Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*)

Cleonice Cristina Hilbig[1], Robie Allan Bombardelli[1*], Eduardo Antônio Sanches[2], José Dílson Silva de Oliveira[3], Diego Mendes Baggio[1] e Bruno Estevão de Souza[2]

*[1]Curso de Engenharia de Pesca, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua da Faculdade, 645, 85903-000, Jardim La Salle, Toledo, Paraná, Brasil. [2]Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. [3]Curso de Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: rabombardelli@gmail.com*

RESUMO. A poluição no meio aquático afeta o potencial reprodutivo de várias espécies de peixes. Diante disso, o presente experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos causados pela contaminação da água utilizada no processo de fertilização artificial e incubação inicial de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) por chumbo. Foram realizados dois ensaios, os quais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, compostos por seis tratamentos, com quatro e seis repetições, para o primeiro e o segundo ensaio, respectivamente. O primeiro ensaio consistiu na contaminação da água utilizada no processo de fertilização artificial, com os níveis de 0,00; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 mg de PB L^{-1}, e incubação dos ovos em água limpa. O segundo ensaio utilizou os níveis de contaminação de 0,00; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 mg de PB L^{-1} de água utilizada nos processos de fertilização e de incubação dos ovos. Observou-se que apenas no segundo ensaio houve efeito ($p < 0,05$) entre tratamentos com comportamento de "plateau" até 0,25 mg de Pb L^{-1}, a partir do qual se verificou redução das taxas de fertilização de forma linear. Conclui-se que níveis de chumbo superiores a 0,25 mg de PB L^{-1} causaram efeito deletério sobre a fertilização artificial do jundiá cinza.

Palavras-chave: fertilização artificial, jundiá cinza, metal pesado, reprodução de peixes, *Rhamdia quelen*.

ABSTRACT. The effect of lead on artificial fertilization and incubation of gray jundiá (*Rhamdia quelen*) eggs. Aquatic environmental pollution affects the reproductive potential of various species of fish. The present experiment was carried out to evaluate the effect of lead contamination of the water used in artificial fertilization and initial egg incubation of gray jundiá (*Rhamdia quelen*). Two assays were carried out distributed in randomly experimental designs, composed by six treatments, with four and six replications, for the first and second assays, respectively. The first assay consisted of the contamination of artificial fertilization water with 0.00; 0.01; 0.02; 0.03; 0.04 and 0.05 mg of Pb L^{-1} and egg incubation in pure water. The second assay consisted of the contamination of artificial fertilization water and egg incubation water with 0.00; 0.15; 0.30; 0.45; 0.60 and 0.75 mg of Pb L^{-1}. Only the second assay was affected ($p < 0.05$) by the treatments, showing a "plateau" tendency until 0.25 mg of Pb L^{-1}. A linear reduction of the fertilization rate was verified in levels of lead contamination of water above 0.25 mg of Pb L^{-1}. Lead concentrations levels above 0.25 mg of Pb L^{-1} cause deleterious effects on the artificial fertilization of gray jundiá.

Key words: artificial fertilization, gray jundiá, heavy metal, fish reproduction, *Rhamdia quelen*.

Introdução

A espécie *Rhamdia quelen* pertence à classe Osteichthyes, série Teleostei, ordem Siluriforme, família Heptapteridae, gênero *Rhamdia* (Nakatani *et al*., 2001) e, de acordo com Silfvergrip (1996), é encontrada desde o Sudeste do México até o Centro-sul da Argentina.

O jundiá cinza é uma espécie de peixe nativa da região Sul do Brasil, onde tem grande importância econômica (Marchioro e Baldisserotto, 1999). Apresenta rápido crescimento, rusticidade, carne de bom sabor, grande potencial para criação intensiva e sua reprodução artificial apresenta bons resultados e altas taxas de fertilização (Gomes *et al.*, 2000). Além do bom desempenho produtivo, outro fator que favoreceu o destaque dessa espécie na piscicultura brasileira foi o domínio do processo reprodutivo em

cativeiro (Bombardelli *et al.*, 2006).

Como a prática da aquicultura necessita de água para ser realizada, o uso de fontes de água poluída, sejam estas fluviais, lacustres ou marinhas, inviabilizam os empreendimentos de cultivo de organismos aquáticos (Vinatea Arana, 1997).

Os peixes são organismos sensíveis aos efeitos da poluição, tanto é que são frequentemente usados como indicadores de qualidade da água, pois eles constituem os produtos finais de um sistema complexo formado pelo ambiente (Sisino *et al.,* 2000; Martinez *et al.,* 2004; Boock e Machado Neto, 2005).

A poluição no meio aquático pode afetar o potencial reprodutivo, reduzindo, assim, a propagação das espécies de peixes. Isto pode ocorrer pela possível interação existente entre os gametas e os poluentes da água, a exemplo da obstrução da micrópila, que impede a entrada dos espermatozoides no processo de fertilização (Kime, 1995). Além disso, soluções que contêm certos níveis de poluentes podem interferir diretamente na morfologia e na motilidade espermática e, posteriormente, na fertilização (Kime e Nash, 1999).

Alguns trabalhos relatam a influência dos metais pesados na reprodução de peixes (Kime, 1995; Sumpter, 1997), fazendo menção às influências dos contaminantes sobre a qualidade dos gametas (Kime *et al.*, 1996; Lahnsteiner *et al*., 2004), sobre a fertilização dos ovócitos (Rurangwa *et al*., 1998; Witeck, 2007) e sobre a qualidade das larvas (Jezierska *et al*., 2000; Sarnowski, 2004).

Dentre vários metais pesados com potencial poluente, o chumbo está presente na água proveniente de descargas de efluentes industriais, como os efluentes das indústrias de baterias, bem como pelo uso indevido de tintas e tubulações de acessórios à base de chumbo (Fatma, 1999). O chumbo e seus compostos também são utilizados em eletrodeposição e metalurgia (Fatma, 1999).

Assim, o conhecimento sobre substâncias poluentes é necessário, pois os níveis de toxicidade de uma substância em um determinado ambiente aquático variam de água para água e de espécie para espécie (Boyd, 1990; Welch e Lindell, 1992).

Frente à necessidade de maiores estudos sobre a influência dos metais pesados no processo de reprodução de peixes, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da contaminação da água por chumbo sobre a duração da motilidade espermática, sobre o processo de fertilização artificial e de incubação inicial dos ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*).

Material e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos Cultiváveis - Unioeste, instalado no Centro de Pesquisas em Aquicultura Ambiental – CPAA/IAP – Toledo, Estado do Paraná.

O experimento foi dividido em dois ensaios. No primeiro, foram utilizados diferentes níveis de chumbo na água empregada no processo de fertilização artificial dos ovócitos, sendo a incubação dos ovos fertilizados realizada em água limpa. No segundo, diferentes níveis de chumbo foram utilizados na água empregada nos processos de fertilização e também na água de incubação artificial dos ovos.

Para a realização de ambos os ensaios, foram utilizados 72 reprodutores de jundiá cinza, provenientes da própria estação de pesquisa. Durante o período que antecedeu os ensaios, os reprodutores foram estocados em um tanque escavado, revestido com concreto, fundo de terra e dimensão de 200 m^2, sem renovação de água e com abastecimento somente para compensar a água evaporada e infiltrada. Os peixes foram alimentados com dieta comercial processada na forma extrusada e com 32% de proteína bruta. Para a captura dos reprodutores, utilizou-se uma rede de arrasto de malha 11 mm, sendo a seleção realizada dentro do próprio tanque.

No primeiro ensaio, os reprodutores utilizados apresentavam peso médio ± desvio-padrão de 645 ± 138 g e 215 ± 45 g para fêmeas e machos, respectivamente. No segundo ensaio, os reprodutores utilizados apresentaram peso médio de 655 ± 266 g e 170 ± 34 g para fêmeas e machos, respectivamente.

Para ambos os ensaios, foram selecionadas fêmeas que apresentavam abdômen arredondado, papila urogenital avermelhada, coloração e tamanho dos ovócitos uniformes e machos que liberavam esperma com leve pressão da papila urogenital, conforme Woynarovich e Horváth (1983).

Os reprodutores selecionados foram individualmente pesados, marcados e separados por sexo em dois tanques, dotados de aeração e renovação constante de água. Aplicou-se, em seguida, uma dose única de 5,0 mg de extrato de hipófise de carpa (EHC) kg de reprodutor^{-1} e 3,0 mg EHC kg de reprodutor^{-1} para as fêmeas e os machos, respectivamente (adaptado de Bombardelli *et al*., 2006). As aplicações hormonais foram feitas de forma intramuscular, na região dorsal. Após as aplicações, a temperatura da água, nos tanques em que os peixes foram submetidos, foi monitorada frequentemente.

A coleta dos gametas femininos foi realizada após um período de 240 horas-grau ou unidades térmicas acumuladas (UTA), sendo os reprodutores contidos e secos com pano e papel toalha (Bombardelli *et al*., 2006). Em seguida, foi aplicada, individualmente, massagem na região ventral do animal sempre no sentido céfalo-caudal. Os primeiros ovócitos foram desprezados para evitar possível contaminação por urina ou fezes (Brooks *et al.*, 1997), sendo o restante dos ovócitos coletados e colocados em placa de Petri.

Após a retirada da quantidade de ovócitos necessária para os ensaios, foi realizada a mensuração da fecundidade. A fecundidade foi obtida por meio de estimativa amostral do número total de ovócitos não-hidratados utilizados nas incubadoras experimentais, adicionado ao número de ovos fertilizados e hidratados não-utilizados nas incubadoras experimentais.

A coleta dos gametas masculinos foi realizada de maneira idêntica às fêmeas. A primeira gota de sêmen também foi desprezada para evitar possível contaminação (Poupard *et al*., 1998) e o restante foi coletado em um tubo Falcon, com graduação de 0,1 mL, para mensuração do volume total de sêmen liberado e da produção relativa de sêmen.

A seguir, para ambos os ensaios, foi realizada a mistura do sêmen proveniente de todos os reprodutores, dando origem a dois pools de sêmen. Então, foram analisados concentração espermática, índice de sobrevivência espermática, pH seminal e tempo de ativação espermática. Tais análises foram realizadas especialmente para avaliar a condição reprodutiva dos machos e garantir o uso de gametas masculinos viáveis.

A mensuração da concentração espermática do sêmen foi realizada utilizando-se o método da contagem de células espermáticas (Streit Jr. *et al.,* 2004), em câmara hematimétrica de Neubauer (CSPZ) (espermatozoides (SPZ) mL^{-1}) (Billard *et al*., 1996). Para a mensuração da concentração espermática, utilizou-se amostra de 5 µL do sêmen que foi diluída em 5000 µL de formol salina tamponado, conforme Bombardelli *et al.* (2006), resultando em uma diluição de 1:1000.

A avaliação do índice de sobrevivência espermática (ISOB) foi realizada, a partir método de coloração eosina-nigrosina (Murgas *et al.,* 2003), utilizando-se de 30 µL de sêmen e 90 µL de cada corante, para a realização da mistura e, posteriormente, confecção do esfregaço. Após o processamento das lâminas, o material foi analisado em microscópio de luz em objetiva de 40x, sendo contados 400 espermatozoides, e células mortas apresentaram-se rosadas, pela absorção dos corantes, e os vivos não-corados, por serem impermeáveis aos corantes.

A leitura do pH seminal de cada pool de sêmen foi verificada por método colorimétrico, a partir de fita tornassol.

A determinação do tempo de ativação espermática de cada pool de sêmen foi realizada para o primeiro experimento, utilizando-se como solução ativadora a água não-contaminada. Para o segundo experimento, o mesmo parâmetro foi mensurado empregando-se como solução ativadora a água contaminada com diferentes níveis de chumbo, correspondentes aos níveis de contaminação utilizados para o segundo ensaio de fertilização. Para ambos os procedimentos, verificou-se o tempo necessário para a perda de motilidade de 50% dos espermatozoides, em microscópio óptico e objetiva de 40x (Sanches *et al.*, 2006).

Foram utilizados 12 machos e 12 fêmeas separados em quatro lotes para a realização do primeiro ensaio. Cada lote foi constituído por três fêmeas e três machos, dos quais foram originados os pools de ovócitos e sêmen, respectivamente, destinados aos ensaios de fertilização.

Para a composição da amostra de ovócitos proveniente deste pool, foi coletado 0,7 mL de ovócitos não-hidratados da porção total liberada de cada fêmea, totalizando o volume de 2,1 mL de ovócitos não-hidratados para cada unidade experimental.

De forma semelhante, foi realizada a composição do pool de sêmen dos três machos experimentais. Deste pool, foram retiradas, com auxílio de uma micropipeta, parcelas de 200 μL de sêmen para realizar a fertilização artificial dos ovócitos. Este volume de sêmen garantiu um número de espermatozóides $ovócito^{-1}$ superior ao encontrado por Bombardelli *et al*. (2006), de modo a não causar efeito deletério à fertilização.

Para a fertilização, foi utilizado um delineamento experimental em blocos casualizados, composto por seis tratamentos e quatro repetições cada. Os tratamentos foram constituídos pelo emprego de solução ativadora (água) contaminada com diferentes níveis de chumbo, referentes a 0,00; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 mg de PB L^{-1}. Foi considerada como unidade experimental uma incubadora de volume útil de 2,5 L, contendo 2,1 mL de ovócitos não-hidratados. Os ovócitos foram fertilizados com 200 μL de sêmen e ativados com 10 mL de solução ativadora. Os tratamentos foram aplicados com valores próximos ao limite máximo permitido pela resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - Conama (Brasil, 2005).

Para a incubação dos ovos, estes foram

submetidos a sucessivas lavagens em água descontaminada, para então serem colocados nas incubadoras. As incubadoras foram instaladas em um sistema de recirculação total, onde a água das incubadoras estava descontaminada, ou seja, livre de metais pesados. A água foi mantida aquecida em 27 ± 1ºC, a partir de um sistema de aquecimento de água dotado de resistência elétrica e termostato.

As taxas de fertilização foram mensuradas 8h após o início da hidratação dos ovos, utilizando-se, aproximadamente, 800 ovos de cada unidade experimental (adaptado de Zaniboni Filho, 1992).

No segundo ensaio, foram utilizados 24 fêmeas e 24 machos, os quais foram divididos em seis lotes com quatro casais em cada um. A coleta do sêmen e dos ovócitos foi realizada de forma semelhante ao primeiro ensaio, exceto para a composição dos pools de gametas, onde foram utilizados quatro indivíduos ao invés de três. Dessa forma, para a composição do pool de ovócitos, foi coletada uma amostra de 0,5 mL de ovócitos de cada fêmea, resultando em um pool de 2,0 mL de ovócitos para cada unidade experimental. A coleta do sêmen foi realizada de forma idêntica ao primeiro experimento.

Com base nos resultados do primeiro ensaio e ensaios-piloto, as doses de chumbo das soluções ativadoras empregadas no segundo ensaio foram aumentadas, a fim de verificar os níveis prejudiciais deste metal à fertilização artificial dos ovócitos do jundiá. A fertilização dos ovócitos foi realizada de forma semelhante ao primeiro ensaio, contudo utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram compostos pelos níveis de contaminação da água de fertilização e incubação de 0,00; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 mg de PB L^{-1}. De forma semelhante ao ensaio anterior, após a fertilização, os ovos foram transferidos para incubadoras de volume útil de 2,5 L, em sistema de recirculação total. Foi considerada como uma unidade experimental uma incubadora de 2,5 L, contendo 2,0 mL de ovócitos fertilizados com 200 μL de sêmen. A temperatura da água foi mantida aquecida em 27 ± 1ºC, a partir de um sistema de aquecimento de água dotado de resistência elétrica e termostato. A água utilizada para a incubação dos ovos tinha origem de poço artesiano e apresentava níveis de 0,29 mg L^{-1} de nitrato, 0,0038 mg L^{-1} de nitrito, 0,126 mg L^{-1} de amônia, dureza de 43,96 mg L^{-1}, alcalinidade de 996,30 µEq L^{-1}, pH igual a 6,80 e 4,26 mg L^{-1} de oxigênio dissolvido.

As taxas de fertilização foram mensuradas de forma idêntica ao primeiro ensaio.

Exceto os resultados das taxas de fertilização dos ovócitos do tratamento contendo 0,75 mg de Hg L^{-1} do segundo ensaio, os demais resultados das taxas de fertilização de ambos os ensaios foram submetidos à análise de regressão Linear Response Plateau (LRP) ao nível de 5% de probabilidade. O software utilizado para a realização destas análises estatísticas foi o SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas) (UFV, 1997).

Resultados e discussão

A fecundidade relativa média ± desvio-padrão, observada nas fêmeas utilizadas em ambos os ensaios, foi de 127 ± 23 ovócitos g de fêmea^{-1}e de 99 ± 32 ovócitos g de fêmea^{-1} para o primeiro e o segundo ensaio, respectivamente.

O sêmen produzido pelos machos de ambos os ensaios apresentaram, respectivamente, para o primeiro e o segundo ensaio, as médias de 11,3 ± 2,4 e 7,2 ± 2,9 mL de sêmen liberado, 53,7 ± 14,9 e 41,8 ± 12,0 mL de sêmen kg de reprodutor^{-1}, 8,6 ± 0,3 e 8,6 ± 0,2 de pH seminal, 99,1 ± 0,4 e 95,2 ± 5,7% de espermatozoides vivos, 4,2 x 10^{10} ± 0,5 x 10^{10} e 3,4 x 10^{10} ± 0,6 x 10^{10} SPZ mL de sêmen^{-1} e 26,2 ± 3,4 e 23,9 ± 2,7 segundos de tempo de ativação espermática.

Em ambos os ensaios, a fecundidade relativa variou de 50 a 161 ovócitos g de fêmea^{-1}. Bombardelli *et al*. (2006) verificaram em um pool de ovócitos proveniente de duas fêmeas de jundiá uma fecundidade relativa de aproximadamente 148 ovócitos g de fêmea^{-1}.

Bombardelli *et al.* (2006) constataram que indivíduos da mesma espécie apresentaram produção espermática relativa de 36,0 mL de sêmen kg de reprodutor^{-1}. No entanto, sabe-se que o volume de sêmen liberado pelos reprodutores não pode ser considerado como o volume total do sêmen produzido pelo macho, uma vez que o método de coleta, a partir da extrusão, não garante a liberação total do sêmen presente nas gônadas (Ferreira *et al*., 2001). Além disso, a produção seminal é influenciada por diversos fatores, como o tamanho do indivíduo, época e metodologia de coleta (Luz *et al*., 2001).

A concentração espermática encontrada por Bombardelli *et al*. (2006) para o *Rhamdia quelen* foi de 1,97 x 10^{10} SPZ mL^{-1} e por Kavamoto e Flogi da Silveira (1986) para *Rhamdia hilarii*, de 6,35 x 10^{10} SPZ mL^{-1}. Tais diferenças da concentração espermática verificada são, normalmente, evidenciadas em espécie de peixes teleósteos (Godinho, 2007). Além disso, vários são os fatores influentes nesta concentração, como a realização de indução hormonal ou não (Kavamoto e Flogli da

Silveira, 1986), os hormônios utilizados na indução hormonal (Streit Jr. *et al*., 2004) e a época de coleta (Borges *et al*., 2005).

O índice de sobrevivência espermática analisada pelo processo de coloração eosina – nigrosina demonstrou que os 99,1 ± 0,4 e 95,2 ± 5,7% de espermatozoides vivos, alcançados em ambos os ensaios, foram semelhantes aos 96% verificados por Bombardelli *et al.* (2006) para o jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). Considerando-se que o índice de sobrevivência espermática apresenta relação com a motilidade espermática, tais índices apresentam-se elevados quando comparados com os resultados de motilidade espermática de 88,3%, encontrados por Ferreira *et al.* (2001) para peixes da mesma espécie, induzidos hormonalmente.

Observou-se que, para ambos os ensaios, o tempo de ativação espermática, utilizando água não-contaminada, foi semelhante ao tempo encontrado por Sanches *et al*. (2006), para indivíduos da mesma espécie.

No segundo ensaio, os espermatozoides foram submetidos à ativação com a água contaminada com os mesmos níveis de chumbo definidos para os respectivos tratamentos. Verificou-se que o tempo de ativação foi reduzido a partir do momento em que as concentrações de chumbo foram aumentadas. O tempo de duração da motilidade espermática reduziu de 27,2 s, quando os espermatozoides foram expostos a 0,0 mg de Pb L^{-1}, para 21,0 s a 0,75 mg de Pb L^{-1}. Estes resultados são importantes e podem subsidiar futuras discussões, já que as taxas e o tempo de duração de motilidade espermáticas podem ser utilizados como um método apurado e sensível de bioindicação de poluição aquática (Kime *et al.,* 1996).

As taxas de fertilização de ovócitos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) fertilizados com soluções ativadoras, contendo diferentes níveis de contaminação por chumbo e incubação em água não-contaminada, não apresentaram efeito dos tratamentos ($p > 0,05$). Contudo, os resultados variaram de 81,92 a 97,14% de fertilização artificial, taxas estas consideradas elevadas e adequadas para o padrão da espécie em condições normais de criação (Baldisserotto e Radunz-Neto, 2004).

Este efeito, possivelmente, ocorreu pelo fato de que as concentrações de chumbo presentes na água experimental estavam próximas do limite máximo aceito para a potabilidade (0,01 mg Pb L^{-1} em água doce de classe 1 e de 0,033 mg Pb L^{-1} para classe 3) determinado pela Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – Conama (Brasil, 2005). Portanto, os níveis de contaminação por chumbo utilizados, neste ensaio, foram insuficientes para causar efeitos deletérios à fertilização artificial e, possivelmente, estes efeitos sobre os organismos aquáticos, caso existam, devem ser verificados apenas em longo prazo.

Os resultados das taxas de fertilização de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*), fertilizados com soluções ativadoras e incubados em água contendo diferentes níveis de contaminação por chumbo (segundo ensaio), estão expressos na Figura 1.

Os resultados de fertilização apresentaram efeito ($p < 0,05$) significativo entre os tratamentos, sugerindo comportamento de plateau, ou seja, sem efeito ($p > 0,05$) entre os tratamentos até a concentração de 0,25 mg de PB L^{-1}, mantendo taxa de fertilização de 80,36% dos ovócitos (Figura 1). A partir dessa concentração, os resultados indicaram efeito ($p < 0,05$) linear, inversamente proporcional entre os níveis crescentes de Pb e as taxas de fertilização até o nível de contaminação de 0,60 mg Pb L^{-1} (Figura 1). Curiosamente, a partir de 0,60 mg Pb L^{-1}, foi verificado aumento na taxa de fertilização para o tratamento contendo 0,75 mg de Pb L^{-1} (Figura 1).

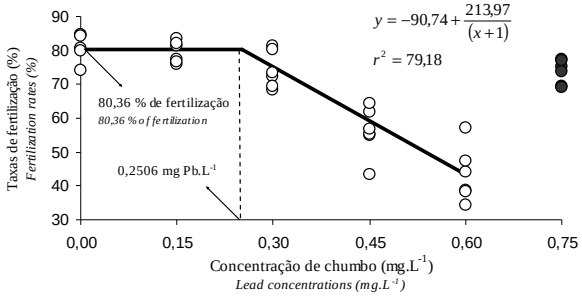

Figura 1. Taxas de fertilização de ovócitos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) fertilizados com solução ativadora e incubados em água, contendo diferentes níveis de contaminação por chumbo.
Figure 1. *Fertilization rate of eggs of gray jundiá (Rhamdia quelen) fertilized with activation solution and incubation water containing different levels of lead.*

A menor taxa de fertilização verificada ($p < 0,05$) foi do tratamento contendo 0,60 mg de Pb L^{-1} dissolvido na água, apresentando 43,4 % de sucesso na fertilização. Uma explicação para o resultado, no que se refere ao decréscimo das taxas de fertilização, pode ser por possíveis interações entre o poluente e a micrópila, o que pode impedir a entrada do espermatozoide para a fertilização do ovócito (Kime, 1995).

Além disso, a presença de substâncias tóxicas, como os metais pesados, nas soluções ativadoras pode causar efeitos diretos sobre a qualidade do sêmen (Rurangwa *et al*., 2004), especialmente na ativação espermática e, consequentemente,

prejudicar o processo de fertilização artificial dos ovócitos (Kime e Nash, 1999). Witeck (2007) verificou efeito de redução do tempo de ativação espermática em espermatozoides de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*), quando a solução ativadora utilizada apresentava níveis crescentes de contaminação por cádmio. Efeito semelhante foi verificado por Rurangwa *et al*. (1998) em espermatozoides de bagre africano (*Clarias gariepinus*), quando expostos à água contaminada por mercúrio. Estes últimos autores sugerem que o mercúrio pode interferir diretamente sobre o metabolismo espermático por induzir alterações na função mitocondrial do espermatozoide, que geram impacto na energia mitocondrial e prejudicam a tradução dos movimentos do flagelo, mesmo em baixas concentrações.

Abascal *et al*. (2007), em experimento realizado com *Dicentrarchus labrax,* testaram níveis de cloretos de chumbo, cobre e mercúrio, com níveis de 0,0 a 100,0 mg L^{-1}. Para chumbo e cobre, não houve resultados significativos que interferissem na motilidade espermática. No entanto, o mercúrio apresentou relação inversamente proporcional entre a velocidade de deslocamento linear dos espermatozoides e o aumento dos níveis de mercúrio na solução ativadora. Estes resultados mostraram inibição da motilidade espermática em concentrações de 100 mg de $HgCl_2$ L^{-1}. Além disso, segundo os mesmos autores, os espermatozoides que estiveram expostos a soluções que contém mercúrio apresentaram graves alterações morfológicas flagelares, principalmente, pela alteração da membrana celular.

Rurangwa *et al*. (1998), estudando os efeitos do mercúrio sobre a fertilização artificial do bagre africano (*Clarias gariepinus),* obtiveram as menores taxas de fertilização referentes a 13,5% para a concentração de 1,0 mg Hg^{2+} L^{-1}. Witeck (2007), ao expor os ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) a diferentes soluções contendo concentrações crescentes de cádmio, observou resultados das taxas de fertilização semelhantes aos do presente experimento, no entanto os níveis aplicados variaram de 0,0 a 110,0 mg de Cd L^{-1}.

Quando em altas concentrações, além de causar a redução da taxa de fertilização de ovócitos (Figura 1), o chumbo causa efeitos deletérios aos espermatozoides. Lahnsteiner *et al*. (2004) observaram que os espermatozoides das espécies *Clarias gariepinus*, *Salmo trutta fario*, *Leuciscus cephalus*, *Lota lota* apresentaram-se sensíveis à exposição por chumbo. Para estas espécies, estes autores verificaram a redução da taxa de motilidade espermática, redução de movimentos lineares, aumento de movimentos circulares e diminuição da velocidade de batimentos flagelares. Além disso, esses autores verificaram que cada espécie apresenta concentrações letais diferentes para o mesmo contaminante, e os efeitos causados por estes contaminantes afetam a direção, a velocidade e as taxas de motilidade espermática. Efeitos semelhantes nas características espermáticas também foram evidenciados pelos autores para o cádmio, zinco e mercúrio.

Au *et al.* (2000) verificaram, igualmente, o efeito do cádmio na motilidade espermática e, ademais, observaram que a redução da motilidade espermática se deve principalmente à deformação dos espermatozoides, principalmente pela vacuolização na região da peça intermediária e pela alteração das mitocôndrias, afetando, consequentemente, a movimentação espermática.

Dessa forma, essas informações levam a sugerir que a redução da motilidade espermática pode ter colaborado na redução das taxas de fertilização (Figura 1).

Outro efeito deletério dos metais pesados sobre a reprodução pode estar relacionado com a agressão ou injúrias causadas às membranas celulares dos gametas e/ou ovos embrionados (Brooks *et al.*, 1997). Almeida *et al*. (2001) sugerem que metais como o cádmio podem apresentar tal efeito pelo seu grande potencial de oxirredução, em função da liberação de radicais de oxigênio livres.

Além disso, os ambientes aquáticos naturais, principalmente aqueles que cortam grandes centros urbanos do mundo, são os principais locais de descarga de poluentes e, portanto, são os principais locais em que ocorre interferência sobre processo reprodutivo dos peixes (Sumpter, 1997).

Os resultados do presente trabalho indicam, ainda, que níveis crescentes de chumbo, acima de 0,60 mg de Pb L^{-1}, promoveram aumento nas taxas de fertilização (Figura 1). Apesar de os resultados do tratamento contendo 0,75 mg L^{-1} não terem sido incluídos nas análises estatísticas, este tratamento apresentou média de fertilização de 73% (Figura 1). Esse resultado não foi incluído nas análises estatísticas pela falta de evidências para explicar biologicamente esse efeito, contudo, considerou-se importante a sua menção, uma vez que o tratamento foi repetido duas vezes e, em ambos os casos, o mesmo resultado (73 %) foi obtido. Isto sugere que tal efeito, possivelmente, não possa ser atribuído a um erro experimental e, sim, a alguma interação química e/ou biológica entre o contaminante e o ambiente experimental e/ou os animais. Dentre estas

interações, pode-se mencionar a possível complexação com outros compostos presentes na água e consequente precipitação do chumbo.

Sugere-se que novos estudos sejam realizados para que se possam elucidar os efeitos dos processos de contaminação dos corpos hídricos sobre as comunidades aquáticas e, especialmente, proporcionar maiores conhecimentos sobre os mecanismos que governam os efeitos dos metais pesados sobre a reprodução de peixes. Além disso, os resultados de novas pesquisas poderão subsidiar futuramente as instituições de fiscalização quanto aos níveis de contaminação toleráveis e suas consequências ao meio ambiente.

Conclusão

Conclui-se que a contaminação da água por chumbo (Pb), do momento da fertilização até as primeiras 8h de incubação artificial dos ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*), a uma concentração superior a 0,25 mg L^{-1}, causa efeito deletério sobre o percentual de ovos fertilizados.

Referências

ABASCAL, F.J. *et al.* Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *J. Fish Biol.*, London, v. 70, p. 509-522, 2007.

ALMEIDA, J.A. *et al*. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilápia (*Oreochromis niloticus)* exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.*, New York, v. 27, p. 673-679, 2001.

AU, D.W. *et al*. Effects of cadmium and phenol on motility and ultrastructure of sea urchin and mussel spermatozoa. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, v. 38, p. 455-463, 2000.

BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ-NETO, J. *Criação de jundiá.* Santa Maria: UFSM, 2004.

BILLARD, R. *et al.* Sperm physiology and quality. *In:* BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Ed.). *Broodstock management and egg and larval quality*. London: Blackwell Science, 1996. p. 25-52.

BOMBARDELLI, R.A. *et al.* Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia Quelen* (Quoy *e* Gaimardm, 1824). *Rev. Bras. Zootec.*, Visçosa, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

BOOCK, M.V.; MACHADO NETO, L.G. Estudos sobre a toxicidade aguda do oxicloreto de cobre para o peixe *Poecilia reticulata. Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 29-35, 2005.

BORGES, A. *et al.* Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiol. Biochem.*, Amsterdam, v. 31, p. 45-53, 2005.

BOYD, C. *Water quality in ponds for aquaculture.* Alabama: Birmingham Publishing, 1990.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, de março de 2005.* Disponível em: <*www.iap.com.br*>. Acesso em: 10 jul. 2006.

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

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

FERREIRA, A.A. *et al.* Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.

GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev. Bras. Reprod. Anim.,* Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GOMES, L.C. *et al.* Biologia do jundiá *Ramdia quelen* (teleostei, pimelodidae). *Cienc. Rural,* Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

JEZIERSKA, B. *et al.* Malformations of newly hatched common carp larvae. *Electron. J. Pol. Agric. Univ.*, *Fisheries,* Wroclaw, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2000. Disponível no site: <*http://www.ejpau.media.pl*>. Acesso em: 19 maio 2007.

KAVAMOTO, E.T.; FLOGI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes,1840) em condições de campo. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 95-100, 1986.

KIME, D.E. The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, London, v. 5, n.1, p. 52-96, 1995.

KIME, D.E.; NASH, J.P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *Sci. Total Environ.*, Amsterdan, v. 233, p. 123-129, 1999.

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

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

LUZ, R.K. *et al.* Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (pimelodidae). *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 39-42, 2001.

MARCHIORO, M.I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy *e* Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. *Cienc. Rural,* Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 315-318, 1999.

MARTINEZ, C.B.R. *et al*. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus. Braz. J. Biol.*, São Carlos, v. 64, n. 4, p. 797-807, 2004.

MURGAS, L.D.S. *et al.* Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba *Bbrycon orbignyanus*, Vallenciennes, 1849). *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 32,

n. 6, p. 1810-1814, 2003. Supl. 2.

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

POUPARD, G.P. *et al.* Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 160, p. 317-328, 1998.

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

RURANGWA, E. *et al*. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 234, p. 1-28, 2004.

SANCHES, E.A. *et al.* Desempenho reprodutivo de machos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) (Quoy *e* Gaimard, 1824) submetidos a dietas contendo diferentes níveis de energia digestível. *In:* SIMPÓSIO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PESCA, 1.; SIMPÓSIO PARANAENSE DE ENGENHARIA DE PESCA, 3.; SEMANA ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE PESCA, 8., 2006, Toledo. *Anais...* Toledo: Unioeste, 2006.

SARNOWSKI, P. The effects of metals on swimbladder inflation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Electron. J. Pol. Agric. Univ., Fisheries*, Wroclaw, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2004. Disponível em: <*http://www.ejpau.media.pl*>. Acesso em: 19 maio 2007.

SILFVERGRIP, A.M.C. *A sistematic revision of the neotropical catfish genus Rhamdia (teleostei, pimelodidae).*1996. Thesis (Doctorship in Zoology)-Departament of Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, 1996.

SISINNO, C.L.S. *et al*. Toxicity evaluation of a municipal dump leachate using zebrafish Acute Tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*., New York, v. 64, p. 107-113, 2000.

STREIT JR., D.P.W. *et al.* Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.,* São Paulo, v. 41, p. 147-153, 2004.

SUMPTER, J.P. Environmental control of fish reproduction: a different perspective. *Fish Physiol. Biochem.*, Amsterdam, v. 17, p. 25-31, 1997.

UFV-Universidade Federal de Viçosa. *SAEG - sistema para análises estatísticas e genéticas*: versão 7.1. Viçosa: UFV, 1997. Manual do usuário.

VINATEA ARANA, L. *Princípios químicos de qualidade da água em aqüicultura*: uma revisão para peixes e camarões. Florianópolis: UFSC, 1997.

WELCH, E.B.; LINDELL, T. *Ecological effects of wastewater*: aplied limnology and pollutant effects. Cambridge: Syndicate of the University of Cambridge, 1992.

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

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: Escopo, 1983.

ZANIBONI FILHO, E. *Incubação, larvicultura e alevinagem do Tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier, 1818).* 1992. Tese (Doutorado em Ecologia de Recursos Naturais)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1992.

Received on September 06, 2007.
Accepted on May 06, 2008.