

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E
PESCA INTERIOR – BADPI

**EFEITO INTERATIVO DO COBRE E NÍQUEL EM DIFERENTES pH
EM JUVENIS DE *Colossoma macropomum***

PRISCYLLA DA MATA PAVIONE

**Manaus, Amazonas
Setembro, 2018**

PRISCYLLA DA MATA PAVIONE

**EFEITO INTERATIVO DO COBRE E NÍQUEL EM DIFERENTES pH
EM JUVENIS DE *Colossoma macropomum***

Orientador: Adalberto Luis Val, Dr.

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus, Amazonas

Setembro, 2018

P338 Pavione, Priscylla da Mata
Efeito interativo do cobre-níquel em diferentes pH em juvenis
Colossoma macropomum. --- Manaus: [s.n.], 2018.
40 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2018.
Orientador : Adalberto Luis Val.
Área de concentração : Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

1. Metais. 2. Enzimas. 3. Interação toxicológica. 4. Tabaqui. I. Título.

CDD 597.5041

Sinopse:

Este trabalho avaliou o efeito interativo do cobre e níquel em diferentes pH em juvenis de *C. macropomum*, usando diferentes mecanismos bioquímicos e fisiológicos para determinação da toxicidade dos metais. Foi observado que no pH4 a exposição ao cobre induz o aumento da hemoglobina, e o pH7, induz o aumento dos distúrbios hematológicos (hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular). Nota-se efeito do pH na atividade da Na^+/K^+ -ATPase com o aumento da atividade da enzima no tratamento cobre e inibição no tratamento com níquel no pH7 quando comparado com pH4, e no tratamento com a interação dos metais atividade foi inibida em ambos os pH. Os peixes mantidos em pH neutro foram mais suscetíveis a danos, como lipoperoxidação, e apresentaram respostas antioxidantes e neurotóxicas reduzidas.

Palavras-chaves: Metais, Enzimas, Tabaqui, Interação toxicológica.

Dedicatória

Aos meus pais Isaura e Roberto (*in memmorian*) e irmãos que sempre me apoiaram e me incentivaram a continuar, pois eles fazem parte direta e indiretamente na realização desse grande sonho.

Agradecimentos

Pensar sobre o percurso é a melhor forma de agradecer a tantas pessoas que caminharam junto comigo durante esses dois anos. Tenho poucas certezas, mas uma delas é a de que cheguei aqui por não estar sozinha. A trajetória foi difícil, às vezes branda, às vezes agitada, mas revelou que em alguns momentos o ficar comigo era necessário; noutros o ficar com familiares, amigos, colegas e pesquisadores era muito importante. A colaboração surgiu por meio de caminhos diferentes. As pessoas responsáveis por essa etapa, certamente, lotariam esta página.

Ao Dr. Adalberto Luis Val, e a Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida-Val pela orientação, amizade, paciência, confiança, estímulo e, principalmente, por terem acolhido eu e minha irmã com imenso carinho.

A minha família por todo apoio e compreensão, em especial meus irmãos Alice e Robert, minha tia Rita.

A todos os membros do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular por me ajudarem a manter o foco e equilíbrio, por todos os momentos de descontração e alegria. Em especial a incansável a Maria de Nazaré Paula da Silva e Alzira Miranda não apenas pelo suporte técnico, mas pela amizade, convivência, puxões de orelha e conselhos dados durante esses dois anos.

Aos amigos Renan, Samara, Vinicius, Thayana, Jessica, Danilo, Luiz, Vanessa, Arlan, Karina, Jhonathan e Jaqueline, pela instável ajuda em todos os processos desse trabalho. Menção especial deve ser feita aos meus sempre amigos e irmãos Ricardo, Kenio, Bruno, Flávio, Felipe, Lara, Tamires e Viviane. Agradeço também a todos os amigos que fiz na turma de mestrado do BADPI/2016 que me acolheram, apoiaram e ajudaram nessa árdua caminhada. Agradeço a todos os meus colegas que ajudaram nessa trajetória.

As meninas da secretaria do LEEM, Dona Raimunda, Raquel e Claudinha, por todo suporte administrativo e pela convivência e amizade. Aos técnicos Rogerio e Reginaldo, pelo apoio técnico, amizade e conselhos. A dona Val e Claudinha pelo carinho, amizade e por doar seu ombro e conselhos sempre que foi preciso.

Aos membros do Laboratório de Química Analítica Ambiental, em especial ao Dr. Ézio Sargentini e ao Msc. Marcos Bolson por terem me ajudado com as análises de metais, me ensinando também a técnica.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior (BADPI) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. A coordenadora Cláudia, por sua disponibilidade, auxílio e amizade. E dona Elci, secretária do programa por sua disponibilidade e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, 062.1187/2017) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 465540/2014-7) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Adaptações da Biota Aquática da Amazônia (INCT-ADAPTA II), pelo apoio financeiro.

À Secretaria de Produção Rural do Amazonas, pela obtenção dos peixes.

Epigrafe

“Olhamos as montanhas e dizemos que são eternas, e é o que parecem ser... Mas no correr do tempo, montanhas erguem-se e ruem, rios mudam de curso, estrelas caem do céu, e grandes cidades afundam-se no mar. Tudo muda” (George R.R., 2013)

RESUMO

O cobre (Cu) e o níquel (Ni) têm alcançado os ecossistemas aquáticos por meio de diferentes fontes, como atividades de mineração, lixiviação das culturas agrícolas e efluentes domésticos. No ambiente, esses metais podem interagir com outros metais e fatores, como: pH, alcalinidade, dureza da água e outros. Considerando as variações de pH que podem ocorrer no ambiente, naturalmente ou não, e a crescente demanda por Cu e Ni nos mais diferentes segmentos industriais, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos toxicológicos da exposição ao Cu, Ni e interação destes em diferentes pH, sobre marcadores bioquímicos e fisiológicos em juvenis de *Colossoma macropomum*. Para tanto, 64 juvenis de *C. macropomum* foram expostos a quatro tratamentos, com 8 animais cada: Controle (sem adição de metais); Cobre, Níquel, associação Cu + Ni, em pH 4 e 7, por 96 horas. No experimento foi observado efeito significativo do pH, com o aumento da hemoglobina, catalase e lipoperoxidação e diminuição das atividades da superóxido dismutase e acetilcolinesterase em pH7. A atividade da H⁺-ATPase foi inibida pela exposição ao Cu e associação Cu+Ni em pH4. A atividade da Na⁺/K⁺- ATPase foi inibida nos tratamentos Ni, associação Cu+Ni e Cu no pH7; a associação Cu+Ni inibiu a atividade da enzima em ambos os pH. Na série vermelha foi observado que o Cu foi mais tóxico em pH4, e Cu+Ni foi mais tóxico em pH7. Além disso, nota-se que a lipoperoxidação e atividade da acetilcolinesterase possuem uma relação inversa. Estes resultados indicam que as respostas antioxidantes, neurotóxicas e danos são influenciados pelo pH da água. Além disso, a inibição no tratamento com a associação Cu+Ni em ambos pH na atividade da Na⁺/K⁺- ATPase evidencia efeito antagônico da combinação dos metais.

Palavras-chaves: Metais, Enzimas, Tambaqui, Interação toxicológica.

ABSTRACT

Copper (Cu) and nickel (Ni) reach aquatic ecosystems through different sources, such as mining activities, leaching of agricultural crops, and household effluents. In the environment, these metals may interact with other metals and factors, such as: pH, water hardness and others. Considering the pH variations that may occur in the environment, naturally or not, and the increasing demand for Cu and Ni in the most different industrial segments, the objective of this study was to evaluate the toxicological effects of exposure to Cu and Ni and their interaction in different pH, on biochemical and physiological markers of juveniles of *Colossoma macropomum*. For this, 64 juveniles of *C. macropomum* were exposed to four treatments, with 8 animals each: Control (without addition of metals); Cu, Ni, Cu + Ni association at pH 4 and 7, for 96 hours. In the experiment, a significant effect of pH was observed, with increased hemoglobin, catalase and lipoperoxidation and decreased activities of superoxide dismutase and acetylcholinesterase at pH7. The activity of H⁺-ATPase was inhibited by exposure to Cu and Cu + Ni association at pH4. The Na⁺/K⁺-ATPase activity was inhibited in the Cu, Ni, Cu + Ni treatments at pH7; the Cu + Ni association inhibited enzyme activity at both pH. For blood red series it was observed that Cu was more toxic at pH4, and Cu + Ni was more toxic at pH7. In addition, it is noted that lipoperoxidation and acetylcholinesterase activity have an inverse relationship. These results indicate that antioxidant, neurotoxic and damage responses are influenced by water pH. In addition, the inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity in the treatment with the Cu + Ni association in both pH evidences an antagonistic effect of the combination of the metals.

Keywords: Metals, Enzymes, Tambaqui, Toxicological interaction.

SUMARIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL	6
Objetivos específicos	6
CAPÍTULO UNICO	7
EFEITO INTERATIVO DO COBRE E NÍQUEL EM DIFERENTES pH EM JUVENIS DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i> CUVIER, 1818)	7
1. Introdução.....	7
2. Materiais e Métodos	9
2.1. Animais experimentais	9
2.3. Aclimação ao pH.....	9
2.4. Exposição Experimental.....	9
2.5. Parâmetros hematológicos	10
2.6. Análises de íons na água e plasma.....	10
2.7. Enzimas ionorregulatórias	11
2.8. Enzimas oxidantes e Peroxidação lipídica	11
2.9. Acetilcolinesterase	13
2.10. Análises estatísticas.....	13
3. Resultados	13
3.1. Hematologia e íons plasmáticos	14
3.2. Enzimas ionorregulatórias	14
3.3. Respostas antioxidantes, dano oxidativo e acetilcolinesterase.....	14
4. Discussão.....	15
Conclusão.....	18
Referências	19
ANEXO I – Caracterização elementar	37

Lista de Tabelas

Tab. 1. Parâmetros físico-químicos da solução experimental contendo cobre, níquel e associação dos dois metais (mix), em pH4 e pH7, para exposição de *Colossoma macropomum*. Os dados são apresentados como média \pm SE (n=8, em cada tratamento). * representa diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados com o controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).26

Tab. 2. Parâmetros sanguíneos e bioquímicos de *Colossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix), em diferentes pH. Os dados são apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). * representa diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados com o controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas de comparações dos mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).27

Lista de figuras

- Fig. 1.** Atividade da H^+ -ATPase de *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados são apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). * representa diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados com o controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).28
- Fig. 2.** Atividade da Na^+/K^+ - ATPase de *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). * representa diferenças estatísticas dos tratamentos comparados com controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).29
- Fig. 3.** Atividade da Glutationa Peroxidase de *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).30
- Fig. 4.** Atividade da Catalase em *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados são apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). Os símbolos * representa diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados com o controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).31
- Fig. 5.** Atividade da Glutationa Peroxidase de *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). Os símbolos * representa diferenças estatísticas dos tratamentos comparados com controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).32
- Fig. 6.** Atividade da Glutationa s-transferase de *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). Os símbolos * representa diferenças estatísticas dos tratamentos comparados com controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).33
- Fig. 7.** Lipoperoxidação de *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). O símbolo # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).34
- Fig. 8.** Atividade da acetilcolinesterase em *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os

dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). O símbolo # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).35

Fig. 9. Relação da atividade da acetilcolinesterase com a lipoperoxidação. 4 e 7 no centro do gráfico representam os tratamentos em pH 4 e pH 7 ($r^2=0,96$; $p=0,00$).36

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui jazidas minerais, algumas delas de relevância internacional. Nelas são encontrados 72 minerais, destes 23 são metálicos, 45 não metálicos e 4 energéticos (Instituto Brasileiro de Mineração, 2015). Em 2015, a produção mineral no país apresentou crescimento de 6,3% no segundo semestre, estando relacionado principalmente com as extrações de ferro, cobre, níquel, alumínio e cromo (Ministério de Minas e Energia, 2015). Na Amazônia, são extraídos estanho, cobre, níquel, ouro, manganês e alumínio, sendo que a maior parte da extração desses minerais ocorre no estado do Pará (Instituto Brasileiro de Mineração, 2015).

Em relação ao níquel, o Brasil ocupa a sétima posição (Barrera, 2016) sendo que os estados de Goiás e Pará concentram mais de 80% dessas reservas e os maiores e os mais importantes depósitos econômicos (Ministério de Minas e Energia, 2015). O Ni tem sido utilizado na fabricação de baterias, ligas metálicas, e fundição. Durante a extração e processamento do Ni também são produzidos outros metais, tais como: cobre, cobalto e outros. Para cobre (Cu), a produção brasileira é a terceira maior do mundo (Vale, 2018). Na região Amazônica as principais atividades que podem aumentar o aporte deste metal no meio ambiente são a mineração de metais e de petróleo (Duarte et al., 2009). Além disso, o Cu tem sido utilizado no controle de pragas na aquicultura e na agricultura. O aumento das concentrações desses minerais em ambientes aquáticos (mares, rios, lagoas) causam diversos efeitos sobre os organismos e tem sido um assunto de preocupação por muitas décadas (Svecevičius et al., 2012).

De forma geral, os organismos não são expostos a uma única substância, mas sim a misturas dessas substâncias (Kienle et al., 2009; Svecevičius et al., 2012). Nesse sentido, existem diferentes conceitos para descrever os efeitos tóxicos combinados de compostos. Em relação a concentração, o conceito se baseia na semelhança de ação dos componentes de uma mistura sobre o mesmo alvo. Nesse caso, a toxicidade continua constante quando um composto é substituído, parcial ou completamente, por uma quantidade igual do outro composto. Este conceito pode também ser aplicado quando os poluentes apresentam diferentes modos de ação, mas ainda assim possuem efeitos toxicológicos comuns, como por exemplo, mortalidade ou inibição da reprodução. O outro conceito é utilizado para descrever toxicidade de mistura. Neste caso o efeito é independente da ação e baseia-se no pressuposto de que as substâncias possuem diferentes alvos nos organismos. Esses metais mostram modos

"distintos" de ação, podendo ser “sinérgico” onde o efeito final é maior que a soma dos efeitos individuais, ou “antagônico” onde uma substância compete com a outra (Escher e Hermens, 2002; Kienle et al., 2009). No ambiente natural, os peixes são expostos a várias misturas de substâncias tóxicas. Portanto, é muito importante avaliar a toxicidade de misturas para melhor compreender o modo de ação (Svecevičius et al., 2012).

O Cu em baixas concentrações é um importante elemento para os organismos e está envolvido com vários processos fisiológicos e bioquímicos (Duarte et al., 2009; Wood et al., 2015). As propriedades redox do Cu, que servem como cofator para enzimas, podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Wood et al., 2015). A formação das ERO culmina em estresse oxidativo. Em peixes neotropicais ocorre aumento de danos no DNA e lipoperoxidação, bem como distúrbios na regulação iônica e mudanças no comportamento (Braz-Mota et al., 2016; Oost et al., 2003). Os efeitos do Cu podem variar dependendo da espécie, das características físico-químicas da água e de sua concentração (Braz-Mota et al., 2016; Matsuo et al., 2004). Inibição de acetilcolinesterase, inibição na atividade natatória (Tilton et al., 2011) e danos celulares na linha lateral (Hernández et al., 2006) também são atribuídos à exposição ao Cu.

A forma dominante do Cu em pH neutro e ácido é Cu^{+2} , mas outras formas também podem ser encontradas na natureza como o hidróxido de cobre, encontrado em pH alcalino. Alguns elementos podem diminuir a toxicidade do mesmo, como o sódio (Na^+), que em altas concentrações reduz a absorção do Cu pois competem pelo mesmo sitio de ligação, reduzindo dessa forma o estresse oxidativo causado pelo Cu (Wood et al., 2015); o cálcio (Ca^{+2}), em altas concentrações protege contra a toxicidade aguda, reduzindo a absorção do Cu, sabe-se que Cu pode deslocar o Ca^{+2} nas junções paracelulares do epitélio branquial, competindo pelo mesmo sitio de ligação do Ca^{+2} , podendo diminuir a permeabilidade das brânquias (Laurén e McDonald, 1985; Paquin et al., 2002); e prótons (H^+), em pH6 o Cu^{2+} compete pelo mesmo sitio de ligação do H^+ no epitélio branquial, reduzindo a absorção Cu (Laurén e McDonald, 1985; Wood et al., 2015).

O Ni é um elemento importante para microrganismos, plantas e animais, sendo um constituinte de várias enzimas e outras proteínas (Palermo et al., 2015), presente em baixas concentrações. A exposição crônica ao Ni tem se mostrado nocivo aos organismos (Kienle et

al., 2009), sendo considerado potencialmente perigoso devido a sua genotoxicidade, imunotoxicidade e mutagenicidade (Zheng et al., 2014).

A forma dominante do níquel é Ni^{2+} , mas outras formas também existem como complexos, com sulfato e cloreto. Em águas doces, sua especiação é dependente de fatores como pH, tipo e concentração de ligante, temperatura, dureza (por exemplo, cálcio e magnésio) e outros cátions (Binet et al., 2018; Holland et al., 2017; Wood et al., 2015).

A toxicidade dos compostos de Ni tem sido extensivamente estudada em organismos modelo de mamífero e culturas de células. No entanto, menos atenção tem sido dada a peixes (Zheng et al., 2014). Embora os mecanismos de toxicidade não sejam claros, há evidências de que possam causar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de inibir a atividade de enzimas antioxidantes em tecidos de peixes (Kienle et al., 2008; Palermo et al., 2015). Palermo et al. (2015) mostram que o aumento do Ni nos órgãos de *Prochilodus lineatus* induz a síntese metalotioneína, afetando formação de ERO e aumentando a peroxidação lipídica.

O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a atuação dos sistemas de defesas antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos), podendo causar lesões como a peroxidação lipídica (LPO), que consiste na oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular. A LPO resulta em alterações na permeabilidade da membrana, promovendo distúrbios no fluxo iônico e na seletividade de nutrientes, o que posteriormente pode resultar no rompimento da membrana (Halliwell, 2006).

Os radicais livres são formados em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos de defesas antioxidantes celulares, que são os responsáveis pela inibição e/ou redução das lesões causadas pelas ERO. Essas defesas antioxidantes podem ser classificadas como enzimáticas e não enzimáticas, de acordo com sua estrutura biológica (Oost et al., 2003).

Entre as defesas enzimáticas, destacam-se: i) superóxido dismutase (SOD, EC1.15.1.1), que catalisa a conversão do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2); ii) a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) que catalisa a redução do H_2O_2 em água e O_2 ; iii) a glutatona peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) que catalisa a conversão de H_2O_2 e outros peróxidos (Oost et al., 2003; Palermo et al., 2015); iv) e a glutatona S-transferase (GST, EC 2.5.1.13) enzima de

biotransformação (Nordberg e Arnér, 2001) cuja atividade pode reduzir ou evitar que ocorra o estresse oxidativo devido à metabolização de vários substratos hidrofóbicos e eletrolíticos (Oost et al., 2003).

Além das alterações nas enzimas de estresse oxidativo a presença desses metais pode causar efeitos na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e, como citado acima, pode causar distúrbios ionoregulatórios. A AChE é uma enzima de interação neural que atua na regulação dos impulsos nervosos até as sinapses colinérgicas (Oost et al., 2003). A presença de metais, associados a contaminação podem inibir a atividade da AChE. Sua inativação provoca acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas, resultando em disparos nervosos contínuos e excessivos, provocando paralisia e morte (Kim e Kang, 2016; Solé et al., 2008).

A regulação iônica e osmótica é essencial para a vida. Nos peixes, as brânquias são os principais órgãos de troca iônica. Possuem células envolvidas na captação de íons Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} e H^+ nos peixes de água doce para a manutenção da homeostase iônica. Essas células possuem grande quantidade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA, EC 3.6.3.9) e H^+ -ATPase (EC 3.6.3.6), que estão intimamente relacionadas com as trocas iônicas do organismo com o meio. A NKA é uma enzima transmembrana responsável pela manutenção do volume celular e da pressão osmótica, uma vez que é responsável pelo transporte ativo dos íons Na^+ e K^+ e, conseqüentemente, pela manutenção do gradiente eletroquímico entre os meios intra e extracelular (Kültz e Somero, 1995).

A enzima H^+ -ATPase consiste em uma bomba de prótons que, a partir da hidrólise do ATP é capaz de transportar íons H^+ do meio intracelular para o meio extracelular (Kültz e Somero, 1995). Estudos mostram que a atividade da enzima nas brânquias pode alterar em função do pH (Wood et al., 2017) e presença de metais como Cu (Braz-Mota et al., 2018).

As variações de pH nos ecossistemas aquáticos parecem influenciar a fisiologia de diversos organismos; por exemplo, o aumento ou diminuição do pH pode causar distúrbios no balanço ácido-base, regulação iônica e excreção de amônia (Aride et al., 2007; Gonzalez et al., 1998; Wood et al., 2017). Aride et al. (2007), por exemplo, relataram mudanças nos parâmetros hematológicos em tambaqui (*Colossoma macropomum*) associados a mudanças de pH.

Os rios da região amazônica são caracterizados em três diferentes tipos de água: barrenta ou branca, preta e clara. Rios de água branca, como Rio Solimões, possuem alta quantidade de sólidos suspensos, pH próximo ao neutro e quantidade elevada de íons quando comparada com os demais tipos. As águas pretas, como as do Rio Negro, têm baixa concentração de íons e sedimentos, pH ácido e apresentam uma grande quantidade de ácidos húmicos e fúlvicos, responsáveis pela coloração escura dos rios. As águas claras apresentam grande quantidade de minerais e menor quantidade de ácidos húmicos e fúlvicos quando comparada com as águas pretas, mas assim como estas, sua concentração de íons e sedimentos é baixa (Araújo et al., 2017; Furch, 1984; Holland et al., 2017; Val e Almeida-Val, 1995). A região amazônica ainda apresenta uma variedade de planícies inundáveis que variam de nível ao longo das estações seca e chuvosa. Durante as cheias dos rios há grande quantidade de matéria orgânica presente nesses locais, as quais são rapidamente decompostas, acidificando a água e reduzindo os níveis de oxigênio dissolvido (Junk et al., 1989).

Algumas espécies de peixes amazônicos desenvolveram adaptações específicas para suportar estas variações, permitindo que as mesmas explorassem esses ambientes, como por exemplo *Triplocheilichthys albus*, espécie que vive nos diferentes tipos de água e apresenta plasticidade fenotípica para cada tipo de água, regulando a expressão de genes que ajudam a manter a homeostase iônica de acordo com as características físico-químicas de cada ambiente (Araújo et al., 2017). Outro exemplo é *C. macropomum* que vive em rios de águas barrentas e nas partes baixas dos tributários de águas claras e preta, apresentando adaptações favoráveis para sobreviver nesses ambientes (Wood et al., 2017).

Considerando que *C. macropomum* habita ambientes dinâmicos com atividades antropogênicas e uma série de estudos reunirem informações sobre respostas fisiológicas e bioquímicas ao pH (Aride et al., 2007; Wood et al., 2017, 1998) e a metais (Matsuo et al., 2005), a literatura não analisa os efeitos interativos de poluentes à variações de pH. Portanto, elucidar questões sobre os mecanismos de respostas a contaminantes torna-se importante para o embasamento de futuras ações mitigadoras que visem à manutenção e melhor conservação da biodiversidade amazônica.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito interativo do cobre e níquel em diferentes pH sobre marcadores bioquímicos e fisiológicos em juvenis de *Colossoma macropomum*.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito interativo do cobre e níquel em diferentes pH sobre parâmetros hematológicos em *C. macropomum*;
- ✓ Verificar o efeito interativo do cobre e níquel em diferentes pH sobre a homeostase iônica de juvenis de *C. macropomum*;
- ✓ Avaliar o efeito interativo do cobre e níquel em diferentes pH sobre as respostas dos sistemas de defesas antioxidantes em juvenis de *C. macropomum* e determinar os efeitos sobre a produção de hidroperóxidos lipídicos em juvenis de *C. macropomum*;
- ✓ Avaliar a resposta colinérgica em juvenis de *C. macropomum* exposto à associação de cobre e níquel.

CAPÍTULO UNICO

EFEITO INTERATIVO DO COBRE E NÍQUEL EM DIFERENTES pH EM JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818)

Manuscrito a ser submetido a Revista Environmental Pollution

1. Introdução

Na região Amazônica, os desafios podem ser tanto naturais quanto antropogênicos. Em relação aos desafios naturais, as planícies inundáveis da região amazônica, possuem duas estações bem definidas, seca e chuvosa, sendo que o alto nível das águas e grande quantidade de matéria orgânica resultam no aumento da decomposição, reduzindo os níveis de oxigênio dissolvido na água e o pH (Junk et al., 1989). Além das variações naturais na região, as espécies locais estão sujeitas a variações de impactos antropogênicos, tais como mineração (Ministério de Minas e Energia, 2015), desmatamento e represamento para usinas hidrelétricas (Val et al., 2016). As atividades antropogênicas estão entre os principais fatores determinantes para o aumento das concentrações de metais nos corpos d'água, prejudicando a saúde dos organismos aquáticos, incluindo peixes e por conseguinte, o próprio homem (Blewett et al., 2016; Driessnack et al., 2017; Duarte et al., 2010; Holland et al., 2017).

Os ecossistemas aquáticos contaminados por metais são quase sempre expostos a mais de um tipo de contaminante. No entanto, estudos realizados para compreensão dos efeitos prejudiciais da exposição a esses contaminantes são, principalmente, realizados com metais individuais. As interações dos metais podem influenciar sua absorção e metabolismo, o que pode eventualmente amplificar toxicidade (Driessnack et al., 2017; Escher e Hermens, 2002; Kienle et al., 2009; Svecevičius et al., 2012).

O cobre (Cu) e o níquel (Ni) são metais que exibem um alto grau de liberação natural e antropogênica nos ecossistemas aquáticos. Há evidências de que eles podem desencadear a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e inibir a atividade das enzimas antioxidantes em peixes (Braz-Mota et al., 2018; Palermo et al., 2015; Zheng et al., 2014). Além dos efeitos relatados, estudos demonstram que níveis mais elevados de Cu causam acúmulo do mesmo no epitélio olfatório (Tierney et al., 2010; Wood et al., 2015), efeitos em marcadores de estresse

oxidativos (Braz-Mota et al., 2018; Simonato et al., 2016) e inibição de enzimas ionoregulatórias (Braz-Mota et al., 2018; Wood et al., 2015). Sabe-se que o Ni em altas concentrações pode causar comprometimento ionoregulatório, inibição da respiração e promoção de estresse oxidativo (Blewett et al., 2016; Blewett e Leonard, 2017).

O mecanismo de ação do Cu está relacionado com a homeostase do sódio (Na^+), afetando seus mecanismos de transporte ativo. Por outro lado, o Cu também pode afetar o controle paracelular, aumentando a perda iônica por difusão, causando redução dos níveis plasmáticos e corpóreos de outros íons, como (Calcio) Ca^{2+} e Cloreto (Cl^-) (Matsuo et al., 2004; Wood et al., 2015). Embora, sua absorção seja reduzida na presença de Na^+ , interações competitivas são observadas. A toxicidade reduzida na presença de Na^+ pode estar relacionada com captação reduzida do metal e/ou proteção fisiológica (Wood et al., 2015); o mesmo mecanismo é sugerido para a redução da toxicidade na presença de Ca^{2+} (Matsuo et al., 2004) e prótons (H^+) (Laurén e McDonald, 1985). O H^+ desloca o Ca^{2+} nas junções intercelulares do epitélio branquial e sabe-se que o Cu também pode deslocar o Ca^{2+} , já que o Cu possui afinidade pelos mesmos sítios, podendo assim ocorrer competição do metal pelos mesmos sítios de ligação do H^+ e do Ca^{2+} (Laurén e McDonald, 1985). Estudos mostram que a especiação do Ni pode ser controlada por pH (Holland et al., 2017), salinidade (Blewett et al., 2016), alcalinidade e dureza (Binet et al., 2018; Wood et al., 2015). Entretanto, os mecanismos de transporte epitelial de Ni ainda não estão bem caracterizados. A captação do metal pode ocorrer por meio do mimetismo iônico, onde os metais podem ser transportados por vias projetadas para absorver íons, como Na^+ e Ca^{2+} . Ao contrário do Cu, que possui vias claras de absorção, a absorção de Ni ainda não está bem esclarecida. Há evidências de que o Ni interage com os sistemas de transporte de Ca^{2+} e magnésio (Mg^{2+}) em algas e ratos; entretanto, não há nada evidenciado para peixes (Blewett e Leonard, 2017; Palermo et al., 2015; Wood et al., 2015).

Os peixes amazônicos possuem adaptações para viver em seus diversificados ambientes e as principais adaptações para espécies que são encontradas nos três tipos de água estão relacionadas ao baixo pH e a concentração iônica, como descrito para a sardinha que modula a expressão de genes relacionados à homeostase iônica e à permeabilidade da membrana (Araújo et al., 2017). O tambaqui (*Colossoma macropomum*), nativo das bacias hidrográficas do rio Orinoco e Amazonas, é extensivamente explorado na pesca extrativista e na aquicultura e é considerado modelo de espécie neotropical para estudos de fisiologia e bioquímica. A

espécie é particularmente resistente às condições hipóxicas e águas ácidas típicas da região amazônica. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito toxicológico do Cu, do Ni e da interação desses dois metais em diferentes pH, sobre marcadores bioquímicos e fisiológicos em juvenis de *C. macropomum*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais experimentais

Os juvenis de *C. macropomum* (n=64; 26,41 ± 4,05 g) foram adquiridos da Estação de Piscicultura de Balbina, pertencente à Secretaria de Estado de Produção Rural (SEPROR), no Estado Amazonas e transportados até o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). No laboratório os animais foram aclimatados em tanques de 300 L contendo água de poço: Ca²⁺ 5,25 mg/L; Mg²⁺ 0,49 mg/L; K⁺ 6,16 mg/L; Na⁺ 2,31 mg/L; Cl⁻ 772,87 mg/L; temperatura 27,29 °C e oxigênio 6,3 mg/L. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob o número de registro n°017/2017, conforme com o regulamento nacional de cuidados com animais.

2.3. Aclimação ao pH

Para a aclimação ao pH, foram utilizadas quatro caixas com 30L (n=16 animais por caixa) de água com aeração constante, temperatura controlada (28,02 ± 0,2 °C), e troca de água parcelada (25%). Antes do início da aclimação ao pH os peixes foram aclimatados durante 24 horas nas caixas. Após o período de aclimação o pH foi reduzido gradativamente durante 48 horas adicionando ácido sulfúrico 0,03 N (H₂SO₄) para o grupo pH 4,0 (4,1 ± 0,2) e hidróxido de potássio (KOH) a 1 mM para pH 7,0 (7,3 ± 0,3), cada grupo com duas caixas. Quando o pH desejado foi atingido, os peixes foram mantidos para aclimação nestas condições durante 4 dias. O procedimento de ajuste do pH foi realizado durante todo o período experimental, o mesmo foi aferido com pHmetro (modelo 60-10FT YSI), sendo os níveis de oxigênio e temperatura medidos por meio de uma sonda multiparâmetro (modelo 85-10FT YSI).

2.4. Exposição Experimental

Para o ensaio de toxicidade, em cada aquário foram preparados 4 L de água com pH 4 ou 7 de mesma origem da água de aclimação. Quatro grupos foram usados (n=8) para cada pH: grupo controle contendo apenas água com pH controlado; grupo experimental Cu com 0,53 mg/L ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); grupo experimental Ni com 4,49 mg/L ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e grupo mistura (Mix) com Cu 0,240 mg/L e Ni 2,68 mg/L, expostos a 96 horas. As concentrações usadas foram baseadas em testes de CL_{50} (Yasmin Tavares Dantas; Ana Cristina Leite Menezes, comunicação pessoal). As soluções foram adicionadas nos aquários 48 h antes dos peixes para que estivessem estáveis durante o experimento (Blewett et al., 2016). O experimento foi realizado com troca de água e aeração constantes. Foram realizadas coletas diárias de 7 ml de água dos aquários para análise de íons e da concentração real dos metais nas soluções experimentais (Tab. 1). Após 96 horas de experimento, os peixes foram anestesiados com MSS-222 (0,5 mg/L) para a coleta das amostras de sangue e tecidos para posterior análises.

2.5. Parâmetros hematológicos

As amostras de sangue foram coletadas dos peixes por venopunção do vaso localizado na região caudal com auxílio de seringas heparinizadas (heparina com base lítio). Logo após a retirada do sangue, as amostras foram armazenadas em microtubos e mantidas em gelo. Aliquotas de sangue de 10 μL foram retiradas e adicionadas em 2 mL de solução de formol-citrato e Drabkin para a contagem de eritrócitos (RBC) e dosagem de hemoglobina (Hb), respectivamente. Pelo método do microcapilar foi quantificado o hematócrito (Ht %). As constantes corpusculares, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)) foram determinadas a partir dos valores correspondentes ao número de eritrócitos circulantes, ao hematócrito e à concentração de hemoglobina, de acordo com o proposto por Brow (1976).

2.6. Análises de íons na água e plasma

Para análise de íons plasmáticos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , Na^+ , Cu, e Ni), o sangue foi centrifugado, o plasma sanguíneo (n=8) separado em microtubos e armazenados a -4°C . No momento das análises, as amostras de plasma foram diluídas 100x em solução deionizada e adicionado ácido nítrico a 1% para a abertura das amostras. As amostras de água foram congeladas e no momento da análise as mesmas foram mantidas em temperatura ambiente.. As concentrações de (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cu e Ni) foram determinadas por espectrometria de emissão atômica com plasma (Thermo Scientific iCAP 7600 ICP-OES) (ANEXO I). Todas

as amostras foram lidas em triplicata, e comparadas usando um padrão de espectroscopia atômica Perkin Elmer Pure Inorganic Aqueous (N9300224), como referência.

Para análise do Cl^- foi utilizado o método colorimétrico descrito por Zall et al. (1956), o plasma foi diluído 1000x em água deionizada e as amostras de água foram mantidas congeladas até o momento das análises.

2.7. Enzimas ionorregulatórias

As atividades das ATPases foram determinadas pelo protocolo descrito por Kültz e Somero (1995) adaptado para microplacas. As brânquias foram homogeneizadas (1:10 p/v) em tampão SEID buffer (pH 7,5): sacarose 150 mM, imidazol 50 mM, EDTA 10 mM e ácido deoxicólico 2,5 mM, e centrifugadas (2.000 g, 4°C) por 7 min. Foi adicionada 5 μl do sobrenadante em uma placa de 96 poços e mistura reativa (imidazol 30 mM; NaCl 45 mM; KCl 15 mM; MgCl_2 3,0 mM; KCN 0,4 mM; ATP 1,0 mM; NADH 0,2 mM; frutose-1,6-bifosfato 0,1 mM; PEP 2,0 mM, com 3 U mL^{-1} piruvato-quinase e 2 U mL^{-1} de lactato desidrogenase), após, parte das amostras receberam meio de reação sem inibidor, e com inibidor: ouabaína (2 mM), e com N- ethylmaleimide (NEM, 2 mM). A taxa de oxidação de NADH foi analisada a cada 10 seg durante 10 min a 340 nm. A concentração de proteína total foi determinada utilizando albumina sérica bovina (Sigma Aldrich) como padrão em $\lambda = 595 \text{ nm}$, segundo o método de Bradford (1976). As atividades das enzimas foram calculadas pelas diferenças na inclinação da reta da oxidação de NADH entre a solução de reação sem inibidor (atividade total) e com inibidores, ouabaína para NKA e NEM para H^+ -ATPase. As atividades estão expressas em $\mu\text{mol ATP h}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$.

2.8. Enzimas oxidantes e Peroxidação lipídica

Homogeneizados de fígado foram preparados em tampão (pH 7,4): Tris base 20mM, EDTA 1 mM, ditioneitol 1 mM, sacarose 0,5 m, KCl 0,15 M. Os homogeneizados foram centrifugados a 15000 g durante 20 min a 4°C e utilizados para determinar as atividades das GST, SOD, CAT e GPx, e produção de LPO (1:2 p/v para LPO e GST, SOD, CAT e GPx 1: 10 p/v).

A atividade da SOD foi determinada por meio da medida da inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido, segundo a metodologia de Flohé e Otting (1984). Para a determinação da atividade dessa enzima nas amostras, foi adicionado 10 μl da amostra, 1 ml

de mistura reativa (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM; xantina 1mM; NaOH 0,001 M) e 40 µl de xantina oxidase e as leituras foram feitas em $\lambda = 550$ nm. Uma unidade de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo C, uma vez que a SOD dismuta o radical superóxido em H₂O e H₂O₂. A atividade da enzima foi expressa em U SOD.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

Para análise da atividade da enzima CAT, foi quantificada a velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O método consiste em mensurar a atividade da CAT por meio do consumo de peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, segundo metodologia descrita por Beutler (1975). Para o ensaio, foi utilizada solução de peróxido de hidrogênio (12 mM) em tampão fosfato de potássio (40 mM, pH 8,0) preparada e titulada no dia da análise. Em uma cubeta foram colocados 2 ml da solução de H₂O₂ e 20 µl de amostra. Após a homogeneização do conteúdo, a velocidade de degradação do H₂O₂ foi mensurada durante 1 minuto. A alteração na absorbância foi medida em $\lambda = 240$ nm, sendo expressa a atividade em µM H₂O₂ min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

A atividade da GPx selênio-dependente foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na oxidação do NADPH em $\lambda = 340$ nm. Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 1 ml de meio de reação (NADPH, azida sódica 5 mM, GSH, tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0) juntamente com 20 µl de glutathione redutase (GR), 20 µl de H₂O₂ 20 mM e 10 µl de amostra. A GPx presente na amostra degrada o H₂O₂ na presença de GSH. A atividade da enzima foi expressa em nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

A GST foi determinada de acordo com o método descrito por Keen et al. (1976), adaptado para microplaca, utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) como substrato. A absorbância foi obtida em $\lambda = 340$ nm e a atividade da enzima foi expressa em U.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

A lipoperoxidação foi determinada pelo método FOX (*Ferrous Oxidation/Xylenol Orange*) como descrito por Jiang et al. (1991). O método é baseado na rápida oxidação do Fe²⁺ por hidroperóxidos em condições ácidas e posterior formação do complexo Fe³⁺- laranja de xilenol, na presença do estabilizador butilato hidroxitolueno (BHT). Assim, 30 µl de amostra foram adicionados em microplacas e incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente, com 270 µl de mistura reativa contendo 1 ml de laranja de xilenol, 250 µM de FeSO₄, 25 mM de

ácido sulfúrico (H₂SO₄), 4 mM de butilado hidroxitolueno (BHT) e metanol 90%, em $\lambda = 560$ nm. Os resultados foram expressos em μM de hidroperóxido cumeno mg proteína⁻¹.

Todas as leituras foram realizadas por espectrofotometria de placa (SpectraMax M2, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) e a concentração de proteína total para as análises foram determinadas segundo o método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (Sigma Aldrich) como padrão em $\lambda = 595$ nm.

2.9. *Acetilcolinesterase*

O cérebro foi homogeneizado em 50 mM de tampão fosfato, pH 7,4, na proporção padronizada (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g por 30 min. Para os ensaios foi adicionado 1 mM de iodeto de acetilcolina (ATC). Em cada poço da microplaca, 150 μl de 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic (DTNB; 270 μl) foram misturados com 25 μl da amostra e pré-incubados por 2 min e a reação foi iniciada adicionando 50 μl de substrato. A determinação da atividade seguiu os princípios propostos por Ellman et al. (1961) com as modificações apropriadas para microplacas, sendo realizada a leitura em triplicata a em 405 nm durante 5 min. A atividade foi expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}$ proteína⁻¹. O teor da proteína total foi determinado segundo o método de Bradford (1976).

2.10. *Análises estatísticas*

Os resultados de qualidade de água foram plotados como média \pm DP (desvio padrão). Os demais dados são expressos como média \pm SEM (erro padrão da média). Todos os dados foram testados quanto a sua normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para comparação foi utilizada uma ANOVA *two way*, seguido do teste Tukey com nível de significância de 5%. A aplicação dos testes estatísticos foi realizada com software Statistica 10 e gráficos SigmaPlot 12. Para análise de correlação entre AChE e LPO foi realizado uma análise de regressão simples.

3. Resultados

Os níveis reais de metais na água nos tratamentos experimentais foram próximos do nominal. A concentração de Cl⁻ diminuiu nos tratamentos Cu-pH7 e Mix-pH4 e K⁺ aumentou em todos os tratamentos do pH7 em relação aos mesmos tratamentos em pH4 (Tab. 1). Nenhuma mortalidade foi observada durante o experimento. No entanto, nos tratamentos Ni-pH7 e Mix-

pH7 notou-se que os peixes produziram muco, sendo que na última situação, ocorreu produção de muco mais intensa e natação próxima a coluna d'água.

3.1. Hematologia e íons plasmáticos

A concentração de Hb e os índices CHCM e HCM aumentaram com o aumento do pH da água ($P < 0,05$). Entretanto, ocorreu uma diminuição do HCM e aumento de Ht e RBC nos animais expostos ao Cu-pH4 quando comparado ao controle. O valor de hematócrito diminuiu com o aumento do pH ($p < 0,05$). Apesar de não haver diferenças, também notou-se diminuição Ca^{+} plasmático com o aumento o pH. A concentração dos metais no plasma aumentou em todos os tratamentos em relação aos seus respectivos controles nos diferentes pH ($p < 0,05$) (Tab. 2).

3.2. Enzimas ionorregulatórias

Não houve efeito do pH na atividade da H^{+} -ATPase (Fig. 1), enquanto nos tratamentos Cu-pH4 ($p = 0,002$) e Mix-pH4 ($p = 0,01$) ocorreu inibição da atividade da enzima quando comparada com o controle. Note o padrão inverso da atividade dessa enzima, em relação ao pH, quando os peixes foram expostos ao Ni e ao Cu. O mesmo padrão se repetiu para o Cu-pH7 ($p = 0,00$). Sobre a atividade da NKA (Fig. 2) observou-se a inibição da atividade da enzima com adição de Cu-pH4 ($p = 0,00$) e aumento no Ni-pH4 ($p = 0,00$), sendo inverso o padrão no pH7, com o aumento de 73,7% na atividade da enzima no grupo Cu-pH7 e diminuição de 83,8% da atividade no tratamento Ni-pH7. No tratamento Mix-pH4 ($p = 0,05$) ocorre a inibição da atividade quando comparada ao controle. Resultados semelhantes foram observados nos tratamentos Ni-pH7 ($p = 0,00$) e Mix-pH7 ($p = 0,00$).

3.3. Respostas antioxidantes, dano oxidativo e acetilcolinesterase

A atividade da SOD foi influenciada apenas pelo aumento do pH (Fig. 3), com a inibição da atividade enzimática em todos os tratamentos no pH7 em relação ao pH4 ($p = 0,00$). Aumento da atividade CAT foi observado nos tratamentos Cont-pH4 e Mix-pH4 quando comparado ao pH7 ($p = 0,00$). Para o pH4, ocorreu aumento da CAT nos tratamentos Cu-pH4 ($p = 0,03$) e Ni-pH4 ($p = 0,02$) em relação ao controle (Fig. 4). Para a atividade da GPx o aumento do pH resultou no aumento da atividade da enzima apenas no Cu-pH7 ($p = 0,00$), enquanto no Mix-pH7 ($p = 0,06$) a atividade enzimática foi inibida quando comparado ao controle (Fig. 5).

Sobre a atividade da GST observou-se aumento no tratamento Mix-pH7 ($p=0,02$) em relação ao mesmo tratamento no pH4. Nos tratamentos mantidos em pH7, ocorreu aumento da atividade da enzima nos tratamentos Cu-pH7 ($p=0,05$), Ni-pH7 ($0,05$) e Mix-pH7 ($p=0,05$), quando comparados com controle (Fig. 6). Os níveis de LPO aumentaram em todos os tratamentos, com diferenças Cont-pH7 ($p=0,02$), Cu-pH7 ($p=0,00$), Ni-pH7 ($p=0,00$) e Mix-pH7 ($p=0,03$) em relação ao pH4 (Fig. 7).

Para a atividade da AChE, observou-se inibição da atividade com aumento do pH ($p=0,00$) em todos os tratamentos (Fig. 8). Neste estudo foi observado que a atividade da AChE diminuiu significativamente no pH7 e a LPO aumentou no mesmo pH sugerindo que a atividade da AChE é inversamente proporcional a LPO, sendo o valor de $r^2=0,96$ ($p=0,00$) (Fig. 9).

4. Discussão

Os peixes teleósteos apresentam mecanismos para a manutenção do equilíbrio orgânico mesmo quando expostos a alterações no meio como, variação de pH (Aride et al., 2007; Wood et al., 2017), disponibilidade de íons (Duarte et al., 2013; Gonzalez et al., 1998) e presença de metais (Carvalho et al., 2015; Matsuo et al., 2005; Palermo et al., 2015). Estudos relatam que quando *C. macropomum* é mantido em pH ácido ocorrem perturbações insignificantes para espécie, sugerindo que a espécie estudada pode estar mais adaptada para enfrentar ambientes com pH mais ácidos (Aride et al., 2007; Gonzalez et al., 1998; Wood et al., 1998).

O presente estudo mostra que a toxicidade dos metais foi reduzida com a diminuição do pH, corroborando o estudo de Holland et al. (2017) que avaliou a taxa de mortalidade causada pelo Ni em diferentes pH em *Paracheirodon axelrodi*. Corrobora também o estudo de Carvalho et al. (2015) que avaliou a toxicidade do Cu em *Prochilodus lineatus* por meio dos parâmetros de estresse oxidativo em diferentes pH. A menor toxicidade em pH4 pode estar relacionada com a competição entre os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} e o H^+ pelos sítios de ligação no epitélio branquial, ou também pode estar relacionado ao tipo de especiação dos metais, sugerindo que pode ter aumentado o NiOH^+ e CuOH^+ por serem mais abundantes em pH7 aumentando assim a toxicidade no pH7 (Holland et al., 2017; Laurén e McDonald, 1985; Pyle et al., 2002; Wood et al., 2015). A diminuição da concentração de Hb, CHCM e HCM nos tratamentos pH4 em relação aos tratamentos pH7 indicam um possível efeito sobre a

produção de hemoglobina em animais expostos a pH neutro. A diminuição da concentração de Hb nos tratamentos Mix-pH7 e CHCM no tratamento Cu-pH4 em relação ao controle sugere efeito da exposição dos metais. Aumento do valor de Ht no grupo Cu-pH4 em relação ao seu grupo controle e diminuição em relação ao mesmo grupo nos diferentes pH pode ter sido causados pela associação entre pH e Cu, o mesmo pode ser sugerido para o aumento do RBC nos grupos Cu-pH4 e Mix-pH4. O aumento de CHCM e HCM nos grupos expostos a metais pode estar associado à alteração iônica no meio intracelular devido a desbalanço iônico, que favorece a entrada de água nas células, aumentando o volume dos eritrócitos, levando a hemólise (Aride et al., 2007).

No balanço iônico plasmático não houve nenhum tipo de perturbação. Estudos de balanço de Na^+ e Cl^- em *C. macropomum* em diferentes pH mostram que inicialmente há perdas líquidas de íons, mas que são rapidamente reduzidas sem haver perturbações nos níveis de íons plasmáticos (Aride et al., 2007), como observado no presente estudo.

O aumento da atividade da NKA no tratamento Cu-pH7 pode estar associado a um aumento na entrada de íons Na^+ do meio para as células ricas em mitocôndrias nas brânquias, pela ação do co-transportador Na^+/Cl^- e/ou pela ação da H^+ -ATPase que pela excreção de íons H^+ favorece a entrada de íons Na^+ para dentro da célula, conseqüentemente, elevando a concentração intracelular de Na^+ . Com o aumento do Na^+ , para manter o equilíbrio iônico a excreção de Na^+ é feita por intermédio da NKA, aumentando assim sua atividade. Por outro lado, a inibição da enzima no tratamento Ni-pH7 em relação ao mesmo tratamento no pH4 e Ni-pH4 e Mix-pH4 em relação aos seus respectivos controles pode ter sido causado pela inibição da entrada dos íons, uma vez que o Ni pode competir com a entrada de alguns desses íons (Blewett et al., 2016). Nota-se que a atividade dos tratamentos contendo Cu são inversos aos do tratamento com Ni, e nos tratamentos com a mistura dos metais, a atividade da enzima em ambos os pH é inibida, sugerindo que pode ter havido um efeito antagônico com a interação dos metais. Esse mesmo efeito foi descrito para *Pimephales promelas* em que a interação entre o Cu e Ni prejudicou a reprodução inibindo genes relacionados a vitelogenia hepática (Driessnack et al., 2017).

Apesar da exposição a diferentes pH que, a princípio causaria dificuldades na manutenção do equilíbrio ácido-base dos organismos expostos, a atividade da enzima H^+ -ATPase não foi alterada em relação ao pH. No entanto, foi observada diminuição da atividade da enzima nos

tratamentos Cu-pH4, Mix-pH4 e Cu-pH7 em relação aos seus respectivos controles, sugerindo efeito dos metais na atividade enzimática. Braz-Mota et al. (2018) avaliaram a atividade da enzima com adição de Cu e nanopartículas de Cu em *Apistogramma agassizii* e também encontraram inibição dessa enzima em tratamentos com adição de Cu, em concordância com o presente estudo. A H⁺-ATPase se localiza na membrana apical das células ricas em mitocôndrias, onde promovem a excreção de íons H⁺ para o meio externo, criando um gradiente eletroquímico que favorece a entrada de Na⁺ do meio para a célula através dos canais de Na⁺ (Wood et al., 2017). Por outro lado, sabe-se que o Cu⁺² e Ni⁺² possuem interação competitiva com H⁺ (Wood et al., 2015) o que sugere que no presente estudo ocorreu competição do Cu e Ni com a entrada de H⁺ nas células branquiais inibindo a atividade da enzima.

A SOD é a primeira enzima a agir sobre as ERO sendo a responsável pela dismutação do radical superóxido O₂⁻ em O₂ e H₂O₂. A SOD é muito sensível ao estresse causado por poluentes e pode ser utilizada como um sinal indicativo de estresse oxidativo, sendo um alerta precoce de poluição ambiental (Oost et al., 2003). Carvalho et al. (2015) notaram diminuição da atividade da SOD em pH neutro no controle e aumento da mesma com adição de Cu em *Prochilodus lineatus*. No presente estudo a inibição da atividade ocorreu em todos os tratamentos em pH7, sugerindo que para a espécie aqui estudada a atividade da SOD seja dependente do pH da água.

O aumento da CAT nos tratamentos Cont-pH7 e Mix-pH7 em relação ao pH4 evidencia a influência do pH da água nas respostas antioxidantes. Notou-se, também, o efeito dos metais na atividade da enzima nos tratamentos Cu-pH4 e Ni-pH4, isto é, um aumento da atividade da enzima, em concordância com os achados de Carvalho et al. (2015) para Cu e de Palermo et al. (2015) para Ni em *Prochilodus lineatus*. Devido ao potencial redox do Ni e Cu, o excesso dos mesmos poderia ter aumentado a concentração de radical hidroxila, sendo este radical a principal causa de LPO. A remoção do H₂O₂ é uma importante estratégia utilizada pelos organismos aquáticos para combater o estresse oxidativo (Palermo et al., 2015). No entanto, a atividade da GPx aumentou no grupo Cu-pH7 com o aumento do consumo de H₂O₂ e inibição no grupo Mix-pH7 em relação ao seu controle.

A atividade da GST aumentou nos grupos expostos ao pH7 quando comparados com seu controle, evidenciando o efeito dos metais, bem como o efeito do pH com o aumento da

atividade da enzima no tratamento Mix-pH7 em relação ao mesmo tratamento no pH4, sugerindo efeito do pH para o tratamento com a associação dos metais.

Concomitantemente ao aumento da LPO, ocorreu aumento dos danos em todos os tratamentos do pH7, reforçando a hipótese de que o estresse oxidativo foi influenciado mais pelo pH da água do que a adição dos metais. A produção de LPO é uma reação em cadeia complexa, mediada por radicais livres e auto propagável. É um processo altamente destrutivo que aumenta a rigidez e diminui a fluidez das membranas celulares (Oost et al., 2003). A exposição ao cobre em água a pH 4, 5, 7 e 8 aumentou os níveis de LPO no fígado de *Prochilodus lineatus* (Carvalho et al., 2015). No entanto, a adição dos metais não influenciou a produção de LPO no presente estudo, mas o pH teve efeito na mesma, o que indica produção de radicais livres e/ou uma resposta antioxidante insuficiente ao sequestrador ERO. A inibição de SOD normalmente resulta em estresse oxidativo e estimula a produção de LPO (Halliwell, 2006), o que é observado no presente estudo com relação ao pH. Sugerimos que no pH7 a SOD não transformou o O_2^- em O_2 e H_2O_2 , resultando em um aumento na concentração de radical hidroxila por meio da reação de Fenton, sendo este radical a principal causa de LPO.

Conseqüentemente, notou-se inibição da atividade da AChE no grupo do pH7 em relação aos grupos do pH4, sugerindo que estudos para compreensão da atividade da enzima sob efeito do pH são necessários. Além disso, foi observado a relação inversamente proporcional da atividade da AChE em relação aos danos. Estudos mostram que as ERO poderiam inibir a AChE, que por sua vez afeta a neurotransmissão nas sinapses colinérgicas. Estudos recentes com embriões de zebra fish (Pamanji et al., 2015; Parlak, 2018; Rodríguez-Fuentes et al., 2015) mostraram que o estresse oxidativo tem efeitos negativos sobre o sistema nervoso e o desenvolvimento fisiológico.

Conclusão

- 1- Os distúrbios hematológicos evidenciados pelo Ht, CHCM e HCM foram causados por ambos os fatores, pH e metais, em *C. macropomum*;
- 2- Em relação a atividade das enzimas ionorregulatórias, os efeitos resultaram tanto da exposição aos metais quanto ao pH, destacando-se o efeito do Cu e Ni sobre a enzima NKA. A combinação entre Ni e Cu, na interação, inibe a atividade da NKA em ambos os pH, evidenciando um efeito antagônico da combinação dos metais;

- 3- Os exemplares de tambaqui mantidos em pH neutro foram mais susceptíveis a danos, como lipoperoxidação, e apresentaram respostas antioxidantes e neurotóxicas reduzidas;
- 4- A lipoperoxidação e a atividade da acetilcolinesterase guardam relação inversa, evidenciando que o estresse oxidativo tem efeito negativo sobre o sistema nervoso.

Referências

- Araújo, J.D.A., Ghelfi, A., Val, A.L., 2017. *Triportheus albus cope*, 1872 in the blackwater, clearwater, and whitewater of the amazon: A case of phenotypic plasticity? *Front. Genet.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00114>
- Aride, P.H.R., Roubach, R., Val, A.L., 2007. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquac. Res.* 38, 588–594. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01693.x>
- Barrera, P., 2016. 10 Top Nickel-producing Countries. *Nickel. Invest. News Netw.* <https://doi.org/http://investingnews.com/daily/resource-investing/base-metals-investing/nickel-investing/10-top-nickel-producing-countries>
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. New York.
- Binet, M.T., Adams, M.S., Gissi, F., Golding, L.A., Schlekat, C.E., Garman, E.R., Merrington, G., Stauber, J.L., 2018. Toxicity of nickel to tropical freshwater and sediment biota: A critical literature review and gap analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 37. <https://doi.org/10.1002/etc.3988>
- Blewett, T.A., Leonard, E.M., 2017. Mechanisms of nickel toxicity to fish and invertebrates in marine and estuarine waters. *Environ. Pollut.* 223, 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.028>
- Blewett, T.A., Wood, C.M., Glover, C.N., 2016. Salinity-dependent nickel accumulation and effects on respiration, ion regulation and oxidative stress in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*. *Environ. Pollut.* 214, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.010>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braz-Mota, S., Campos, D.F., MacCormack, T.J., Duarte, R.M., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 2018. Mechanisms of toxic action of copper and copper nanoparticles in two Amazon fish species: Dwarf cichlid (*Apistogramma agassizii*) and cardinal tetra

- (*Paracheirodon axelrodi*). *Sci. Total Environ.* 630, 1168–1180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.216>
- Braz-Mota, S., Fé, L.M.L., Delunardo, F.A.C., Sadauskas-Henrique, H., de Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., 2016. Exposure to waterborne copper and high temperature induces the formation of reactive oxygen species and causes mortality in the Amazonian fish *Hoplosternum littorale*. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2847-y>
- Brow, B.A., 1976. *Hematology principles and procedures*, 2^o ed. Philadelphia.
- Carvalho, C. dos S., Bernusso, V.A., Fernandes, M.N., 2015. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). *Aquat. Toxicol.* 167, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.003>
- Dantas, Y.T., Ferreira, M.S., Val, A.L., 2017. Efeito da exposição ao níquel associada à natação suave nas respostas antioxidantes e bioacumulação em *Colossoma macropomum*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Driessnack, M.K., Jamwal, A., Niyogi, S., 2017. Effects of chronic exposure to waterborne copper and nickel in binary mixture on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Chemosphere* 185, 964–974. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.100>
- Duarte, R.M., Ferreira, M.S., Wood, C.M., Val, A.L., 2013. Effect of low pH exposure on Na⁺ regulation in two cichlid fish species of the Amazon. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 166, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.07.022>
- Duarte, R.M., Honda, R.T., Val, A.L., 2010. Acute effects of chemically dispersed crude oil on gill ion regulation, plasma ion levels and haematological parameters in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquat. Toxicol.* 97, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.020>
- Duarte, R.M., Menezes, A.C.L., da Silveira Rodrigues, L., de Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., 2009. Copper sensitivity of wild ornamental fish of the Amazon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 693–698. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.10.003>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Escher, B.I., Hermens, J.L.M., 2002. Critical Review Modes of Action in Ecotoxicology :

- Their Role in Body Burdens , Species Sensitivity , QSARs , and Mixture Effects. Environ. Sci. Technol. 36, 4201–4217.
- Flohé, L., Otting, 1984. Superoxide Dismutase Assays. Methods Enzymol. 105, 93–104. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05013-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05013-8)
- Furch, K., 1984. Water chemistry of the Amazon basin: The distribution of chemical elements among freshwaters, in: The Amazon. p. 167–199.
- Gonzalez, R.J., Wood, C.M., Wilson, R.W., Patrick, M.L., Bergman, H.L., Narahara, a, Val, a L., 1998. Effects of water pH and calcium concentration on ion balance in fish of the Rio Negro, Amazon. Physiol. Zool. 71, 15–22. <https://doi.org/10.1086/515893>
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol. 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hernández, P.P., Moreno, V., Olivari, F.A., Allende, M.L., 2006. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). Hear. Res. 213, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2005.10.015>
- Holland, A., Wood, C.M., Smith, D.S., Correia, T.G., Val, A.L., 2017. Nickel toxicity to cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*) differs seasonally and among the black, white and clear river waters of the Amazon basin. Water Res. 123, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.044>
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. Br. J. Haematol. 25, 563–575.
- Instituto Brasileiro de Mineração, 2015. Informações sobre a economia mineral brasileira 1–25. <https://doi.org/http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00005836.pdf>.
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. Lipids 26, 853–856. <https://doi.org/10.1007/BF02536169>
- Junk, W.J., Bayley, P.B., Sparks, R.E., 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028909>
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. J. Biol. Chem. 251, 6183–6188.

- Kienle, C., Köhler, H.R., Filser, J., Gerhardt, A., 2008. Effects of nickel chloride and oxygen depletion on behaviour and vitality of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) (Pisces, Cypriniformes) embryos and larvae. *Environ. Pollut.* 152, 612–620. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.069>
- Kienle, C., Köhler, H.R., Gerhardt, A., 2009. Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1740–1747. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.014>
- Kim, J.H., Kang, J.C., 2016. Oxidative stress, neurotoxicity, and metallothionein (MT) gene expression in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* under the different levels of dietary chromium (Cr^{6+}) exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 125, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.001>
- Kültz, D., Somero, G., 1995. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *J. Exp. Biol.* 198, 1883–1894.
- Laurén, D.J., McDonald, D.G., 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Comp. Physiol. B* 155, 635–644. <https://doi.org/10.1007/BF00694455>
- Matsuo, A.Y.O., Playle, R.C., Val, A.L., Wood, C.M., 2004. Physiological action of dissolved organic matter in rainbow trout in the presence and absence of copper: Sodium uptake kinetics and unidirectional flux rates in hard and softwater. *Aquat. Toxicol.* 70, 63–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.07.005>
- Matsuo, A.Y.O., Wood, C.M., Val, A.L., 2005. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquat. Toxicol.* 74, 351–364. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.008>
- Menezes, A.C., 2005. Toxicidade do cobre sobre tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas.
- Ministério de Minas e Energia, 2015. Informe Mineral - Departamento Nacional de Produção 1–21. https://doi.org/http://www.dnmp.gov.br/dnmp/informes/informe-mineral-2_2015.pdf

- Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1287–1312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9)
- Oost, V. Der, Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environmental Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.032>
- Pamanji, R., Bethu, M.S., Yashwanth, B., Leelavathi, S., Venkateswara Rao, J., 2015. Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 7744–7753. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4120-8>
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hogstrand, C., Janssen, C.R., Mcgeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., Benjamin, K., 2002. The biotic ligand model : a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 133, 3–35.
- Parlak, V., 2018. Evaluation of apoptosis, oxidative stress responses, AChE activity and body malformations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to deltamethrin. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.112>
- Pyle, G.G., Swanson, S.M., Lehmkuhl, D.M., 2002. The influence of water hardness, pH, and suspended solids on nickel toxicity to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Water. Air. Soil Pollut.* 133, 215–226. <https://doi.org/10.1023/A:1012973728628>
- Rodríguez-Fuentes, G., Rubio-Escalante, F.J., Noreña-Barroso, E., Escalante-Herrera, K.S., Schlenk, D., 2015. Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 172–173, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.003>
- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A.F., Carvalho, P.S.M.,

- Meletti, P.C., Silva de Assis, H.C., Bianchini, A., Martinez, C.B.R., 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 170, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.012>
- Solé, M., Lima, D., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2008. Stress biomarkers in juvenile *Senegal sole*, *Solea senegalensis*, exposed to the water-accommodated fraction of the “Prestige” fuel oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 19–23. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9289-1>
- Svecevičius, G., Kazlauskienė, N., Taujanskis, E., 2012. The acute and behavioral effects of a copper-nickel mixture on roach *Rutilus rutilus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 147–151. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0636-5>
- Tierney, K.B., Baldwin, D.H., Hara, T.J., Ross, P.S., Scholz, N.L., Kennedy, C.J., 2010. Olfactory toxicity in fishes. *Aquat. Toxicol.* 96, 2–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.09.019>
- Tilton, F.A., Bammler, T.K., Gallagher, E.P., 2011. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 153, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.008>
- Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 1995. *Fishes of the Amazon and Their Environment. Manaus - Amazonas.*
- Val, A.L., Fearnside, P.M., Almeida-Val, V.M.F., 2016. Environmental disturbances and fishes in the Amazon 1–2. <https://doi.org/10.1111/jfb.12896>
- Vale, 2018. Níquel. <https://doi.org/http://www.vale.com/brasil/PT/business/mining/nickel/Paginas/default.aspx>
- Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2015. Homeostasis and Toxicology of Essential Metals, Academic Press ed, Fish Physiology. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wood, C.M., Gonzalez, R.J., Ferreira, M.S., Braz-Mota, S., Val, A.L., 2017. The physiology of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*) at pH 8.0. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 0, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1137-y>
- Wood, C.M., Wilson, R.W., Gonzalez, R.J., Patrick, M.L., Bergman, H.L., Narahara, A., Val,

- A.L., 1998. Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water. *Physiol. Zool.* 71, 658–670. <https://doi.org/10.1086/515977>
- Zall, D.M., Fisher, D., Garner, M.Q., 1956. Photometric Determination of Chlorides in Water. *Anal. Chem.* 28, 1665–1668. <https://doi.org/10.1021/ac60119a009>
- Zheng, G.H., Liu, C.M., Sun, J.M., Feng, Z.J., Cheng, C., 2014. Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway. *Aquat. Toxicol.* 147, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.015>

Tab. 1. Parâmetros físico-químicos da solução experimental contendo cobre, níquel e associação dos dois metais (mix), em pH4 e pH7, para exposição de *Colossoma macropomum*. Os dados são apresentados como média ± SE (n=8, em cada tratamento). * representa diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados com o controle no mesmo pH (p<0,05) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH (p<0,05).

	pH 4				pH 7			
	Controle	Cobre	Níquel	Mix	Controle	Cobre	Níquel	Mix
Ni (mg/L)	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,002	4,49 ± 0,09*	2,78 ± 0,04*	0,01 ± 0,002	0,03 ± 0,004	4,24 ± 0,17*	2,44 ± 0,09*
Cu (mg/L)	0,01 ± 0,002	0,53 ± 0,02*	0,03 ± 0,02	0,24 ± 0,005*	0,01 ± 0,002	0,54 ± 0,008*	0,01 ± 0,001	0,233 ± 0,005*
Na⁺ (mg/L)	2,07 ± 0,04	2,33 ± 0,06	2,11 ± 0,05	2,41 ± 0,06	2,55 ± 0,18 [#]	2,52 ± 0,12	2,09 ± 0,10	2,23 ± 0,10
Cl⁻ (µM/L)	269,01 ± 26,51	301,03 ± 21,02	336,72 ± 24,64	239,66 ± 28,93	173,19 ± 28,54	145,53 ± 27,10 [#]	180,69 ± 19,92 [#]	242,45 ± 30,63
K⁺ (mg/L)	1,97 ± 0,08	2,59 ± 0,11	2,25 ± 0,06	2,76 ± 0,06	10,35 ± 0,90 [#]	12,23 ± 0,65 [#]	9,55 ± 0,46 [#]	8,93 ± 0,12 [#]
Mg²⁺ (mg/L)	0,39 ± 0,007	0,42 ± 0,01	0,38 ± 0,007	0,39 ± 0,008	0,59 ± 0,05	0,51 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,45 ± 0,03
Ca²⁺ (mg/L)	5,55 ± 0,13	6,11 ± 0,55 [#]	5,19 ± 0,14	5,03 ± 0,05	4,95 ± 0,40	4,37 ± 0,13	4,37 ± 0,18	5,85 ± 0,25

Tab. 2. Parâmetros sanguíneos e bioquímicos de *Colossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix), em diferentes pH. Os dados são apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). * representa diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados com o controle no mesmo pH (p<0,05) e # representa diferenças estatísticas de comparações dos mesmos tratamentos em diferentes pH (p<0,05).

	pH 4				pH 7			
	Controle	Cobre	Níquel	Mix	Controle	Cobre	Níquel	Mix
Hb (mg dL⁻¹)	5,15 \pm 0,33	5,75 \pm 0,25	5,04 \pm 0,18	5,38 \pm 0,15	6,66 \pm 0,55 [#]	7,60 \pm 0,26 [#]	7,43 \pm 0,35 [#]	7,98 \pm 0,17 ^{*#}
Ht (%)	27,00 \pm 1,30	36,00 \pm 1,40 [*]	30,37 \pm 1,89	32,00 \pm 2,68	25,50 \pm 2,00	24,87 \pm 1,42 [#]	24,87 \pm 0,61	25,00 \pm 1,40
RBC (X 10⁶ μl⁻¹)	0,99 \pm 0,07	1,62 \pm 0,11 [*]	1,20 \pm 0,10	1,41 \pm 0,08 [*]	1,11 \pm 0,06	1,21 \pm 0,08	1,24 \pm 0,06	1,22 \pm 0,05
VCM (fL)	278,29 \pm 26,60	227,33 \pm 14,81	253,41 \pm 20,05	227,80 \pm 15,53	233,15 \pm 22,11	211,22 \pm 16,85	203,41 \pm 11,75	204,09 \pm 8,91
CHCM (g dL⁻¹)	19,51 \pm 1,60	16,07 \pm 0,65	17,30 \pm 1,60	17,39 \pm 1,40	24,15 \pm 1,49	31,03 \pm 1,49 ^{*#}	29,99 \pm 1,49 [#]	32,75 \pm 1,49 ^{*#}
HCM (pg)	53,69 \pm 6,30	36,19 \pm 2,04 [*]	43,17 \pm 2,77	38,71 \pm 1,70	54,58 \pm 4,00	65,07 \pm 5,79 [#]	60,32 \pm 3,22	65,95 \pm 2,85 [#]
Na⁺ (mmol L⁻¹)	116,16 \pm 6,89	126,16 \pm 11,36	144,91 \pm 12,57	110,06 \pm 14,09	115,60 \pm 4,33	103,04 \pm 11,06	118,65 \pm 8,93	133,20 \pm 12,31
Cl⁻ (mmol L⁻¹)	126,71 \pm 9,95	121,89 \pm 5,21	112,96 \pm 5,28	123,91 \pm 6,18	120,75 \pm 8,42	115,46 \pm 7,61	124,75 \pm 2,23	112,45 \pm 7,34
K⁺ (mmol L⁻¹)	4,5 \pm 0,34	3,40 \pm 0,29	3,88 \pm 0,12	4,65 \pm 0,54	3,80 \pm 0,33	2,58 \pm 0,29	3,27 \pm 0,30	4,17 \pm 0,64
Mg²⁺ (mmol L⁻¹)	1,53 \pm 0,09	1,55 \pm 0,15	1,54 \pm 0,09	1,56 \pm 0,11	1,30 \pm 0,08	1,30 \pm 0,16	1,34 \pm 0,16	1,60 \pm 0,05
Ca²⁺ (mmol L⁻¹)	4,06 \pm 0,22	4,35 \pm 0,29	4,51 \pm 0,51	4,96 \pm 0,53	3,20 \pm 0,16	3,08 \pm 0,37	3,27 \pm 0,34	3,96 \pm 0,41
Ni²⁺ (mmol L⁻¹)	0,88 \pm 0,10	2,15 \pm 0,33	34,31 \pm 0,71 [*]	28,79 \pm 3,62 [*]	1,17 \pm 0,09	2,15 \pm 0,10	34,90 \pm 2,80 [*]	28,79 \pm 1,39 [*]
Cu²⁺ (mmol L⁻¹)	5,32 \pm 0,05	13,50 \pm 0,69 [*]	5,40 \pm 0,29	11,84 \pm 0,67 [*]	4,44 \pm 0,32	12,38 \pm 0,49 [*]	5,35 \pm 0,57	11,12 \pm 0,58 [*]

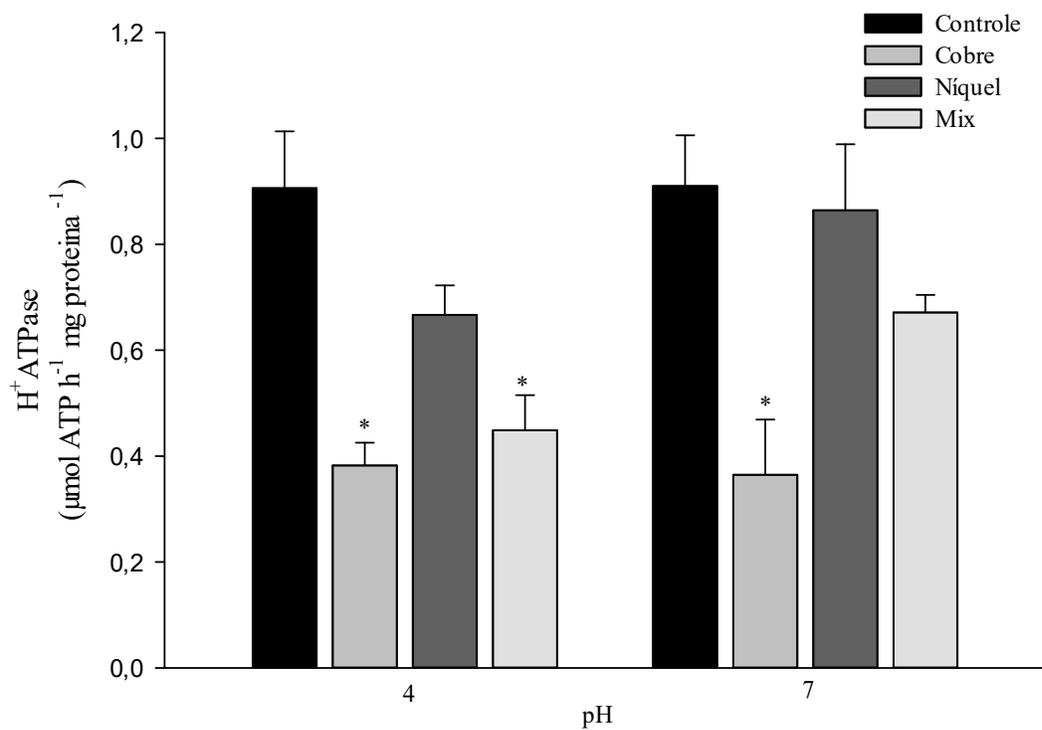


Fig. 1. Atividade da H^+ -ATPase de *Colossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados são apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). * representa diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados com o controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).

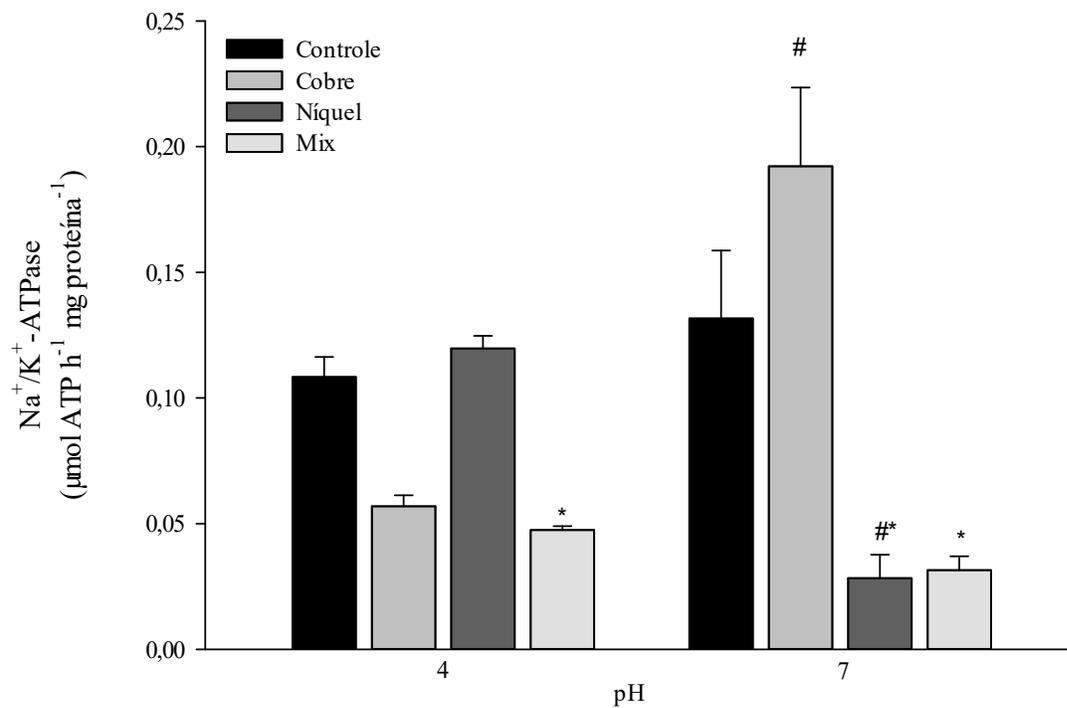


Fig. 2. Atividade da Na^+/K^+ - ATPase de *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). * representa diferenças estatísticas dos tratamentos comparados com controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).

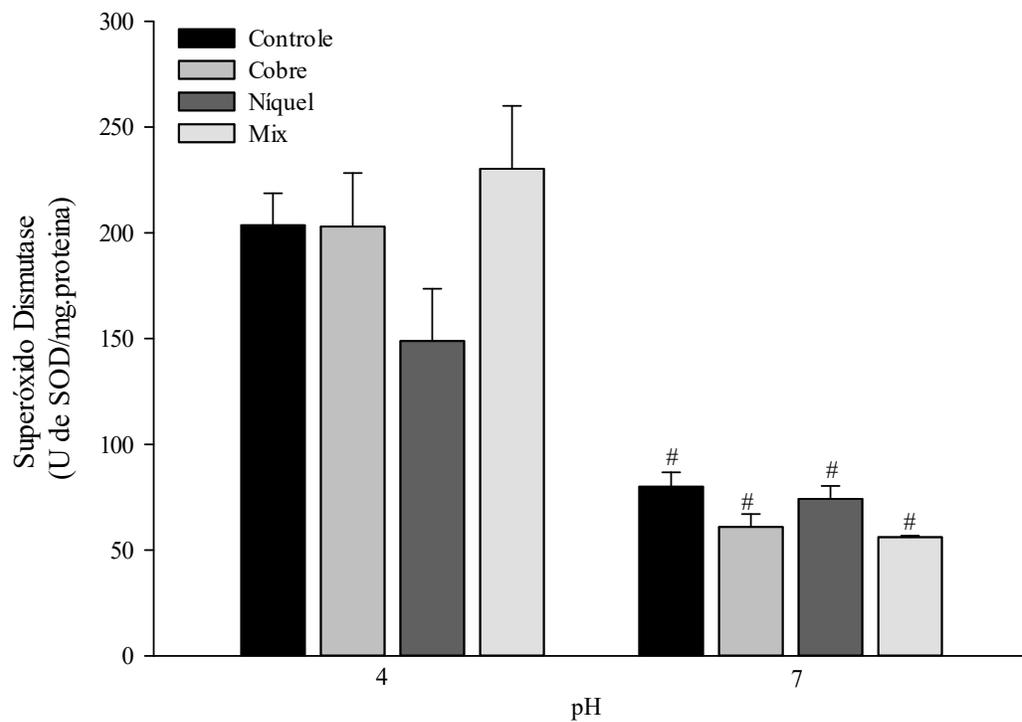


Fig. 3. Atividade da Superóxido Dismutase de *Collossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).

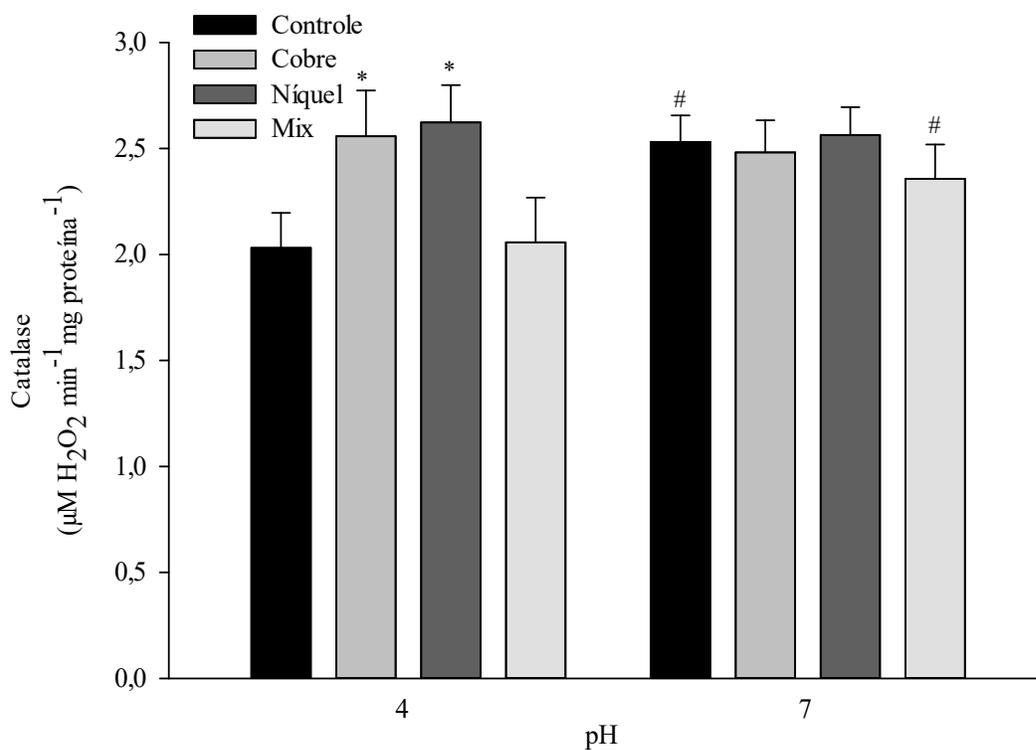


Fig. 4. Atividade da Catalase em *Colossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados são apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). Os símbolos * representa diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados com o controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).

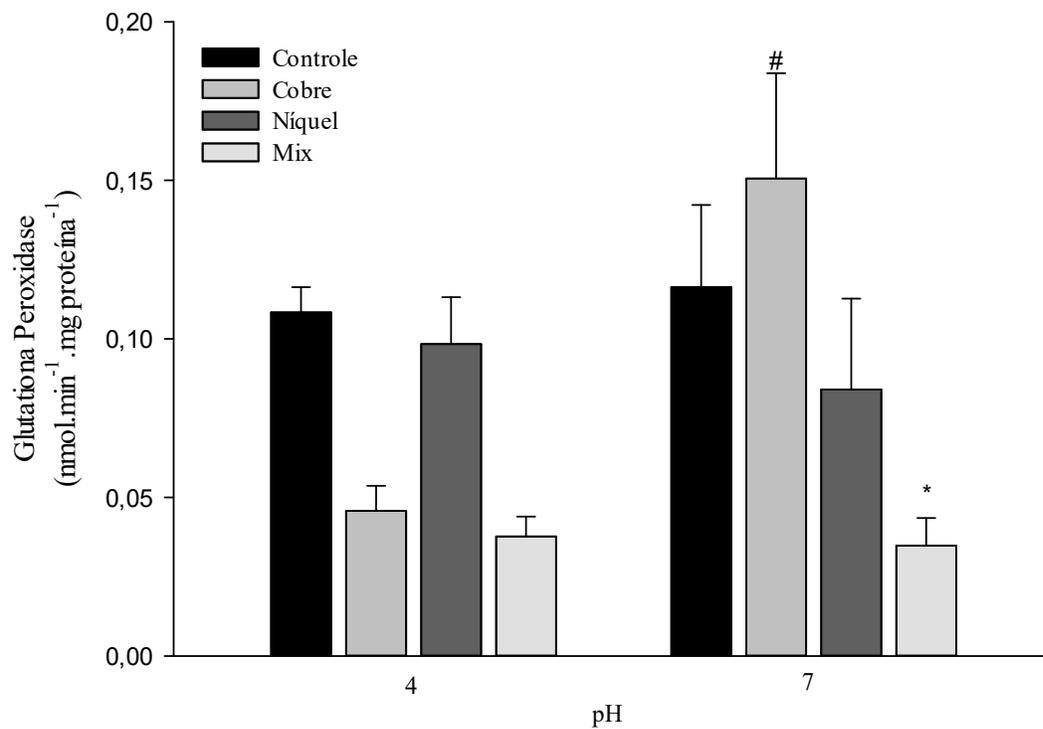


Fig. 5. Atividade da Glutathione Peroxidase de *Colossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). Os símbolos * representa diferenças estatísticas dos tratamentos comparados com controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).

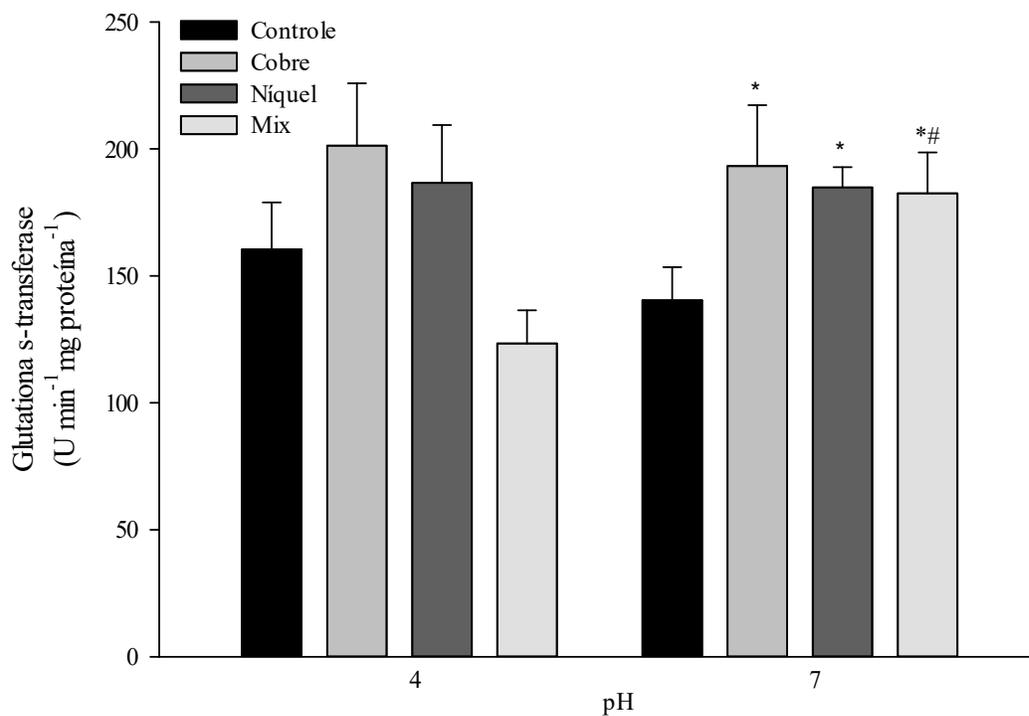


Fig. 6. Atividade da Glutathione s-transferase de *Colossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). Os símbolos * representa diferenças estatísticas dos tratamentos comparados com controle no mesmo pH ($p < 0,05$) e # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$)

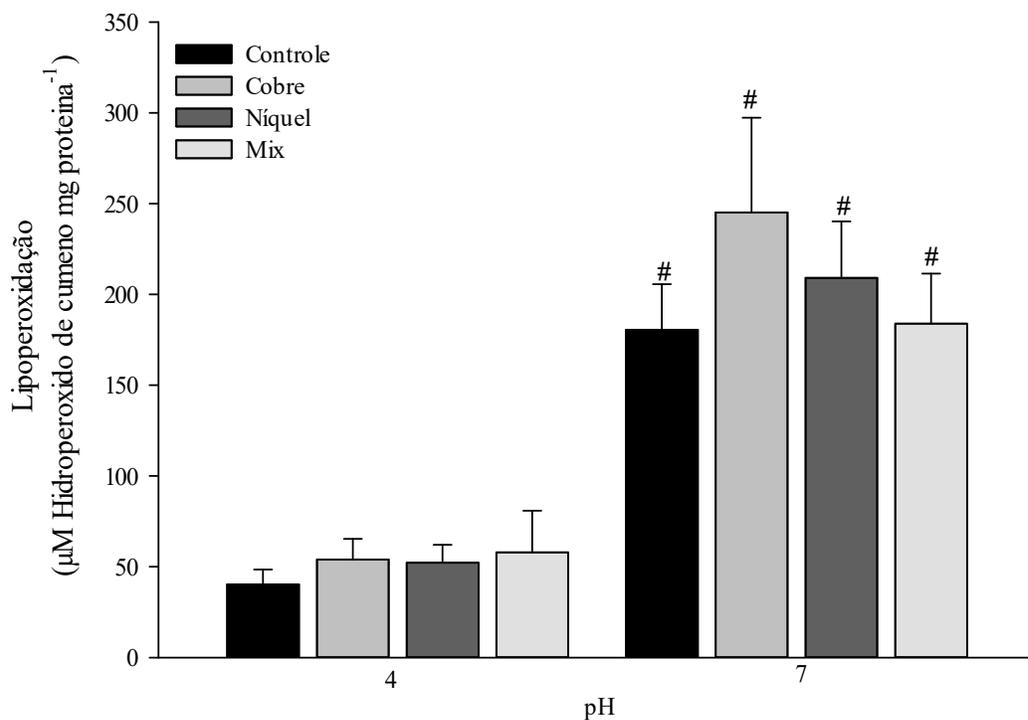


Fig. 7. Lipoperoxidação de *Colossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). O símbolo # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).

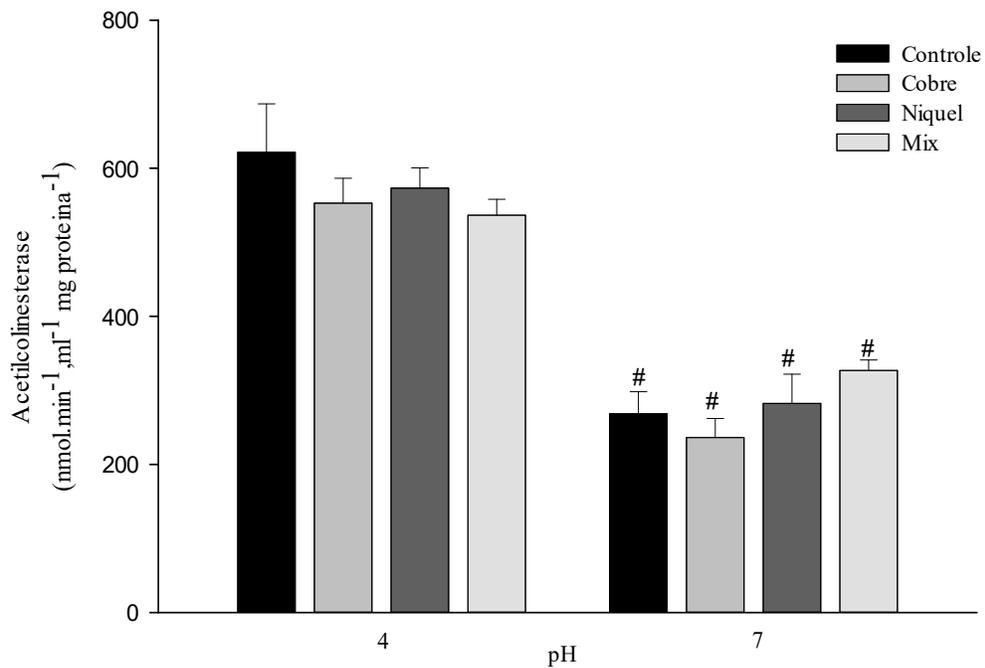


Fig. 8. Atividade da acetilcolinesterase em *Colossoma macropomum* após 96 horas sob a condição controle e expostos ao cobre, ao níquel e à associação dos dois metais (mix) em diferentes pH. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n=8, em cada tratamento). O símbolo # representa diferenças estatísticas entre os mesmos tratamentos em diferentes pH ($p < 0,05$).

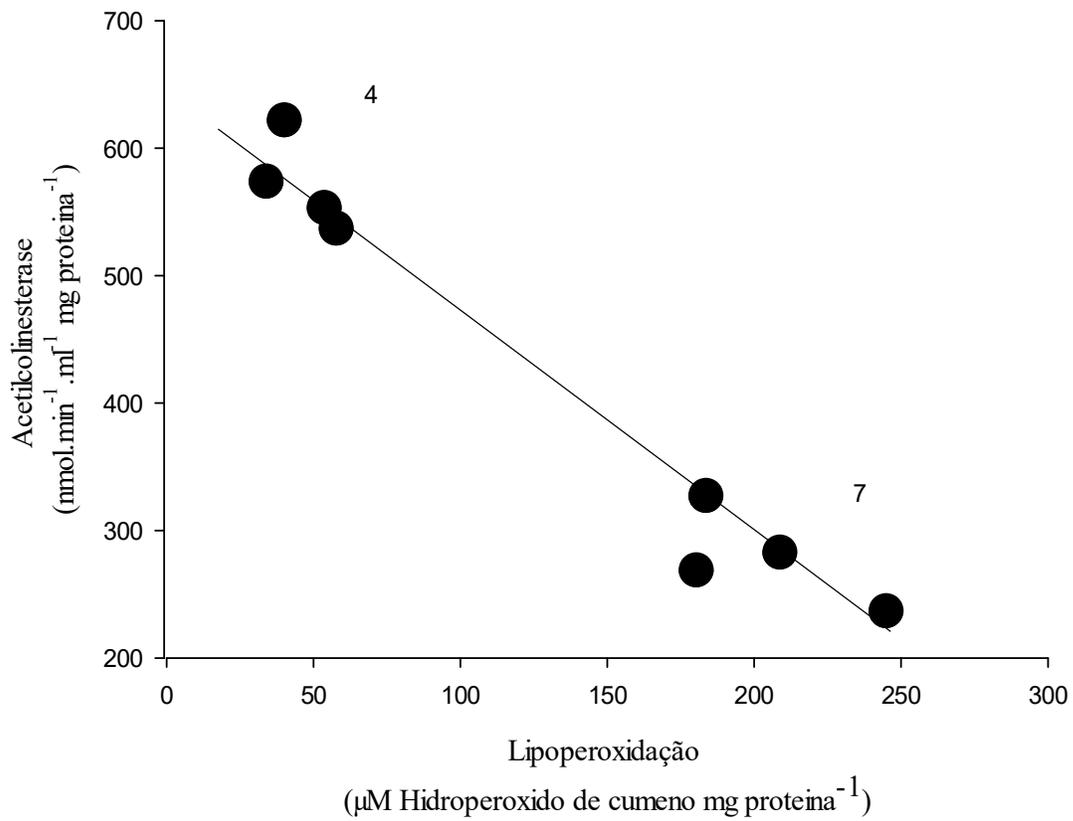


Fig. 9. Relação da atividade da acetilcolinesterase com a lipoperoxidação. 4 e 7 no centro do gráfico representam os tratamentos em pH 4 e pH 7 ($r^2=0,96$; $p=0,00$).

ANEXO I – Caracterização elementar

Tab. 1. Condições de análise do ICP-OES.

Parâmetro	Valor
Potência RF	1500 W
Fluxo de Argônio de Plasma	15,0 L min ⁻¹
Fluxo de Argônio de Plasma	1,2 L min ⁻¹
Fluxo de Argônio de Nebulização	0,42 L min ⁻¹

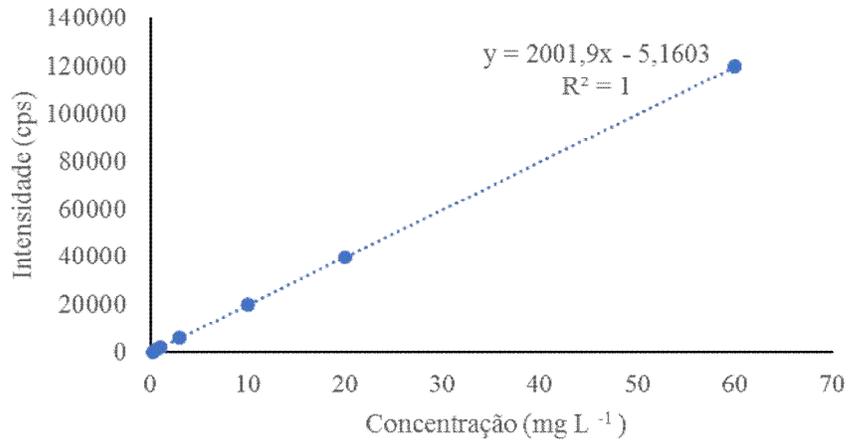
As soluções de calibração foram preparadas com utilizando soluções estoque Perkin Elmer Pure Inorganic Aqueous (N9300224). As soluções de calibração foram acidificadas 1% com ácido nítrico, a fim de evitar a precipitação dos padrões, uma vez que a matriz da curva é aquosa. Os elementos, massas atômicas, coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação (R), os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e ABS estão apresentados na Tab. 2.

Tab. 2. Parâmetros analíticos.

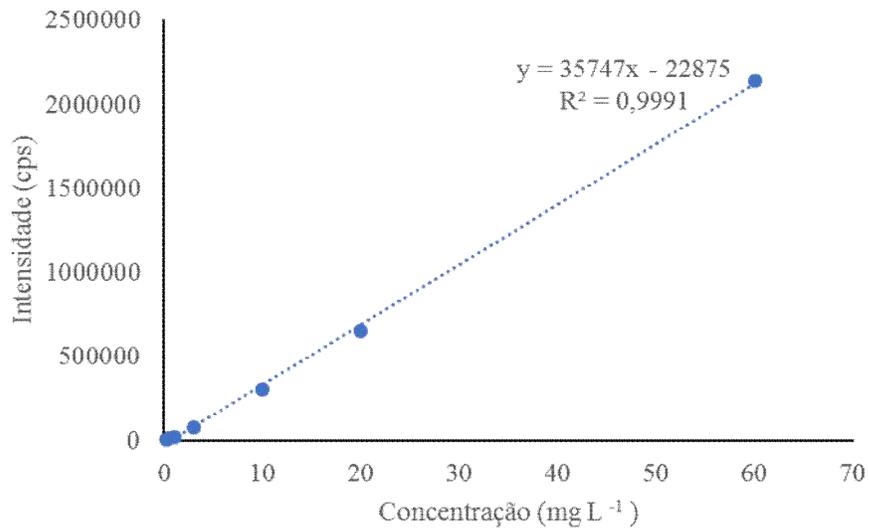
Elemento	R²	R	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)	ABS (cps)
Na	0,999981	0,999991	0,0078002	0,20	590
K	0,998177	0,999088	0,0012739	0,20	770
Ni	0,999906	0,999953	0,0008765	0,16	232
Mg	0,999657	0,999828	0,0000431	0,20	280
Ca	0,99872	0,99936	0,0002553	0,20	393
Cu	0,999714	0,999857	0,0007894	0,10	325

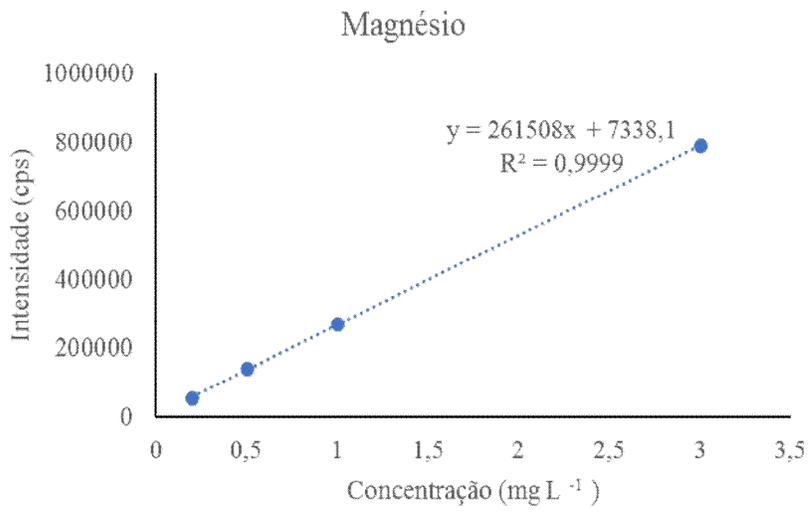
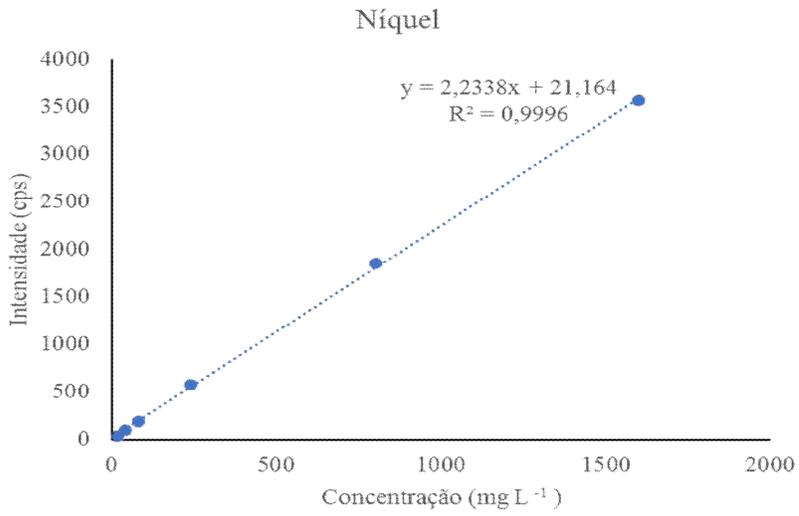
Curvas de calibração:

Sódio

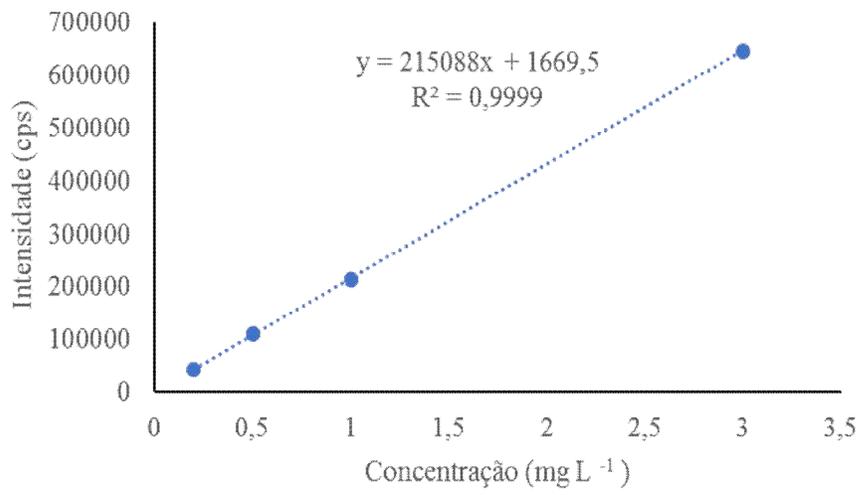


Potássio





Cálcio



Cobre

