira geral bastante sensíveis à presença deste metal na água.

O fígado, que pode ser considerado o centro de detoxificação do organismo, reage primeiro após estresse causado por agentes tóxicos (Sancho et al., 1998). Neste estudo, jundiás expostos ao cobre não mostraram redução significativa no glicogênio hepático nem na glicose nas concentrações testadas quando comparadas aos valores controle, mas as alterações observadas nos níveis de lactato nos tecidos hepático, muscular e no plasma indicam desordens metabólicas e uma resposta fermentativa às condições do meio. A proteína, no fígado, diminuiu em ambas as concentrações testadas, o que pode ser uma resposta à demanda de energia requerida nesta situação, já que a alta demanda energética leva à estimulação do catabolismo protéico (Sancho et al., 1998; Begum, 2004). A redução no glicogênio muscular observada nos jundiás pode indicar que o estresse causado pelo cobre é seguido de uma depleção do glicogênio muscular. Sancho et al. (1998) observaram a mesma resposta quando enguias foram expostas ao fenitrothion. Redução de glicogênio hepático e muscular depois de estresse causado por herbicidas e pesticidas já foi bem documentado por vários autores (Ghosh, 1987; Shobba et al., 1989; Sancho et al., 1998; Aguiar et al., 2004). Entretanto, o padrão da resposta para peixes expostos a metais é pouco conhecido .

No plasma, foi verificado um aumento significativo na glicose de jundiás expostos a 0,04 mg/L de cobre. De acordo com Pelgrom et al. (1995), a hiperglicemia é uma resposta comum ao estressor em peixes de água doce, indicando que o metabolismo dos carboidratos foi ativado devido a ação do cortisol,

A hiperglicemia, neste caso, é considerada como um indicador de poluição ambiental subletal.

A redução da proteína no plasma e tecidos de jundiás expostos ao cobre pode indicar uma aclimatação fisiológica do peixe para superar a situação de estresse causada por este metal. A exposição a tóxicos, como os herbicidas carbamatos, também causa hipoproteinemia generalizada em outras espécies (Sancho et al., 2000). De modo geral, as alterações nos parâmetros metabólicos observados parecem ser uma tentativa dos animais em se adaptar às condições adversas provocadas pela presença de cobre na água.

Kotorman et al. (2000) verificaram que a exposição ao cobre, isoladas do trato gastrointestinal e após incubação por 5 minutos, aumentou a atividade da tripsina e lipase e diminuiu a atividade da quimotripsina em *Cyprinus carpio L.*. Em nosso estudo, verificamos que houve uma diminuição na atividade da enzima amilase, o que pode indicar uma interferência do metal na digestão de carboidratos. O aumento na atividade da enzima maltase pode significar uma tentativa do organismo de aumentar o aproveitamento do alimento, compensando outras possíveis perdas, causadas pela intoxicação. Blier et al. (2002) sugerem que o crescimento pode ser determinado por vários fatores, entre eles: a atividade de enzimas digestivas, a disponibilidade de oxigênio para o metabolismo dos tecidos e a síntese de proteínas. Neste trabalho, os nutrientes oriundos da digestão foram disponibilizados, e não tiveram seu aproveitamento comprometido pela ação do metal, uma vez que em nenhum dos grupos ocorreu interferência no crescimento.

No presente estudo, um outro parâmetro verificado foi a atividade da enzima AChE. A atividade cerebral desta enzima reduziu nos peixes expostos a 0,04 e 0,08 mg/L de cobre quando comparados ao grupo controle. Nossos resultados estão de acordo com os verificados por Gioda et al. (2005), que verificou redução significativa na atividade da AChE em cérebro de piavas expostas durante 45 dias à concentração de 2,3 mg/L de sulfato de cobre dissolvido na água. Entretanto, exposição ao cobre, nestas mesmas concentrações, não causou alterações significativas na AchE no músculo de jundiás.

Em conclusão, as análises realizadas no presente estudo mostraram que a adição de cobre na água provocou alterações metabólicas e enzimáticas. As

respostas obtidas podem ser utilizadas como indicadores de toxicidade por cobre em jundiás, nos tecidos e concentrações testadas.

Referências

AGUIAR, L.H. DE; CORRÊA, C.F.; AVILEZ, I.M.;ALTRAN, A.E.; MORAES, G. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*.

Environmental

Research, v. 95: 224-230, 2004.

BARAK, N.A.E.; MASON, C.F. Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from Eastern England. **The Science of the Total Environment**, v. 92: 257-263, 1990.

BARRINGTON, E.J.W. The alimentary canal and digestion. In: Brown, M.E. The physiology of fish. New York: Academic Press, p. 109-161, 1957.

BERNFELD, P. Amylases α e β : colorimetric assay methods. In: Colowick, S.P.; Kaplan, N.O. **Methods in Enzimology**, v.1 New York: Academic Press, 1955.

BIDINOTTO, P.M.; MORAES, G.; SOUZA, R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico CEPTA**, v.10: 53-60, 1998.

BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of *Clarias batrachus* (Linnaeus) and recovery response. **Aquatic Toxicology**, v. 66: 83-92, 2004.

BENTLEY, P.J. et al. Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): uptake from external environmental solutions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101C: 215-217, 1992.

BLIER, P.U., et al. Is the growth of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissues? Insight from transgenic coho salmon. **Aquaculture**, v.

209:379-384, 2002.

BORDAJANDI, L.R.; GÓMEZ, G.; FERNÁNDEZ, M.A.; ABAD, E.; RIVERA, J.; GONZÁLEZ, M.J. Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). **Chemosphere**, v. 53: 163-171, 2003.

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

BURDEN, V.M.; SANDHEINRICH, M.B.; CALDWELL, C.A. Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Environmental Pollution**, v. 101: 285-289, 1998.

CELIK, U.; OEHLENSCHAGER, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. **Food Chemistry**, v.87: 343-347, 2004.

DE BOECK, G.; NILSSON, G.E.; ELOFSSON, U.; VLAEMINCK, A.; BLUST, R., Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. **Aquatic Toxicology**, v. 33: 265-277, 1995.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.J.R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7: 88-95, 1961.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge, England, Cambridge University Press. pp.333, 1971.

GIODA, C.R., SCHETINGER, M.R., SALBEGO, J. VIEIRA, V. Digestive enzyme activity in freshwater fishes with different feeding habits. **Aquaculture Nutrition**, in press, 2005

GHOSH, T.K.. Impact of grade hexagor and sumidon on behavior and some aspects of carbohydrate metabolism in fish *Cyprinus carpio*. **Journal Zoology**, v. 7: 48-62, 1987.

HARRIS, E.D. Basic and clinical aspects of copper. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 40(5): 547–586, 2003.

HARROWER, J.R.; BROWN, C.H., Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter sample. **Journal of Applied Phisiology**, v. 32(5): 224-228, 1972.

JEFFERY, G.H. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 1992.

JOBLING, M. **Fish Bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 309 pp., 1994.

KAPOOR, B.G.; SMITH, H.; VERIGHINA, I. A. The alimentary canal and digestion in teleosts. **Advances in Marine Biology**, v. 13:109-139, 1975.

KARAN,V.; VITOROVIC,S.; TUTUNDZIC, V.; POLEKSIC, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40: 49-55, 1998.

KOTORMAN, M.; LASZLO, K.; NEMCSOK, J.; SIMON, L. M. Cu , Pb and Zn on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Environmental Science and Health**. Part A , Toxic/..., 2000 – cat. Inist, fv.

MARR, J.C.A.; LIPTON, J.; CACELA D.; HANSEN, J.A.; BERGMAN, H.L.; MEYER, J.S.; HOGSTRAND, C. Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. **Aquatic Toxicology**, v. 36: 17-30, 1996.

McGEER, J.C.; SZEVEDINSZKY, C.; MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Ionoregulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**, v. 50: 231-243, 2000.

MIRON, D.S., VIEIRA, V.P.; BALDISSEROTTO, B. et al. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.61: 398-403, 2005.

NEMCSÓK, J.; NÉMETH, Á.; BUZÁS, ZS.; BOROSS, L. Effects of copper, zinc and paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 5: 23-3, 1984.

PAPAGIANNIS,I.;KAGALOU,I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAKOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment International**, v. 30: 357-362, 2004.

PARK, J.T., JOHNSON, M.J., A submicro determination of glucose. **Journal of Biologic Chemistry**. 181,149-151. 1994.

PELGROM, S.M.G.J.; LOCK, R.A.C.; BALM, P.H.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 32: 303-320, 1995.

RADÜNZ NETO, J. Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas e alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, 77 pp.,1981.**

ROMÉO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, v.48: 185-194, 2000.

SANCHO, E., FERRANDO, M.D., FERNÁNDEZ, C. AND ANDREU, E., Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 41, 168-175. 1998.

SANCHO, E., CERÓN, J.J., FERRANDO, M.D., Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 46, 81-86. 2000.

SCHLENK, D.; BENSON, W.H. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. London, v. 1, 2001.

SEIXAS FILHO, J.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; et al. Atividade de amilase em quimo de três espécies tropicais de peixe Teleostei de água doce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5: 907-913, 1999.

SHOBHA, R.J.V., VENKATESWARLU, P.V., JANAI AH, C. Changes in carbohydrate metabolism of *Clarias batrachus* (Linn.) when exposed to two organophosphorus insecticides. **Journal Environmental Biology** 10, 197-204. 1989.

SIPAUBA – TAVARES, L.H. **Limnologia Aplicada a Aquicultura**. Boletim tecnico 1. FUNEP : Jaboticabal, 120 pp., 1994.

SIRAJ BASHA, P.; USHA RANI, A. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56: 218-221, 2003.

TORRISSEN, K. R.; LIED, E.; ESPE, M. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. **Journal of Fish Biology**, v. 45(6): 1087-1104, 1994.

VIEIRA, V.L.P., INOUE, L.A.K., MORAES, G. Metabolic response of matrinxã (*Brycon cephalus*) to dietary protein level. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 140: 337-342, 2005.

5. CONCLUSÕES

Através dos resultados experimentais obtidos podemos chegar as seguintes conclusões:

1. A $CL_{50}(96-h)$ para cobre é 0,4 mg/L para alevinos de jundiá de ambos os sexos, com peso médio de 4g e tamanho médio de 7cm;
2. A exposição ao cobre por 45 dias nas concentrações estudadas não altera o crescimento nem interfere no ganho de peso de juvenis de jundiá;
3. Em geral, através dos parâmetros bioquímicos analisados, o jundiá mostrou-se sensível às concentrações de 0,04 e 0,08 mg/L de cobre durante os 45 dias de exposição. As alterações nos intermediários metabólicos indicam mecanismos de acomodação dos animais à sobrevivência em água contendo cobre;
4. As alterações na atividade das enzimas digestivas evidencia uma tentativa do organismo de aumentar o aproveitamento do alimento, compensando outras possíveis perdas causadas pela intoxicação.
5. A atividade da AChE cerebral foi alterada pela exposição às concentrações de metal na água, demonstrando que a atividade desta enzima neste órgão é um bom biomarcador para esta situação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria, Editora da UFSM, 212 pp., 2002.

BALDISSEROTTO, B. ; RADÜNZ NETO, J. (Org.). **Criação do Jundiá**. Santa Maria: **Editora da UFSM**, 232pp., 2004.

BARAK, N.A.E.; MANSON, C.F. Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from Eastern England. **The Science of the Total Environment**, v. 92: 257-263, 1990.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; DE SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; et al Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237: 229-236, 2004.

BARRINGTON, E.J.W. The alimentary canal and digestion. In: Brown, M.E. The physiology of fish. New York: Academic Press, p. 109-161, 1957.

BENTLEY, P.J. Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): uptake from external environmental solutions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101C: 215-217, 1992.

BORDAJANDI, L.R.; GÓMEZ, G.; FERNÁNDEZ, M.A.; ABAD, E.; RIVERA, J.; GONZÁLEZ, M.J. Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). **Chemosphere**, v. 53: 163-171, 2000.

CAMAKARIS, J.; VOSKOBOINIK, I.; MERCER, J.F. Molecular mechanisms of copper homeostasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 261: 225-232, 1999.

CAMPANA, O.; SARASQUETE, C.; BLASCO, J. Effect of on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, Kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55: 116-125, 2003.

CELIK, U.; OEHLENSCHAGER, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. **Food Chemistry**, v.87:343-347, 2004.

CHUIKO, G.M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127C: 233-242, 2000.

DAS, K.M., TRIPATHI, S.D. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). **Aquaculture**, v. 92:21-32, 1991.

DAUTREMEPUITS, C.; PARIS-PALACIOS, S.; BETOULLE, S.; et al. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. **Environmental Pollution**, v 109: 277-282, 2000.

DE SILVA, S. S. & ANDERSON, T. A. **Fish Nutrition in Aquaculture**. Ed. Chapman & Hall, 1995.

DETHLOFF, G.M.; SCHLENK, D.; HAMM, J.T.; BAILEY, H.C. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 42: 253-264, 1999.

FERNÁNDEZ-VEGA, C.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.72: 55-63, 2002.

GIODA, C.R.,SCHETINGER, M.R., SALBEGO, J. VIEIRA, V. Digestive enzyme activity in freshwater fishes with different feeding habits. **Aquaculture Nutrition**, in press, 2005

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C.; et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1: 179 – 185, 2000.

HAMILTON, D.P.; MALIK, D.S; SASTRY, K.V. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). **Environment International**, v. 24(4): 433-438, 1998.

HANDY, R.D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135A: 25-38, 2003.

HOGSTRAND, C.; WOOD, C.M. Mechanisms for zinc acclimation in freshwater rainbow trout. **Marine Environmental Research**, v. 39: 131-135, 1995.

HUSS, H.H. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Roma, **Colección FAO: Pesca**, n,29, 132 p., 1988.

JOBLING, M. Fish Bioenergetics. **Chapman & Hall**, London: 309 pp., 1994.

JOBLING, M. Environmental Biology of fishes. **Chapman & Hall**, New York: 455pp., 1995.

KARAN,V.; VITOROVIC, S.;TUTUNDZIC, V.; POLEKSIC, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40: 49-55, 1998.

KIKUCHI, K. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v.179:3 – 11. 1999.

LESEL, R., FROMAGEOT, C. LESEL, M. Cellulose digestibility in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, and gold fish, *Carassius auratus*. **Aquaculture**, v, 54: 11-17, 1986.

LOVELL, T. Nutrition and Feeding of Fish. **Chapman & Hall**, New York, 260p., 1989.

LIONETTO,M.G.;CARICATO,R.;GIORDANO,M.E.;PASCARIELLO,M.F;MARINOSCI ,L.;SCHETTINO,T.Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46: 324-330, 2003.

MANSOUR, S.A.; SIDKY, M.M. Ecotoxicological studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. **Food Chemistry**, v. 78: 15-22, 2002.

MARR, J.C.A.; LIPTON, J.; CACELA D., et al Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. **Aquatic Toxicology**, v. 36: 17-30, 1996.

MASSOULIE, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJEI, E.; VALETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progressive Neurobiology**, v. 41: 31-91, 1993.

MCGEER, J.C.; SZEBEDINSZKY, C.; MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 1: Iono-

regulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**, v. 50: 231-243, 2000.

MCGEER, J.C.; SZEBEDINSZKY, C; MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. **Aquatic Toxicology**, v. 50: 245-256, 2000.

MELO, J.F.B.; RADUNZ NETO, J.; SILVA, J.H.S.; et al. Desenvolvimento e composição corporal de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídios. **Ciência Rural** v. 32: 323-327, 2002..

MULLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Fishing News Books**, pp. 371, 1996.

NEMCSÓK, J.; NÉMETH, Á.; BUZÁS, ZS.; BOROSS, L. Effects of copper, zinc and paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 5: 23-3, 1984.

PANSERAT, S.; PLAGNES- JUAN, E.; KAUSHIK, S. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1579: 35-42, 2002.

PAPAGIANNIS, I.; KAGALOU, I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAKOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment International**, v. 30: 357-362, 2004.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, v. 50: 109-124, 2000.

PELGROM, S.M.G.J.; LOCK, R.A.C.; BALM, P.H.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 32 :303-320,1995.

RADÜNZ NETO, J. Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas e alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, 77 pp.,1981.**

RASHED, M.N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, v. 27: 27-33, 2001.

ROMANI, R.; ANTOGNETTI, C.; BALDRACCHINI, F.; et al. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145: 321-329, 2003.

ROMÉO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, v.48: 185-194, 2000.

SABAPATHY, U., TEO, L. H. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. British isles. **Journal of Fish Biology**, v. 42: 595-602, 1993.

SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; LAURENT, M.; COQUERY, M.; PORCHER, J.; AIT-AISSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.19: 177-183, 2004.

SCHLENK, D.; BENSON, W.H. **Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts**. London, v. 1, 2001.

SEIM, W.K., KURTIS, L.R., GLENN, S.W., CHAPMAN, G.A., Growth and survival of developing steelhead trout (*Salmo gairdneri*) continuously or intermittently exposed to copper. Can. J. Fish. **Aquat . Sci.** 41. 433 – 438,1984.

SEIXAS FILHO, J.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; et al. Atividade de amilase em quimo de três espécies tropicais de peixe Teleostei de água doce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5: 907-913, 1999.

SHARMA,M.C.; JOSHI, C.; PATHAK, N.N.; KAUR, H. Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. **Research in Veterinary Science**, v. 79: 113-123, 2005.

SIRAJ BASHA, P.; USHA RANI, A. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56: 218-221, 2003.

STEVENS, C.E. **Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System.** Cambridge: Cambridge University Press, 1988

TAYLOR, L.N., McGEER, WOOD, C.M., McDONALD, D.G., The physiological effects of chronic copper exposure to rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) in hard and soft water, an evaluation of chronic endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry** (in press) , 2000.

TENGJAROENKUL B., et al. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v.182: 317-327, 2000.

TORRISSEN, K. R.; LIED, E.; ESPE, M. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic Salmom (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. **Journal of Fish Biology**, v. 45(6): 1087-1104, 1994.

UGOLEV, A.M., KUZ'MINA, V.V. Fish Enterocyte Hydrolases: Nutrition adaptations, **Comparative Biochemistry Physiology**. V.107A: 187-193, 1994.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, v. 3, 2000.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v. 151: 185-207, 1997.

WHITFIELD, A.K.; ELLIOTT, M. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. **Journal of Fish Biology**, v. 60A: 1-21, 2002.