

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Mudanças climáticas previstas para o final do
século afetam o desempenho e o
desenvolvimento esquelético de larvas de
tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

Ivã Guidini Lopes

Jaboticabal, São Paulo

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Mudanças climáticas previstas para o final do
século afetam o desempenho e o
desenvolvimento esquelético de larvas de
tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

Ivã Guidini Lopes

Orientador: Maria Célia Portella

Co-orientador: Adalberto Luis Val

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2016

L864m Lopes, Ivã Guidini
Mudanças climáticas previstas para o final do século afetam o desempenho e o desenvolvimento esquelético de larvas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Ivã Guidini Lopes. – – Jaboticabal, 2016
62 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientadora: Maria Célia Portella

Banca examinadora: Alzira Miranda de Oliveira, Lizandra Amoroso

Bibliografia

1. Microcosmos. 2. Larvas-temperatura 3. Deformidades esqueléticas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3.034

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “Mudanças climáticas previstas para o final do século afetam o desempenho e o desenvolvimento esquelético de larvas de tambaqui (*Colossoma macropomum*)”

AUTOR: IVÃ GUIDINI LOPES

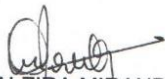
ORIENTADORA: MARIA CÉLIA PORTELLA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, área: Biologia Aquática, pela Comissão Examinadora:

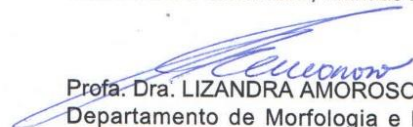


Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



p/ Profa. Dra. ALZIRA MIRANDA DE OLIVEIRA
Universidade Nilton Lins, Manaus-AM



Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Angela Guidini e Antônio Sebastião Lopes pelo amor incondicional, carinho em suas palavras, apoio e dedicação de corpo e alma para que eu conseguisse atingir meus objetivos. À vocês sou eternamente grato.

À Dra. Maria Célia Portella pelo incentivo, orientação, dedicação e suporte pessoal desde os primeiros dias dessa jornada. Sem seu auxílio e amparo essa realização não seria possível.

Ao Dr. Adalberto Luis Val pela calorosa recepção, compreensão, auxílio e investimento profissional e pessoal ao longo da minha estadia em Manaus. Um exemplo a ser seguido! Foi um prazer imenso poder trabalhar ao seu lado.

À MSc. Nazaré Paula por toda a paciência, pelo carinho em suas palavras e ricos ensinamentos pessoais e profissionais ao longo da minha jornada no LEEM. Todos precisamos de uma mãezona como a Naza!

Ao Prof. Dr. Francisco Langeani por ter me recebido em seu laboratório e por ter pacientemente me ensinado o processo de diafanização.

À minha querida família por todo o apoio que me dão e pela compreensão de minha ausência ao longo dessa jornada. O valor que a família exerce sobre o indivíduo é inestimável.

À minha querida Lara Zácari Fanali pela compreensão em meus momentos de ausência e pelo amor incondicional demonstrado e praticado ao longo desses dois anos.

Às amigas Thyssia Bomfim e Juliana Tomomi por me acompanharem no momento mais importante ao longo do mestrado e por enfrentarem todos os desafios que nos pareciam impossíveis de vencer. Sou eternamente grato a vocês.

Aos amigos do mestrado, Frederico Werneck, Juliano Coutinho, Ligia Neira, Rudney Weber, Lidiane Sandre, Caroline Nebo, Jesaias Ismael, Thiago Mendes, Thiago Torres, Natália Leitão, Thalys Vinícius, Andressa Innocente, Amanda Halum, Rodrigo Gimbo, Rafael Serafini, Ximena e Alejandra pelos momentos de apoio, compreensão e amizade.

Aos meus grandes amigos do LEEM, Renan Amanajás, Arlan Paz, Frederico Delunardo, Luciana Bastos, Vivianne Fonseca, Alzira Miranda, Luciana Fé e Jéssica Oliveira pelo companheirismo, apoio emocional e ajuda para o desenvolvimento do trabalho. Muita admiração por esse grupo.

Aos meus parceiros de casa Luis Patrone e William Bruno pela amizade, boas risadas e pela paciência em situações de desespero.

Aos todos meus amigos de Rio Preto que, mesmo à distância sempre demonstraram total apoio, amizade e amor ao longo desse tempo.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP pelo mestrado e ao INPA pela colaboração e parceria. Ao Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos pelo apoio logístico, financeiro e por ser minha casa ao longo desses dois anos.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, à PROPG pelo apoio financeiro e ao Projeto INCT/ADAPTA pelo apoio logístico e financeiro deste trabalho.

A todos que de alguma forma me possibilitaram chegar até aqui, meus sinceros agradecimentos!

DEDICATÓRIA

A Angela Guidini pelo amor e apoio incondicional

A Antônio Sebastião Lopes pelo exemplo de vida a ser seguido

DEDICO

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Causas e Consequências das Mudanças Climáticas	8
1.2 O IPCC: Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas.....	11
1.3 Mudanças Climáticas, Amazônia e Organismos Aquáticos.....	12
1.4 Desenvolvimento Inicial de Peixes Neotropicais e Esqueletogênese	15
1.5 O Tambaqui	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Obtenção das Larvas e Local do Estudo	21
3.2 Delineamento Experimental	22
3.3 Obtenção das Amostras	23
3.4 Acompanhamento da Qualidade de Água	24
3.5 Análises Estatísticas.....	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Simulação dos Cenários Climáticos em Microcosmos	25
4.2 Parâmetros Físico-Químicos da Água.....	25
4.3 Desempenho Zootécnico	26
4.4 Osteogênese e Incidência de Anomalias Esqueléticas.....	27
4.5 Análises Exploratórias dos Dados	29
5. DISCUSSÃO	30
5.1 Estudos de mudanças climáticas em microcosmos	30
5.2 Consequências das Mudanças Climáticas sobre o Desempenho Zootécnico do Tambaqui..	31
5.3 Desenvolvimento esquelético e anomalias	35
6 CONCLUSÕES.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
8. LEGENDAS DE TABELAS	52
9. LEGENDAS DE FIGURAS	53
10. FIGURAS E TABELAS	55

RESUMO

O aumento das emissões de gases de efeito estufa compõe uma das principais causas do aquecimento global. As mudanças no clima decorrentes de tal fator vêm ocorrendo em grau cada vez mais acelerado, afetando a dinâmica ambiental e, conseqüentemente, as espécies viventes. Dentre os biomas afetados, a região Amazônica está especialmente sujeita a impactos negativos, haja visto o desmatamento, o regime de chuvas sazonal e as ingerências antropogênicas locais. Logo, as espécies aquáticas nessa região poderão ser afetadas devido ao aumento das temperaturas médias e acidificação dos corpos d'água. O presente estudo teve por objetivo avaliar possíveis impactos das mudanças climáticas previstas para o final do século sobre o crescimento e o desenvolvimento inicial de uma importante espécie íctica Amazônica, o tambaqui, por meio de avaliações de desempenho zootécnico e do acompanhamento inicial do processo de osteogênese e aparecimento de anomalias esqueléticas. Larvas recém-eclodidas foram dispostas em aquários com capacidade para nove litros (densidade inicial de 35 larvas/L), em sistema de recirculação de água. Cada conjunto de 10 aquários estava localizado em quatro salas climatizadas com controle em tempo real de temperatura, umidade e concentração de CO₂, representando três cenários de mudanças climáticas previstos pelo IPCC: brando (B1), moderado (A1B) e drástico (A2), além da sala controle, a qual representava o cenário atual (Atual). O experimento teve duração de 16 dias, nos quais foram realizadas amostragens periódicas das larvas. Após aquisição dos dados biométricos, as larvas passaram pelo processo de diafanização, de modo a avaliar o desenvolvimento ósseo inicial e o aparecimento de anomalias esqueléticas. A exposição aos cenários de mudança climática resultou em baixa sobrevivência das larvas, principalmente nos cenários A1B e A2. Os índices de desempenho zootécnico das larvas dos cenários B1 e A1B foram superiores quando comparadas às dos cenários Atual e A2, com exceção do fator de condição alométrico, superior nos cenários Atual e A1B. No entanto, as análises esqueléticas revelaram alta incidência de anomalias esqueléticas nas larvas submetidas aos cenários A1B e A2, como resultado da combinação entre o aumento da temperatura e a acidificação da água. Além disso, o processo de coloração óssea revelou que aos 16 dias pós eclosão, o sistema esquelético das larvas era ainda cartilaginoso, não apresentando mineralização óssea. Os resultados de desempenho zootécnico apontam que o tambaqui é uma espécie bem adaptada a temperaturas elevadas e que poderá sobreviver às alterações climáticas mais amenas. Porém, frente à condições mais severas, o desenvolvimento inicial da espécie poderá ser comprometido, como observado nos resultados de anomalias esqueléticas.

Palavras-Chave: microcosmos; alterações climáticas; anomalias esqueléticas; temperatura

ABSTRACT

Increasing greenhouse gases emissions make up one of the main causes of global warming. Climatic changes arising from such factors have been occurring in an accelerated degree, affecting environmental dynamics and, consequently, the living species. Among all affected biomes, the Amazon region is particularly subjected to adverse impacts, such as deforestation, seasonal precipitation and negative anthropogenic interferences present locally. Hence, Amazonian aquatic species may be affected due to the increase in average temperatures and water acidification. This study aimed at evaluating possible impacts of predicted climate change on the initial growth and development of an important Amazonian fish, the tambaqui, by means of growth performance and by monitoring the initial osteogenic process and the emergence of skeletal abnormalities. Newly hatched tambaqui larvae were placed in 9L tanks (initial density of 35 larvae/L), displayed in water recirculation system. Each system containing 10 tanks was located in four conditioned rooms with real-time control of temperature, humidity and CO₂ concentration, representing three climate change scenarios predicted by the IPCC: mild (B1), moderate (A1B) and drastic (A2), besides the control room, representing the current scenario (Atual). The experiment lasted for 16 days, in which periodic samplings were taken. After biometric data acquisition, the larvae underwent a bone staining process, in order to access osteogenesis process and to verify skeletal abnormalities. The exposure to climate change scenarios resulted in low survival, mainly in A1B and A2. Productive performance of B1 and A1B larvae were higher when compared to Atual and A2 scenarios, with the exception of allometric condition factor, higher in Atual and A1B. However, skeletal analysis revealed high incidence of abnormalities in larvae subjected to A1B and A2 scenarios, due to the combination between temperature rise and water acidification. Furthermore, bone-staining process revealed that after 16 days post-hatch, larvae skeletal structures were still cartilaginous, displaying no mineralization. By means of the productive performance data, we observe that the tambaqui is a well-adapted species to high temperatures that may survive in milder climate change. However, facing more severe climate conditions, initial development may be compromised, as observed in skeletal abnormalities results.

Key Words: microcosms; climate change; skeletal anomalies; temperature.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Causas e Consequências das Mudanças Climáticas

Modificações nos padrões climáticos globais têm sido registradas há décadas (FAO, 2014) e, cada vez mais, a comunidade científica direciona recursos e investe em pesquisas sobre o tema, visando a compreensão de tais alterações e como estas atuam nos sistemas climáticos e biológicos. O conhecimento gerado sobre as mudanças climáticas deve ser divulgado a fim de se buscar a mitigação de seus possíveis efeitos deletérios na população humana e na diversidade biológica.

As causas e consequências das mudanças climáticas compõem tópico interessante de discussão, principalmente entre a população e a comunidade científica. Uma expressiva amostra da população não acredita na influência antropogênica sobre o clima, creditando tais mudanças singularmente às causas naturais. No entanto, a comunidade científica de maneira geral contesta que tais modificações sejam causadas somente por fatores naturais, e muitas pesquisas comprovam que o homem participa efetivamente da modificação do clima (Karl e Trenberth, 2003; Rosenzweig et al., 2008; Friedlingstein et al., 2010).

Podemos citar diversas causas naturais que contribuem para o aquecimento global, como, por exemplo, registros do aumento da atividade na superfície do Sol (Friis-Christensen e Lassen, 1991), que provocam maiores emissões de raios ultravioleta, ou incêndios florestais de ocorrência natural, responsáveis pela liberação de grandes quantidades de carbono na atmosfera (Page et al., 2002). Outro evento natural é o derretimento do *permafrost* - tipo de solo permanentemente congelado presente na região do Ártico - o qual possui grande quantidade de carbono armazenado. O derretimento desta camada de solo em larga escala libera carbono na água e na atmosfera, contribuindo para o aumento das temperaturas globais (Schaefer et al., 2011; Koven et al. 2015).

Ademais, erupções vulcânicas liberam grandes quantidades de gases na atmosfera, os quais são potencialmente prejudiciais para o clima (Self e Rampino, 1988; Mass e Portman, 1989) e para a saúde, como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), dióxido de enxofre (SO₂), dentre outros. Entretanto, em alguns casos, o gás predominantemente liberado durante uma erupção vulcânica é o vapor de água (H₂O) e, de maneira geral, os vulcões são responsáveis por

pequena parcela da quantidade total de gases de efeito estufa (GHG, pela sigla em inglês) liberados na atmosfera (Gerlach, 2011). Constata-se que as emissões de CO₂ por atividades humanas compõem a principal contribuição para o aquecimento global (Friedlingstein et al., 2010).

As influências que as atividades humanas exercem no ambiente e que contribuem para a mudança do clima são claras e permanecerão ocorrendo por séculos (Karl e Trenberth, 2003) (Figura 1). Segundo estimativas feitas a partir de modelos climáticos, caso as emissões de GHG (principalmente pela queima de combustíveis fósseis e processos industriais) se mantiverem pelas próximas décadas, algumas regiões do planeta poderão sofrer aquecimento de até 6 °C até o final do século (Nobre et al., 2007). Segundo dados do quinto relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas - *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), aumentos tão drásticos da temperatura média global podem gerar consequências como a extinção de espécies e o comprometimento da segurança alimentar (IPCC, 2014).

Registros antigos da temperatura mundial, quando confrontados com os atuais, revelam que nas últimas décadas houve aumento expressivo da média global. A combinação entre a temperatura dos continentes e oceanos revela aumento médio de 0,85 °C entre 1880 e 2012 (IPCC, 2014). Tais registros são variáveis entre regiões, sendo que as taxas de aquecimento global (geralmente calculadas por década) são diretamente afetadas por eventos naturais locais como o El Niño ou por ingerências antropogênicas expressivas (IPCC, 2014).

O fenômeno El Niño é caracterizado pelo aquecimento anormal das águas superficiais do Oceano Pacífico, influenciando no clima regional e global devido às trocas de energia e umidade entre o oceano e a atmosfera, podendo afetar também a dinâmica dos ventos na região equatorial. Por conta de tais modificações nos ventos e na umidade, mudanças tanto na temperatura quanto na distribuição de chuvas são passíveis de ocorrer, causando problemas climáticos locais. Este fenômeno geralmente ocorre em intervalos de até 10 anos, chegando a durar até mais de 12 meses.

Os eventos El Niño mais intensos ocorreram nos anos de 1982/83 e 1997/98 e foram marcados por alterações significativas nos padrões climáticos globais

(McPhaden, 1999). Tais modificações foram responsáveis por eventos extremos de chuvas, de seca e de aumento da temperatura atmosférica, levando a grandes perdas financeiras e efeitos negativos na biodiversidade local (Jaksic, 2001). Existem evidências de que aumentos na emissão de GHG podem ser responsáveis pela ocorrência mais frequente de eventos mais severos (Cai et al., 2014), destacando uma das causas antropogênicas sobre a mudança do clima.

Além de efeitos naturais, o homem também é diretamente responsável por modificações nos padrões climáticos globais. A derrubada de florestas, por exemplo, traz consequências quase irreparáveis para o meio ambiente. Dezenas ou centenas de anos são necessários para que uma área desmatada se recupere, enquanto em alguns casos, como o da floresta amazônica, este é um processo mais árduo por conta do solo arenoso desfavorável, pobre em nutrientes (Werth e Avissar, 2002). A substituição de áreas florestais por campos de plantio ou pastos gera uma problemática para o equilíbrio do ciclo do carbono, concentrando cada vez mais este gás na atmosfera.

Desde meados do século XVI o desmatamento no Brasil vem crescendo. Segundo levantamento realizado em 2008, a cobertura vegetal remanescente no Estado de São Paulo não representa mais de 13% da original (Nalon et al., 2008). Já na região Amazônica, a derrubada de áreas florestais é mais intensa e de difícil controle, visto a grandeza do território e a presença de áreas mais afastadas. Segundo Zhao et al. (2001), padrões climáticos regionais são afetados pela modificação na cobertura vegetal local, podendo comprometer sistemas físicos e biológicos.

Seja por causas naturais ou antropogênicas, a mudança do clima traz diversas outras consequências além do aumento da temperatura atmosférica. Os ciclos hidrológicos também estão sendo afetados por mudanças na precipitação, pelo derretimento das calotas polares e pela elevação da temperatura dos oceanos. Segundo previsões climáticas para o final do século, regiões áridas sofrerão secas mais intensas, enquanto regiões mais úmidas (como a Amazônia) enfrentarão eventos de precipitação intensa com maior frequência (IPCC, 2014).

1.2 O IPCC: Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas

A crescente preocupação com questões ambientais despertou a ideia de que o ser humano deve conservar, preservar e prezar pela sustentabilidade, para reduzir o impacto ambiental antropogênico. Uma série de ações governamentais têm sido promovidas para discussão e tomadas de decisão sobre o futuro do planeta. A primeira iniciativa, por parte da ONU, foi a Conferência sobre Meio Ambiente Humano, realizada em Estocolmo/Suécia em 1972, durante a qual foi criado o PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, assim como a Declaração de Estocolmo, a qual elevou o Direito Ambiental ao rol dos Direitos Humanos.

Diversas outras iniciativas para a preservação do meio ambiente, como a ECO-92, quando inúmeros tratados internacionais foram assinados, a Rio + 10, a Rio + 20 e a assinatura do Protocolo de Kyoto, foram tomadas na tentativa - parcialmente em vão - de fazer com que países desenvolvidos assumissem o compromisso de reduzir a emissão de gases que agravam o efeito estufa, dentre outras. Uma das mais importantes ações foi a criação do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas, ou IPCC.

O IPCC foi criado em 1988 por uma iniciativa da Organização Meteorológica Mundial (OMM) e do PNUMA, com o objetivo de compilar informações científicas e avaliar todos os aspectos da mudança climática e seus impactos, visando a formulação de estratégias de ação. Essas informações são divulgadas por meio de relatórios abertos, disponíveis nas redes de informação.

O primeiro relatório do IPCC foi divulgado em 1990 e revelou a importância das mudanças climáticas como desafio a ser enfrentado por diversas frentes governamentais em cooperação internacional. Os próximos relatórios vieram nos anos de 1995 (AR2), 2001 (AR3) e 2007 (AR4). O mais recente relatório - *Fifth Assessment Report* (AR5) - foi divulgado entre 2013 e 2014 e trouxe o estado da arte do conhecimento científico sobre mudanças climáticas, além de possíveis medidas de mitigação e adaptação.

Ao longo dos sete anos passados entre o quarto e quinto relatórios, novas informações surgiram e foram acrescentadas à última publicação. No entanto, as causas e consequências apresentadas foram muito similares, apenas com

atualizações de valores (e.g. valores em gigatons de CO₂ liberadas na atmosfera por atividades humanas). Ambos os relatórios apresentaram cenários de previsões futuras, estimadas a partir de modelos climáticos e ambientais, utilizando dados climáticos históricos e atuais, além de dados socioambientais.

Os cenários determinam que a concentração de CO₂ atmosférico poderá variar até o final do século, dependendo de como os recursos naturais estiverem sendo utilizados e os processos industriais estiverem sendo gerenciados. Caso a queima de combustíveis fósseis continue com a magnitude atual, o desmatamento não cesse e a negligência frente a leis e acordos de conservação e emissão de GHG continue, os cenários previstos são bastante severos, revelando estimativas de grandes aumentos da concentração de CO₂ e da temperatura média global. As diferenças entre os cenários previstos nos relatórios AR4 e AR5 são pequenas e estão apresentadas na Tabela 1.

1.3 Mudanças Climáticas, Amazônia e Organismos Aquáticos

Aumentos das concentrações de GHG na atmosfera compõem o problema chave no que tange às mudanças no clima. Além do consequente aumento na temperatura, maiores concentrações de CO₂ resultam também em maior captação deste gás pelos oceanos, fazendo com que ocorra acidificação da água. Desde o início da era industrial (meados do século XVIII) a captação oceânica de CO₂ resultou em diminuição de 0.1 no pH da água, o que corresponde em 26% de aumento da acidez, medida pela concentração de íons hidrogênio (H⁺) disponíveis (IPCC, 2014). Não obstante, previsões feitas com base em dados ambientais sugerem aumentos na concentração de CO₂ atmosférico de até 800 ppm (Feely et al., 2004), o que pode resultar em maiores índices de acidificação de corpos d'água em longo prazo.

A acidificação dos mares e oceanos pode resultar em problemas graves para a biodiversidade marinha. Segundo Hoegh-Guldberg et al. (2007), caso a concentração de CO₂ exceda 500 ppm até o final do século, a diversidade das comunidades de recifes sofrerá forte redução, trazendo consequências para comunidades de peixes, estoques pesqueiros, na proteção das áreas costeiras e para a população humana. Outras pesquisas demonstraram que a acidificação oceânica prejudica comportamentos naturais de espécies de peixes, como a fuga

de predadores (Dixon et al., 2010), especialmente em estágios iniciais do desenvolvimento (Munday et al., 2009).

Não obstante, organismos de água doce também sofrem influências da acidificação dos corpos d'água (Ou et al., 2015). Águas ácidas podem levar ao desequilíbrio na homeostase dos organismos, seja por meio dos sistemas de trocas iônicas (McDonald, 1983), modificações comportamentais (Beggs e Gunn, 1986) ou fisiológicas (Chippari-Gomes et al., 2005). Ao longo do tempo evolutivo, os organismos aquáticos desenvolveram uma série de adaptações as quais os permitem sobrepujar desafios ambientais que ocorrem naturalmente (Almeida-Val e Val, 1990; Beitinger et al., 2000).

Na região Amazônica, os desafios são tanto naturais quanto antropogênicos. Nas planícies alagadas da região amazônica, por exemplo, as variações naturais das condições ambientais são nítidas. De acordo com a estação do ano (seca ou chuvosa), os rios principais e seus afluentes são caracterizados pela ocorrência de grandes inundações em áreas de floresta. Com o alto nível das águas e grandes quantidades de matéria orgânica submersa, a decomposição desta aumenta, reduzindo os níveis de oxigênio dissolvido na água (Junk et al., 1989). Este é um evento natural que ocorre anualmente e pode ser considerado como agente de seleção, em termos evolutivos.

Não somente os desafios naturais mas também os impactos que o homem exerce sobre a região Amazônica compõem desafios para as espécies lá viventes. Em recente publicação, Castello e Macedo (2015) destacaram quatro principais causas de degradação ambiental: áreas represadas por conta de hidrelétricas, mineradoras, desmatamento e as mudanças do clima, às quais derivam principalmente do aumento dos GHG. Esses fatores influenciam negativamente os ciclos e a conectividade hidrológica da região, prejudicando os organismos aquáticos.

Tais desafios poderão ficar ainda mais intensos caso as previsões climáticas previstas venham a se concretizar. Segundo modelos regionais de mudanças climáticas, além do aumento da temperatura, a precipitação no leste da Amazônia deverá diminuir (Ambrizzi et al., 2007; Salazar et al., 2007), trazendo mudanças nos ciclos hidrológicos da região e, possivelmente, resultando no desaparecimento ou

na “savanização” de partes da Amazônia (Nobre et al., 2007). Segundo o IPCC, essa transição de ambientes tipicamente florestais por ambientes que se assemelham às savanas ou ao cerrado já está ocorrendo e pode ser extremamente problemático para a biodiversidade local, tendo como principais causas o aquecimento atmosférico e o desmatamento (IPCC, 2014).

Ao longo do tempo, algumas espécies de peixes amazônicos desenvolveram adaptações específicas para superar desafios ambientais, permitindo que as mesmas explorassem esses ambientes, os quais possuem grandes quantidades de alimento disponível, pouca competição por alimento e poucos predadores. Essas adaptações ocorreram em níveis fisiológicos (Chippari-Gomes et al., 2005), morfológico (Saint-Paul, 1988), bioquímicos (Almeida-Val e Val, 1990; Almeida-Val et al., 2011) e até comportamentais (Saint-Paul e Soares, 1987), sendo que a migração para ambientes mais favoráveis durante eventos desse tipo também é observada em espécies que não suportam a permanência em ambientes tão limitantes.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie adaptada a viver nos ambientes desafiadores da Amazônia. A espécie é altamente resistente à hipóxia (Sundin et al. 2000), tolera amplas faixas de temperatura ao longo da vida (Gomes et al. 2013) e apresenta adaptações favoráveis à sua sobrevivência frente à desafios ambientais (Florindo et al. 2006). No entanto, mesmo para espécies bem adaptadas como o tambaqui, os desafios climáticos futuros poderão exercer influências negativas em suas diferentes fases de vida.

Historicamente, as mudanças climáticas têm sido responsáveis pelo aumento da temperatura global e da concentração de GHG (principalmente o CO₂), pela acidificação dos oceanos e de corpos d'água. As melhores previsões para os cenários futuros são de aumentos de até 1.7 °C da temperatura média global e elevação da concentração de CO₂ ao nível de 450 ppm (IPCC, 2014). Isso já representaria, para muitas espécies, grande desafio ambiental a ser superado.

Espécies endêmicas ou especialistas podem ser as mais afetadas, caso seus ambientes sofram grandes modificações, enquanto outras, generalistas, podem estar melhor preparadas para as mudanças ambientais, pois já exploram maior variedade de ambientes e condições diversas, ou possuem mecanismos

fisiológicos que os permitem regular seu metabolismo para melhor adaptar-se às condições adversas (Fé, 2014). Porém, quando consideramos os estágios iniciais do desenvolvimento, geralmente mais sensíveis às variações ambientais, a maior parte das espécies poderá ser afetada.

Em recente estudo com as espécies amazônicas *Paracheirodon axelrodi* e *P. simulans*, foi demonstrado que a primeira, considerada especialista, apresentou baixa resistência quando submetida à condições climáticas adversas (cenários B1, A1B e A2 previstos pelo IPCC em 2007), enquanto a segunda espécie, generalista, foi capaz de sobreviver mesmo em condições extremas, por mecanismos de regulação metabólica relacionados à expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo anaeróbico, indicando uma estratégia de sobrevivência em ambientes mais quentes e ácidos (Fé, 2014).

Utilizando os mesmos cenários de mudanças climáticas simulados em microcosmos, Oliveira (2014) verificou que juvenis de tambaqui com cerca de 15g apresentaram desempenho zootécnico variável quando expostos aos diferentes cenários, sendo inferior no cenário mais drástico (A2), além de maiores taxas de mortalidade. No entanto, as respostas de organismos da mesma espécie em diferentes fases do desenvolvimento, podem ser diferentes.

1.4 Desenvolvimento Inicial de Peixes Neotropicais e Esqueletogênese

A fase inicial do desenvolvimento dos peixes constitui um período dinâmico, no qual uma série de eventos morfofisiológicos ocorrem simultaneamente, quando todos os sistemas orgânicos se formam e o organismo consegue crescer e atingir o estágio juvenil e, posteriormente, de adulto. Ao mesmo tempo, a fase larval pode ser considerada o período mais crítico no ciclo de vida dos peixes, seja por questões nutricionais (Portella et al., 2012), ecológicas ou ambientais (Munday et al., 2009).

As disparidades observadas em peixes da mesma espécie quanto ao tamanho, taxas de crescimento e idade reprodutiva, além de outros aspectos, seja em ambientes naturais ou artificiais, demonstram o quanto as características ambientais externas (e.g. temperatura, alimentação) ou mesmo internas (e.g. componentes genéticos) influenciam a história de vida do organismo (Pittman et al., 2013). Dentre uma série de fatores hoje estudados, questões nutricionais reúnem

a grande maioria das pesquisas realizadas com larvas de peixes (Cahu et al., 2003; Leitão et al., 2011; Georga et al., 2011; Menossi et al., 2012; Portella et al., 2012, 2014).

Outro fator ambiental amplamente estudado é a temperatura, considerada crítica para o desenvolvimento embrionário e larval normal dos peixes, assim como para o crescimento (Nicieza e Metcalfe, 1997), para a diferenciação orgânica (Koumoundouros et al., 2001) e para a sobrevivência das espécies (Pittman et al., 2013). Segundo Kovac (2002), os processos ontogenéticos em peixes acontecem em sequência, segundo um *timing* específico para cada espécie. Esses processos são plásticos (Pittman et al., 2013), porém susceptíveis à modificações ambientais, podendo alterar as taxas do desenvolvimento ontogenético, encurtando ou alongando o tempo de desenvolvimento. O desenvolvimento ósseo também segue esse *timing*, sendo que cada estrutura se diferencia e sofre ossificação em diferentes momentos, sendo que estes processos podem ser afetados por condições externas.

A diferenciação e o desenvolvimento normal dos sistemas orgânicos nos estágios iniciais de vida são relevantes para o pleno desempenho dos animais. O desenvolvimento normal do sistema esquelético dos peixes - essencial para a sustentação e primeiras atividades de natação e alimentação das larvas - é afetado também por questões genéticas (Boglione et al., 2013^b; Lopes et al., 2014), nutricionais (Cahu et al., 2003; Georga et al., 2011) e ambientais (Polo et al., 1991; Wargelius et al., 2005), podendo comprometer o desempenho do organismo no ambiente (Green e Fisher, 2004). O esqueleto dos peixes pode ser dividido em três porções: cranial, axial (coluna vertebral associada às nadadeiras ímpares - dorsal, anal e caudal) e apendicular (nadadeiras pares) (Cubbage e Mabee, 1996).

A primeira estrutura de sustentação que surge nos peixes é a notocorda, um tecido essencial que sustenta o corpo e influencia na formação da coluna vertebral (Azevedo et al., 2012). Nos primeiros dias de vida, uma camada colágena é formada em volta da notocorda conferindo mais rigidez a estrutura, e posteriormente esta camada é mineralizada, quando se formam os corpos vertebrais (Boglione et al., 2013^a). Assim sendo, má formações notocordais podem provocar efeitos deletérios diretos nos futuros corpos vertebrais (Morin-Kensicki et al., 2002).

Outras estruturas desempenham importante papel nos primeiros dias de vida dos peixes, como as estruturas do esqueleto craniofacial. Quando a larva infla a bexiga natatória e abre a boca para iniciar a alimentação exógena, a região cranial possui diversas estruturas cartilaginosas (e.g. ossos infraorbitais, nasal, dentário e opercular), as quais suportam órgãos de diferentes sistemas (e.g. olhos e futuros rastros branquiais). Além disso, as primeiras estruturas esqueléticas, precursoras dos ossos mineralizados, desempenham funções vitais como a natação inicial, a captura do primeiro alimento e a fuga de predadores (Noble et al., 2012).

Recentemente foi demonstrado em larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), espécie da mesma família do tambaqui (Serrasalminidae), que o osso dentário começa a se mineralizar no início da alimentação exógena (Lopes et al., 2014; Portella et al., 2014), melhorando a habilidade de captura do alimento pelo organismo e, conseqüentemente, promovendo o crescimento das larvas (Gisbert et al., 2002). Ademais, outras estruturas acompanham o tempo de ossificação do dentário, como a maxila e estruturas do esqueleto axial, fundamentais para outras funções como a natação e a fuga de predadores, sendo que o tempo de ossificação pode variar de acordo com o padrão genético, necessidades fisiológicas e comportamentos das espécies (Portella et al., 2014).

Em relação aos tecidos esqueléticos, os teleósteos mais derivados (e.g. Perciformes), em sua maioria, possuem ossos acelulares (sem a presença de osteócitos, mas sim de outros tipos celulares, responsáveis pela manutenção óssea), diferentemente de grupos como os salmonídeos ou ciprinídeos (Boglione et al., 2013^a). Essa especialização com outros tipos celulares (e.g. osteoblastos e osteoclastos) conferiu alta capacidade de reabsorção e remodelação óssea aos grupos (Dean e Shahar, 2012).

Existem três principais tipos de ossificação que ocorrem em peixes teleósteos, a depender do elemento esquelético considerado: endocondral e pericondral, as quais envolvem peças (ou moldes) de cartilagem hialina e são responsáveis pela formação da maior parte dos ossos; e intramembranosa, responsável pela formação de ossos craniais (Bird e Mabee, 2003; Boglione et al., 2013^a), a qual ocorre no interior de membranas de tecido conjuntivo. Segundo Hall (2005), os processos de diferenciação e ossificação podem ser prejudicados por condições ambientais adversas, originando deformidades esqueléticas. Alguns

ossos, como os corpos das vértebras, sofrem dois tipos de ossificação, a depender da região do osso considerada.

Referente à ossificação endocondral, a partir do molde de cartilagem hialina é formada uma placa inicial de matriz óssea. Nesse momento, vasos sanguíneos invadem a cartilagem, modificando o microambiente ósseo, trazendo íons, nutrientes e oxigênio (Junqueira e Carneiro, 2008). Essa modificação do microambiente ósseo permite que a mineralização óssea ocorra. Caso o microambiente ósseo não esteja homeostático, como em situações de baixa tensão de O_2 (por déficit sanguíneo ou pH ácido), as células presentes no tecido cartilaginoso se tornam células condrogênicas e não osteogênicas, prejudicando a mineralização (Gartner e Hiatt, 2007).

Outras regiões do esqueleto (e.g. ossos longos) sofrem ossificação pericondral, também a partir de um molde de cartilagem precursor, na qual o pericôndrio determina o início da ossificação. Ao longo do processo de ossificação, diversos fatores são essenciais tanto para a formação dos moldes de cartilagem quanto para a mineralização das estruturas. A presença de vasos sanguíneos no microambiente ósseo mantém a pressão de O_2 adequada e traz íons importantes para o processo de ossificação (e.g. $CaCO_3$, Ca^{+2} e $Ca_3(PO_4)_2$), além do transporte de células importantes como os condroclastos (responsáveis pela absorção da cartilagem e formação de lacunas a serem mineralizadas) e minerais para serem depositados na osteoide ainda não calcificada (Junqueira e Carneiro, 2008). Assim, quando as condições do microambiente ósseo não estão favoráveis ao desenvolvimento, podem ocorrer má formações no esqueleto. Por exemplo, caso as condições de irrigação sanguínea e oxigenação nos corpos vertebrais não estejam adequadas, casos de lordose, cifose ou escoliose podem ocorrer, enquanto outros eventos podem agir no dentário ou na maxila, desfavorecendo a ossificação normal, comprometendo os ossos (Lopes et al., 2014).

A incidência de anomalias esqueléticas em peixes pode compor um grande problema para a produção animal. No ambiente natural são eventos pouco usuais que ocorrem ao acaso e a baixa frequência observada é devido à menor chance de sobrevivência dos peixes que apresentam deformidades. Porém, em ambientes artificiais, uma série de fatores causativos favorecem o aparecimento de deformidades, mas a menor competição por alimento e a ausência de predadores

aumentam as chances de sobrevivência desses animais. Por exemplo, eventos de endogamia (comuns em pisciculturas) podem estar relacionados ao aparecimento de deformidades na coluna vertebral, como a lordose (Izquierdo et al., 2010), enquanto o fornecimento inadequado de nutrientes na dieta relacionam-se com o aparecimento de outras deformidades.

As vitaminas são essenciais para que o desenvolvimento ósseo ocorra normalmente. A homeostase do cálcio plasmático, importante na conservação da integridade óssea, é dependente da vitamina D, a qual relaciona-se com a absorção deste íon na luz intestinal (Tacon, 1995). Portanto, essa vitamina deve ser adequadamente ofertada na dieta. O mesmo autor observou que para salmonídeos, níveis inadequados de vitamina D correlacionaram-se com crescimento reduzido e baixo aproveitamento nutricional.

A vitamina A é um nutriente necessário, visto que por meio do ácido retinóico, regula tanto a mineralização óssea quanto os processos de formação da cartilagem, agindo diretamente nos condrócitos e na maturação das células de remodelação óssea (Lall e Lewis-McCrea, 2007). Da mesma maneira, a vitamina C é um outro nutriente essencial para os peixes, visto que também atua no crescimento e desenvolvimento esquelético (Linnea et al., 1998), assim como no metabolismo do colágeno.

O colágeno compõe a maior parte da matriz extracelular, além de ser encontrado em todos os tecidos do corpo. A vitamina C está diretamente relacionada com as etapas de formação dos diversos tipos de colágeno e seu metabolismo e, conseqüentemente, com a homeostase do tecido ósseo. Esta, quando administrada em doses ideais nas dietas de tambaqui, melhora o ganho em massa e o desempenho dos organismos (Chagas e Val, 2003).

Além da nutrição, outros fatores ambientais podem causar anomalias esqueléticas, tais como densidade de estocagem, manejo inadequado, fluxo de água, qualidade de água, pH, níveis de oxigênio e gás carbônico, salinidade, presença de parasitos ou variações da temperatura (Boglione et al., 2013^b). Em larvas vitelínicas da espécie *Sparus aurata* foi observado que variações na temperatura causam deformidades na mandíbula e maxila (Polo et al., 1991), além do aparecimento de lordose (Georgakopoulou et al., 2010).

A adoção de temperaturas mais altas na criação de peixes é uma prática comum entre produtores, pois os organismos podem desempenhar melhor em tais condições. Porém, a faixa de tolerância térmica de uma espécie deve ser respeitada, para evitar efeitos deletérios como o aparecimento de anomalias esqueléticas e altas taxas de mortalidade em um lote.

Ainda que apresentem sérias deformidades, os peixes em sistemas de criação podem permanecer vivos e se alimentando, porém não crescem de maneira satisfatória e desenvolvem um formato corporal que não é desejado pelo consumidor. As taxas de mortalidade observadas em lotes com peixes deformados são geralmente altas e podem trazer grandes prejuízos financeiros, justificando a necessidade de se estudar possíveis fatores causativos de deformidades, importantes na mitigação de tais efeitos. O estudo de tais ocorrências também se faz necessário porque a presença de anomalias esqueléticas compõe um problema ético, pois esses indivíduos demonstram problemas para se alimentar, para nadar e se reproduzir, experimentando frequentemente situações de estresse, ou seja, não pode-se dizer que esses se encontram em condições de bem-estar adequadas.

1.5 O Tambaqui

Pertencente à Ordem Characiformes, Subfamília Serrasalminidae (FISHBASE, 2016), o tambaqui é um peixe altamente desejado no Brasil, estando presente em diversas pisciculturas e com grande aceitação de mercado. Segundo dados do MPA, no ano de 2010 foi o segundo peixe mais produzido no país e hoje é o primeiro entre os nativos, com mais de 120 mil toneladas sendo produzidas anualmente (BRASIL, 2011).

O tambaqui habita as planícies aluviais da Bacia Amazônica, locais estes que sofrem amplas variações ambientais ao longo do ano. A temperatura pode variar muito ao longo do dia, assim como a quantidade de oxigênio dissolvido na água (Saint-Paul, 1988), desafiando as espécies que exploram tais ambientes. O tambaqui é uma espécie que apresenta ampla tolerância térmica (Gomes et al., 2013) e resistência à hipóxia prolongada (Florindo et al., 2006), podendo ser considerado bem adaptado e resistente à essas situações adversas.

Apesar de uma série de estudos reunirem informações sobre efeitos da temperatura, da disponibilidade de oxigênio e de outros desafios ambientais, a

literatura sobre o desenvolvimento larval da espécie é incipiente, especialmente no que diz respeito à efeitos de modificações ambientais sobre a ontogenia desses organismos. Apesar do tambaqui habitar ambientes muito desafiadores, as respostas dos estágios iniciais da espécie aos desafios ambientais como as iminentes mudanças climáticas globais previstas não são claras. Elucidar tais questões torna-se importante para o embasamento de futuras ações mitigadoras que visem a manutenção e melhor preservação da biodiversidade Amazônica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar as influências das mudanças climáticas previstas pelo IPCC para o final do século no desempenho zootécnico e na ontogenia esquelética de larvas de *Colossoma macropomum*.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos das mudanças climáticas previstas pelo IPCC sobre o desempenho zootécnico de larvas de *Colossoma macropomum*.

Avaliar os efeitos das mudanças climáticas previstas pelo IPCC sobre o desenvolvimento esquelético inicial de larvas de *Colossoma macropomum*, descrevendo as principais estruturas ósseas.

Avaliar e quantificar o aparecimento de anomalias esqueléticas ao longo dos primeiros dias do desenvolvimento de larvas de *Colossoma macropomum* submetidas aos cenários de mudanças climáticas previstas pelo IPCC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das Larvas e Local do Estudo

O presente estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, protocolo nº 11714/14. As larvas foram obtidas a partir da extrusão de gametas de estoques de reprodutores de tambaqui mantidos em cativeiro (autorização para coleta nº 45552-1 SISBIO), provenientes da Estação de Piscicultura de Balbina, pertencente à Secretaria de Estado de Produção Rural (SEPROR), no Estado do

Amazonas. Os ovos já fertilizados foram mantidos em incubadoras até a eclosão das larvas, quando as mesmas foram transportadas até o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LEEM/CBIO/INPA).

No laboratório, as larvas foram contabilizadas e distribuídas em aquários alocados dentro das salas climatizadas. Os aquários foram preenchidos com água obtida na estação de piscicultura, de modo a evitar problemas referentes à troca de água. Após a abertura da boca e até o final do experimento, as larvas foram alimentadas com alimento vivo (náuplios de *Artemia* recém eclodidos), seis vezes ao dia, em quantidades crescentes ao passar dos dias, como sugerido por Jomori et al. (2003) para a larvicultura de pacu.

3.2 Delineamento Experimental

As larvas de tambaqui foram expostas aos cenários climáticos previstos no Quarto Relatório Especial sobre Cenários de Emissão (SRES) do IPCC, em salas climatizadas (microcosmos) nas quais é possível controlar os níveis de temperatura do ar e CO₂, umidade e fotoperíodo (12 horas claro 12 horas escuro). As larvas foram alocadas em dez aquários com capacidade de 9L, dispostos em sistema de recirculação de água dentro de cada microcosmo. A densidade inicial adotada foi de 35 larvas/L. O alimento (náuplios de *Artemia*) foi ofertado nas mesmas quantidades (crescentes ao longo do experimento) para os quatro tratamentos, sendo as variáveis ambientais as únicas diferenças entre os mesmos.

Os cenários de mudanças climáticas previstos para o final do século são simulados dentro de microcosmos, estes sendo quatro salas idênticas, com as condições ambientais dinâmicas, controladas em tempo real. Cada microcosmo representa um cenário previsto: i) *brando*, com aumento de 1,8 °C e de 200 ppm de CO₂; ii) *moderado*, com aumento de 2,8 °C e 400 ppm de CO₂; iii) *drástico*, com aumento de 3,4 °C e 850 ppm de CO₂. Essas previsões correspondem aos cenários B1, A1B e A2 divulgado pelo IPCC (2007), respectivamente. O cenário *controle* (Atual) foi representado pelas condições de temperatura e CO₂ atuais, cujas variações seguiram em tempo real às condições naturais externas aos microcosmos, sendo estas utilizadas para o controle das outras três salas.

3.3 Obtenção das Amostras

O experimento teve início algumas horas após a eclosão das larvas e duração total de dezesseis (16) dias. Ao longo do experimento foram realizadas onze coletas: no momento pós-eclosão e nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13 e 16 dias pós-eclosão (dpe). Em cada coleta as larvas foram anestesiadas e eutanasiadas com solução de benzocaína a 0,15 g.L⁻¹ e posteriormente fixadas em solução de formalina a 4% pelo período de 48 horas. Após fixação, as larvas foram conservadas em solução de etanol 70 graus G.L.

Para as avaliações de desempenho zootécnico, todas as larvas coletadas foram pesadas em balança de precisão de seis casas (Mettler Toledo XP6) e medidas com auxílio de um estereoscópio (Olympus SZX7) e do software analisador de imagens CellSens Standard. Os índices avaliados foram: Taxa de Crescimento Específico (TCE), pela expressão **TCE (%) = 100*(ln M_f – ln M_i) x 100/Δt**, sendo **M_f** e **M_i** as massas final e inicial, respectivamente; Fator de Condição Alométrico (K), pela expressão **K = M_f / CP^b**, sendo **CP** o comprimento total das larvas e **b** o valor do coeficiente angular da reta obtido a partir da relação massa-comprimento, como recomendado por Lima-Junior et al. (2002); Ganho em Massa (GM), pela expressão **GM = M_f - M_i**. Além disso, foi mensurada a área do saco vitelínico das larvas de 0 a 6 dpe, em micrômetros quadrados (μm²). Para o cálculo do fator de condição (K), os dados de massa (μg) e comprimento total (μm) obtidos de todas as larvas coletadas foram plotados em um gráfico de dispersão (relação massa-comprimento) para obtenção do valor do coeficiente angular da reta (índice “b”), utilizado para o cálculo do K.

Após a realização das biometrias, todas as larvas coletadas foram submetidas ao processo de coloração óssea, denominado diafanização. O processo consta de oito fases que devem ser realizadas ininterruptamente: fixação das amostras (48h); desidratação das mesmas em etanol absoluto (24h); coloração do esqueleto cartilaginoso em solução ácida contendo Azul de Alcian (24h); neutralização em solução saturada de borato de sódio (12h); digestão enzimática em solução de tripsina a 1%; coloração do esqueleto mineralizado em solução básica de hidróxido de potássio a 1% e Vermelho de Alizarina (24h); segunda digestão em mesma solução enzimática, caso necessário; preservação em solução

de glicerina a 30% (48h), 60% (72h) e 100% por tempo indefinido. O referido processo foi modificado de Potthoff (1984).

Após a diafanização, todas as larvas foram analisadas quanto ao desenvolvimento esquelético. As anomalias esqueléticas foram registradas - por meio da utilização de câmera fotográfica digital (Olympus DP26) acoplada ao estereoscópio previamente utilizado para a mensuração corpórea das larvas coletadas - e quantificadas quanto à presença (1) ou ausência (0) em uma tabela para posterior análise. Todas as análises biométricas foram realizadas com o auxílio do software analisador de imagens CellSens Standard.

3.4 Acompanhamento da Qualidade de Água

As medidas das características físico-químicas da água dos aquários foram tomadas diariamente durante a execução do experimento. Os valores de temperatura (°C), concentração de oxigênio dissolvido (OD) e condutividade elétrica foram registrados duas vezes ao dia (às 08h:00 e às 16h:30), com o auxílio de um oxímetro 5512-FT (YSI).

Os valores do pH foram registrados a cada dois dias, com o auxílio de um pHmetro UltraBASIC UB-10 (Denver Instrument), assim como dos níveis de CO₂ na água, este determinado por ensaio colorimétrico segundo Boyd e Tucker (1992). O método consistiu na reação do CO₂ com o carbonato de sódio (Na₂CO₃), utilizando-se fenolftaleína como indicador. A concentração de CO₂ foi expressa em partes por milhão (ppm).

3.5 Análises Estatísticas

Todos os dados foram testados quanto à normalidade dos erros (Cramer-von Mises) e homoscedasticidade das variâncias (Levene) e estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Para acessar diferenças entre as médias de cada parâmetro físico-químico da água, foi realizada uma análise de variância com um fator (*One Way ANOVA*), seguido do teste de comparações múltiplas de médias de Dunnett, de modo a discriminar tais diferenças entre os cenários experimentais e o cenário atual. Os índices zootécnicos (massa, comprimento, consumo de vitelo, TCE, K e GM) foram avaliados também por *One Way ANOVA*, seguido do teste de comparações múltiplas de médias de Tukey. Para ambos os testes, foi admitido o

nível de significância de 5% e ambos foram realizados com o auxílio do Software R.

Os dados obtidos nos registros de deformidades esqueléticas (dados categóricos) foram avaliados por meio de dois métodos. Primeiramente, a incidência de anomalias encontradas entre as salas foi analisada por *One Way* ANOVA seguida do teste de Tukey. Em seguida, de modo a buscar associações entre os cenários de mudanças climáticas e os tipos de deformidades esqueléticas analisadas, foi aplicada a técnica de análise exploratória multivariada de Correspondência Simples. Esta análise utiliza o conceito Qui-quadrado para padronizar as frequências dos dados apresentados, que compara valores esperados com valores observados, buscando associações significativas entre os mesmos. Somado aos dados de deformidades, foi adicionado o Índice de Qualidade Larval (IQL), como sugerido por Boglione et al. (2009), constituído pelo número de larvas deformadas por tratamento. Por fim, foi realizada a análise exploratória de Agrupamento por método hierárquico com os dados da incidência de anomalias esqueléticas. As análises exploratórias foram realizadas com auxílio do Software STATISTICA 7.0.

4 RESULTADOS

4.1 Simulação dos Cenários Climáticos em Microcosmos

A temperatura e os níveis de CO₂, registrados sempre no mesmo horário, apresentaram as variações esperadas dentro de cada microcosmo ao longo do experimento (Figura 2), segundo o relatório do IPCC (IPCC, 2007). Os valores da umidade relativa do ar nos cenários Atual ($71,3 \pm 1,3$); Brando ($74,1 \pm 1,3$); Moderado ($73,1 \pm 1,4$) e Drástico ($72,9 \pm 1,5$) permaneceram constantes entre as salas, não apresentando diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($P > 0,05$).

4.2 Parâmetros Físico-Químicos da Água

As características físico-químicas da água durante o experimento são mostradas na Tabela 2. A variação do pH aconteceu de acordo com o esperado para os diferentes cenários de mudança climática, devido ao aumento dos níveis de CO₂ na água, por conta das elevadas concentrações atmosféricas.

4.3 Desempenho Zootécnico

Do início do experimento até o décimo dpe, poucas diferenças estatísticas foram encontradas em relação à massa e ao comprimento total (CT) das larvas. Já a partir do décimo terceiro dpe destacam-se as diferenças de desempenho entre os tratamentos. Aos 16 dpe, as larvas do tratamento A1B apresentaram maior massa final (3,72 mg), estatisticamente superior ($P < 0,0001$) aos dos outros tratamentos, B1 (3,17 mg), Atual (1,80 mg) e A2 (1,84 mg) (Figura 3). Em relação ao tamanho corpóreo, as larvas dos tratamentos B1 (7,56 mm) e A1B (7,80 mm) apresentaram maior CT ($P < 0,0001$), em comparação com os tratamentos Atual (6,51 mm) e A2 (6,85 mm) (Figura 3).

Ao longo dos seis dias de alimentação endógena, a área relativa ao saco vitelínico não diferiu nos cinco primeiros dias, sendo que no último dia em que as larvas ainda possuíam parte de suas reservas, as larvas submetidas ao cenário A2 apresentaram a menor ($P < 0,0001$) área média relativa ($60881,5 \mu\text{m}^2$) (Figura 4).

As larvas submetidas ao cenário A1B apresentaram maior ganho em massa e taxa de crescimento específico ($3,23 \text{ mg}$ e $25,9\%.\text{dia}^{-1}$) ao final do experimento ($P < 0,001$) quando comparadas com o tratamento B1 ($2,68 \text{ mg}$ e $23,5\%.\text{dia}^{-1}$), o qual também apresentou melhores índices do que os tratamentos Atual ($1,31 \text{ mg}$ e $12,9\%.\text{dia}^{-1}$) e A2 ($1,35 \text{ mg}$ e $12,6\%.\text{dia}^{-1}$) (Figura 5). O alimento (náuplios de *Artemia*) foi ofertado nas mesmas quantidades (crescentes ao longo do experimento) para os quatro tratamentos, sendo as variáveis ambientais as únicas diferenças entre os mesmos.

Pelo cálculo da relação massa-comprimento, o valor do índice b obtido foi 3,57 ($R = 0,8564$), caracterizando o crescimento das larvas de tambaqui como alométrico positivo. Ao final do experimento, o fator de condição foi mais elevado nos cenários Atual e A1B ($P < 0,0001$), o primeiro semelhante ao cenário B1 e todos superiores ao cenário A2 ($P < 0,0001$) (Figura 6).

A média da taxa de sobrevivência (em porcentagem na Tabela 3) das larvas submetidas ao cenário Atual ($29,3 \pm 0,3$) foi significativamente superior ($P < 0,001$) às observadas nos tratamentos A1B ($26,3 \pm 0,7$) e A2 ($24,7 \pm 1,0$), enquanto que a mesma foi intermediária aos outros no cenário B1 ($27,5 \pm 0,6$).

4.4 Osteogênese e Incidência de Anomalias Esqueléticas

Todas as larvas de tambaqui coletadas ao longo dos 16 dias de experimento foram diafanizadas e analisadas com o auxílio de estereoscópio (totalizando 1901 larvas), de modo a avaliar o processo de osteogênese e a incidência de anomalias no esqueleto das mesmas. As anomalias foram analisadas somente após o processo de coloração óssea, não sendo identificadas observando-se a morfologia externa das larvas.

As estruturas do esqueleto craniofacial, axial e apendicular das larvas de tambaqui foram analisadas em todas as amostragens realizadas. Foi observado que, em nenhum dos cenários climáticos, incluindo o cenário Atual, as larvas apresentaram mineralização óssea. Sendo assim, todas as análises relativas ao sistema esquelético foram realizadas com base na observação das estruturas cartilaginosas.

O esqueleto dos peixes é dividido em três partes: craniofacial, axial e apendicular. No primeiro dia pós-eclosão, as larvas apresentam o corpo com o eixo curvado dorso-ventralmente, sendo o saco vitelínico bastante visível e ainda sem estruturas esqueléticas definidas, com exceção da notocorda, recentemente formada (Figura 7A). Com o passar dos dias as estruturas craniais começam a se estruturar, como os rastros branquiais e alguns ossos da face (Figura 7B), e o eixo corporal tende a ficar retilíneo, com a notocorda mais evidente (Figura 7C).

Aos 6 dpe (fase de pré-flexão notocordal), as estruturas craniais apresentaram-se mais evidentes, assim como aparelho de Weber (Figura 8A), estrutura presente em todos os ostariophisios. Também nesta fase já é possível observar a completa formação dos 5 pares de rastros branquiais (Figura 8B).

Ao final do experimento, as larvas (com 16 dpe) já apresentavam as nadadeiras dorsal, pélvica, anal, adiposa e peitorais em início de formação (Figura 9A), acompanhadas pela flexão notocordal formando o pedúnculo caudal e a nadadeira caudal (Figura 9B). Nessa fase, as regiões craniais encontravam-se bem definidas: olfatória, orbital, ótica, occipital, mandibular, hioide, opercular, branquial e a região do palato, sendo também possível observar o início da formação dos corpos vertebrais e de seus prolongamentos (Figura 9C).

Diversas anomalias esqueléticas foram encontradas, mas para as análises estatísticas foram consideradas apenas as seguintes: anomalias mandibulares e maxilares e na notocorda (lordose, escoliose e cifose). Outras foram encontradas na notocorda, mas em baixa frequência, sendo consideradas não usuais.

Anomalias no esqueleto axial caracterizam-se tipicamente por dobramentos da notocorda em sentidos diferentes, tornando-a irregular. A lordose é caracterizada pelo dobramento no sentido dorsoventral (Figura 10A), enquanto a cifose ocorre quando a notocorda dobra-se no sentido ventrodorsal (Figura 10B). Já a escoliose caracteriza-se pelo desvio látero-lateral da mesma estrutura (Figura 10C).

A região craniofacial de algumas larvas também apresentou anomalias na mandíbula (Figura 11A) e na região da pré-maxila/maxila (Figura 11B). As anomalias encontradas nessas porções do crânio se deram de duas maneiras principais: encurtamento ou prognatismo dos ossos.

Todas as deformidades encontradas tanto na região cranial quanto no esqueleto axial (precedendo a formação da coluna vertebral) das larvas analisadas foram visualizadas tanto no cenário Atual de condições climáticas quanto nos três cenários de mudanças climáticas estudados. Foram encontradas 566 anomalias esqueléticas em 520 larvas, sendo que algumas larvas apresentavam mais de um tipo de anomalia no esqueleto. A incidência total de anomalias esqueléticas encontradas por cenário de mudança climática é apresentada na Tabela 4.

As anomalias esqueléticas mais comuns envolveram tanto a notocorda (lordose, 31,98%) quanto o esqueleto craniofacial (mandíbula, 22,96%). Porém, a alta incidência de larvas que apresentaram lordose se deve ao aparecimento dessa anomalia no cenário A2, no qual foram encontradas 86 animais com essa malformação. As outras anomalias encontradas na notocorda das larvas - escoliose e cifose, tiveram baixa incidência (11,31% e 12,0%, respectivamente), com maior incidência nos cenários A1B e A2.

A incidência total de anomalias esqueléticas registradas foi menor ($P < 0,0001$) no cenário Atual (15,36%) em comparação com os cenários A1B (34,82%) e A2 (39,91%), sendo que a incidência de anomalias observada no cenário B1 (21,28%) foi estatisticamente intermediária entre os cenários Atual e A1B.

4.5 Análises Exploratórias dos Dados

A análise de Agrupamento por método hierárquico foi realizada com os dados categóricos padronizados das anomalias esqueléticas registradas e o índice de qualidade larval (IQL), visando a busca de similaridades entre os grupos estudados. A análise revelou similaridade entre os cenários Atual e B1 e entre os cenários A1B e A2 (sendo esta mais específica), assim como um distanciamento entre os dois grupos identificados (Figura 12).

A análise exploratória de Correspondência Simples (ACS) foi realizada para buscar possíveis associações entre os cenários de mudanças climáticas e os tipos específicos de anomalias esqueléticas analisadas. O valor do Chi-quadrado geral foi 85,853 ($P < 0,0001$), portanto admite-se que existe associação entre ao menos um cenário de mudança climática e um tipo de anomalia esquelética, ou seja, admite-se a dependência entre os dados.

A padronização e análise dos dados fornece uma tabela de valores esperados menos valores observados pelo método Chi-quadrado. Nesta, existem valores negativos e positivos, os quais indicam que não há associação entre tratamentos e variáveis ou que essa dependência está presente, respectivamente. Possíveis associações significativas foram encontradas entre os quatro cenários de mudança climática com ao menos um tipo de anomalia esquelética (valores destacados em negrito na Tabela 5). Também foram identificadas possíveis associações entre os cenários Atual e B1 com o IQL, indicando que essas duas condições climáticas resultaram em larvas “de melhor qualidade”, quando comparadas com as dos cenários A1B e A2 (Tabela 5).

A análise revelou que os cenários Atual e B1 associaram-se à anomalias nas estruturas do crânio, enquanto os cenários de maiores emissões de CO₂ e aumentos de temperatura (A1B e A2) relacionaram-se principalmente com deformidades associadas à notocorda, consideradas mais severas durante o período de desenvolvimento dos peixes.

Complementarmente, as associações encontradas pela ACS podem ser verificadas quanto à sua significância estatística. Nos dados dos desvios padronizados obtidos na análise, é possível buscar tais associações, sejam elas significativas ou não. No presente trabalho, as associações adotadas como

significativas apresentaram desvios na ordem acima de 1,96, indicando um valor de $P = 0,05$. Assim sendo, as associações encontradas foram: cenário A2 com cifose (2,90) e lordose (3,47); cenário B1 com anomalias mandibulares (2,12) e cenário Atual com o IQL (3,78) (Figura 13).

5. DISCUSSÃO

5.1 Estudos de mudanças climáticas em microcosmos

Estudos recentes que contribuem para o entendimento das consequências das mudanças climáticas que o planeta está sofrendo tratam da compilação de dados de outros trabalhos e registros antigos, além de dados obtidos a partir de modelos matemáticos, estabelecidos a partir de dados ambientais, assim como os próprios cenários previstos pelo IPCC em seus relatórios. No presente estudo foram apresentados dados empíricos sobre a influência que as mudanças climáticas causarão em um organismo amazônico, caso venham a se concretizar, por meio da utilização de um sistema experimental inovador e de extrema importância para tais compreensões.

Os microcosmos simularam as condições climáticas estabelecidas no Quarto Relatório sobre Mudanças Climáticas do IPCC (IPCC, 2007) de maneira satisfatória. Tanto a variação observada quanto a constância na diferença visualizada entre os registros nos quatro microcosmos (Figura 2), demonstram a capacidade do sistema de simular os cenários conforme preconizado pelo Quarto Relatório do IPCC (2007).

A interação do CO_2 atmosférico com a água dos aquários levou à reduções graduais do pH na água. Mesmo que esta redução do pH entre os cenários de mudança climática (acidificação da água) não tenha sido estatisticamente diferente ($P > 0,05$), pequenas mudanças nessa variável podem implicar em grandes impactos para os organismos aquáticos. Desde a era industrial, houve redução de 0,1 no pH da água dos oceanos, implicando em 26% de aumento na acidez da água (IPCC, 2014).

Os valores significativamente menores de oxigênio dissolvido encontrados nos cenários A1B e A2 em comparação com o cenário Atual, ainda estão dentro dos valores normóxicos encontrados para tambaquis adultos (Gomes et al., 2013). Ainda que não sejam conhecidas as faixas de tolerância à concentração de

oxigênio para a espécie no estágio larval, supõe-se que tal redução não apresentou um desafio hipóxico para os organismos ao longo do experimento.

5.2 Consequências das Mudanças Climáticas sobre o Desempenho

Zootécnico do Tambaqui

As previsões mais otimistas em relação às mudanças no clima estimam um aumento de, no mínimo 1,1 °C e de aproximadamente 200 ppm na concentração de CO₂ atmosférico até o final do século (Nobre et al., 2007). As consequências de tais modificações poderão ser facilmente visualizadas no ambiente aquático, pois tanto a temperatura quanto a acidez da água - fatores conhecidamente influenciadores do desempenho zootécnico de peixes - irão mudar, como visto nos resultados ambientais do presente estudo. Enquanto algumas espécies apresentam ampla tolerância térmica, outras não suportam temperaturas extremas, fora de sua amplitude normal (Portner e Knust, 2007).

Ao longo do desenvolvimento, os peixes experimentam diferentes ambientes com condições distintas. Na época da reprodução, o tambaqui migra para águas tipicamente barrentas, ricas em nutrientes e com temperatura estável (entre 28,5 e 29 °C) (Gomes et al., 2013). Desovam nas margens dos rios e quando as larvas eclodem, estas se desenvolvem nas planícies de inundação do rio (florestas inundáveis), onde as variações de temperatura são mais amplas, assim como da concentração de O₂ (Gomes et al., 2013).

Segundo Wilson e Nagler (2006), a faixa de tolerância térmica de uma espécie varia de acordo com a idade do animal, sendo que diferenças na temperatura da água afetam diretamente na fisiologia do mesmo. Durante o período de incubação, altas temperaturas aceleram a eclosão das larvas (Polo et al., 1991; Hardy e Livak, 2004), as quais podem eclodir antes mesmo que o desenvolvimento embrionário se complete (Vieira e Johnston, 1999). A faixa de tolerância térmica de larvas da espécie *C. macropomum* não foi ainda bem definida, mas algumas evidências apontam melhor desempenho da espécie em temperaturas mais altas (Vieira e Johnston, 1996; Vieira e Johnston, 1999). Nossos resultados indicam melhores taxas de sobrevivência em temperaturas mais amenas para a fase larval. No entanto, a ideia de que um organismo sempre desempenha melhor em maiores temperaturas ao longo do desenvolvimento é errônea, visto que os processos

metabólicos e o desenvolvimento normal dos órgãos dependem de pontos ótimos de temperatura (Pittman et al., 2013).

As larvas submetidas aos cenários de mudança climática apresentaram taxas de crescimento e sobrevivência diferentes entre microcosmos, com melhor desempenho zootécnico em temperaturas médias entre 29 e de 31 °C. Em recente trabalho realizado em nosso laboratório, foi verificado que, quando submetidas à temperaturas de 25, 28 e 31 °C, larvas recém-eclodidas de tambaqui desempenharam diferentemente entre tratamentos, porém apresentando taxas de sobrevivência semelhantes, com tendências de redução na maior das temperatura adotada (Bomfim, comunicação pessoal), semelhantemente ao verificado na presente pesquisa.

Enquanto o tempo de eclosão das larvas se relaciona diretamente com a temperatura da água, o consumo das reservas vitelínicas pode não ser acelerado sob tais condições (Arul, 1991; Polo et al., 1991; Pittman et al., 2013). Segundo Bomfim (comunicação pessoal), larvas de tambaqui submetidas à temperaturas elevadas (31 °C) consomem as reservas vitelínicas mais rapidamente, como visto no presente estudo, no qual o consumo das reservas vitelínicas das larvas permaneceu semelhante ao longo dos dias de alimentação endógena, com exceção do último dia, no qual as larvas submetidas ao cenário A2 apresentaram menores reservas, antes de sua depleção completa no sétimo dia. Segundo Pittman et al. (2013), existe um intervalo ótimo de temperatura para melhor conversão das reservas vitelínicas em tecidos orgânicos, mas de maneira geral, as perdas de energia ao longo deste processo são maiores em temperaturas mais elevadas, podendo refletir no crescimento das larvas, como visto neste estudo para as larvas do cenário A2.

Nossos resultados corroboram com estudos que tratam de outras espécies e outros grupos animais. Segundo Willemsen et al. (2010), quando frangos de corte foram submetidos a maiores temperaturas estes também demonstraram absorção das reservas endógenas ligeiramente mais rápida, assim como crescimento favorecido até determinada temperatura. Mas quando os mesmos organismos encontravam-se com massa de abate, os autores constataram que a qualidade da carne foi comprometida nas aves submetidas à temperaturas elevadas. Assim, considerando o IQL das larvas do presente experimento, podemos inferir que a

qualidade dos peixes submetidos aos cenários de mudança climática também é inferior.

As larvas que apresentaram maior comprimento e massa ao final dos dezesseis dias de experimento foram as submetidas ao cenário A1B, no qual a temperatura média da água ao longo do experimento foi de $31,02 \pm 0,25$ °C, dentro da faixa considerada normal para os locais em que o tambaqui se encontra no ambiente natural (Gomes et al., 2013). Segundo esses autores, a espécie possui ampla tolerância térmica, vivendo no intervalo de 25 e 34 °C no ambiente natural, mas também pode ser encontrada em lagoas (formadas por afluentes do Amazonas) em que a temperatura da água chega a 40 °C. Porém, há relatos que quando os limites de temperatura são ultrapassados, estes podem resultar em altas taxas de mortalidade e desempenho produtivo indesejável. Por exemplo, Zaniboni-Filho e Meurer (1997) relataram altas taxas de mortalidade de juvenis da espécie submetidos à temperaturas de 16 - 18 °C. As larvas submetidas ao cenário B1 apresentaram desempenho semelhante ao A1B, ambos superiores aos tratamentos Atual e A2. No ambiente natural, larvas que atingem maiores tamanhos ao final da absorção do vitelo possuem vantagens, como em situações de fuga de predadores (Parra e Yúfera, 2000) e na captação dos primeiros alimentos exógenos (Yúfera e Darias, 2007), devido à maior facilidade de natação e maior abertura da boca, mas esta vantagem não é clara em ambientes controlados. Ademais, as larvas não diferiram quanto a essas características ao final da absorção das reservas endógenas.

De maneira geral, o desempenho zootécnico das larvas submetidas aos cenários B1 e A1B foi maior, seja na massa, comprimento, ganho em massa ou taxa de crescimento específico ao final do experimento. Sendo as únicas diferenças entre os microcosmos a temperatura e a concentração de CO₂ atmosférico influenciando na qualidade da água, as diferenças entre tratamentos provavelmente se deram como resultado do efeito combinado entre o aumento da temperatura e a acidificação da água. A solubilidade do CO₂ em uma solução aquosa é alta (maior do que do O₂ por exemplo) e quanto maior a concentração e pressão parcial deste gás na atmosfera, maior será também na água (Hill et al., 2012). Assim, tanto no ar quanto na água, a concentração e pressão parcial do CO₂ tendem a se manter em equilíbrio dentro de cada microcosmo. Isso resulta em

maiores concentrações desse gás nos fluidos corpóreos das larvas, visto que a difusão dos gases para dentro dos tecidos orgânicos tende também ao equilíbrio (Hill et al., 2012).

Segundo Haines (1981), a acidificação da água pode resultar em altas taxas de mortalidade, crescimento reduzido e anomalias esqueléticas. A hipótese de que o crescimento e o desempenho das larvas acompanhariam gradualmente o aumento da temperatura entre as salas não foi corroborada no presente estudo, haja visto a similaridade entre o desempenho das larvas dos cenários B1 com A1B e Atual com A2.

As taxas de mortalidade verificadas no presente trabalho foram altas, diferentes entre os cenários previstos, e parcialmente graduais entre os mesmos. Nos primeiros dias de experimento, mais da metade das larvas morreram por motivos desconhecidos, visto que o manejo adotado no LEEM foi exatamente igual aos experimentos de larvicultura de tambaqui previamente realizados por nossa equipe nos laboratórios do Centro de Aquicultura da UNESP. As diferenças observadas no pH da água entre os quatro microcosmos não foram estatisticamente diferentes, mas é provável que tenham influenciado a sobrevivência e o desenvolvimento normal das larvas, pois pequenas mudanças de pH são responsáveis por aumentos significativos da acidez da água (IPCC, 2014) e organismos no início do desenvolvimento podem ser mais sensíveis às mesmas (Ishimatsu et al., 2008).

Mesmo em águas ligeiramente mais ácidas (diferenças de 0,1 - 0,3 no pH), a interação entre o CO₂ e o plasma sanguíneo das larvas de tambaqui pode ter sido elevada o suficiente para reduzir o pH sanguíneo, prejudicando a homeostase das mesmas. Essa hipótese explicaria as altas taxas de mortalidade registradas, além da alta incidência de anomalias esqueléticas encontradas principalmente nos cenários mais drásticos de mudança climática. A acidificação dos líquidos corpóreos das larvas pode ter influenciado o microambiente ósseo, prejudicando o desenvolvimento normal desse sistema, assim como de outros sistemas orgânicos.

A acidificação da água é responsável por altas taxas de mortalidade em peixes marinhos (Hayashi et al., 2003; Lee et al., 2003; Ishimatsu et al., 2004; Ishimatsu et al., 2005) e de água doce (Sayer et al., 1993; Ou et al., 2015), sendo

verificada principalmente por efeitos negativos no crescimento e no comportamento dos peixes, relativo ao desenvolvimento do sistema sensorial e à fuga de predadores (Munday et al., 2009; Ou et al., 2015). Porém, segundo Munday et al. (2009) e Tseng et al. (2013) as respostas a diferentes níveis de pH são espécie-específicas, sejam de crescimento, de desenvolvimento orgânico, de consumo das reservas vitelínicas e de taxa de sobrevivência.

Apesar das larvas das salas B1 e A1B terem desempenhado melhor em relação à alguns parâmetros zootécnicos, o fator de condição calculado se mostrou superior para o cenário Atual em relação ao B1 e semelhante ao A1B. O fator de condição (K) é um parâmetro zootécnico utilizado para se comparar a “condição” ou o bem-estar dos animais, levando em consideração que animais de determinada massa devem possuir certo tamanho para que este seja considerado saudável (Tesch, 1968). Por exemplo, em ambiente natural, baixos valores de K durante o fim da vazante dos rios e estação seca estavam relacionados aos baixos índices alimentares de exemplares adultos de tambaqui (VillaCorta-Correa e Saint-Paul, 1999). Em ambientes de cultivo, o fator de condição reflete as condições de manejo e de qualidade da água dos tanques. Sendo assim, podemos considerar que as larvas que possuem maior K (cenário Atual e A1B) estão em melhores condições (Froese, 2006; Camara et al., 2011) do que as larvas que possuem menores valores para este parâmetro (cenários B1 e A2), reflexo das variáveis ambientais impostas nos microcosmos.

5.3 Desenvolvimento esquelético e anomalias

Após a realização do processo de diafanização, foi verificado que o esqueleto das larvas submetidas aos quatro tratamentos não apresentou mineralização das estruturas. Larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com 5 dpe já apresentaram estruturas em início de mineralização óssea, sendo que com 16 dpe já possuíam a maior parte das estruturas esqueléticas mineralizadas, incluindo toda a coluna vertebral (Lopes et al., 2014).

O processo de fixação das larvas adotado (solução de formalina a 4%) foi idêntico ao utilizado por Boglione et al. (2009). Além disso, o processo de diafanização foi realizado de acordo com a literatura (Potthoff, 1984), como em outros trabalhos realizados em nosso laboratório. As únicas modificações adotadas no protocolo foram o tempo reduzido de permanência das larvas na solução

enzimática e o tempo para fixação em glicerina. No entanto, certamente essas modificações não influenciaram a coloração óssea. Ademais, numa pequena parcela das amostras coletadas no último dia de experimento (larvas com 16 dpe), o processo de diafanização foi realizado sem a coloração prévia da cartilagem (por meio de solução ácida), passando diretamente para a fase de coloração com Vermelho de Alizarina, pois Boglione et al. (2009) relataram que a solução ácida pode descalcificar os ossos já mineralizados. Ainda assim, não foram verificadas estruturas ósseas mineralizadas e a razão para isso não está clara.

Uma possível explicação pode ser a qualidade de água utilizada no experimento, oriunda do Rio Negro. A água desse rio é tipicamente ácida e com baixa concentração de carbonato de cálcio, elemento importante na composição e formação de estruturas esqueléticas mineralizadas. Assim, especula-se que não ocorreu a mineralização óssea nas larvas de tambaqui em razão da acidez da água e deficiência de CaCO_3 no ambiente experimental. Espécies próximas ao tambaqui (e.g. pacu) apresentaram mineralização óssea mais precoce (Lopes et al., 2014), porém em ambientes de água dura, sem deficiência de cálcio. Assim, mais estudos devem ser realizados a fim de se investigar o tempo de ossificação das estruturas esqueléticas do tambaqui, em ambientes controlados e naturais, visto que a água no ambiente natural pode variar quanto ao pH e à composição mineral em diferentes regiões.

A condição de bem-estar e crescimento das larvas relaciona-se diretamente com o desenvolvimento dos sistemas orgânicos. No presente estudo, ficou evidente que as condições climáticas impostas influenciaram negativamente o processo de osteogênese das larvas de tambaqui, sendo responsáveis tanto pelo crescimento longitudinal prejudicado, quanto pelo aparecimento de anomalias esqueléticas no crânio e na notocorda das mesmas, em quantidades muito superiores às encontradas no ambiente natural (Lopes et al., 2014) ou em condições climáticas atuais (cenário Atual).

As anomalias esqueléticas mais incidentes no presente estudo ocorreram na notocorda (lordose) e na mandíbula (braquignatia), estas associadas aos cenários A2 e B1, respectivamente. Tais anomalias compõem sérios problemas para os organismos, pois estas impedem que as larvas se locomovam normalmente, além de dificultarem a captura de alimento (Boglione et al., 2009, 2013^b). A cifose e a

lordose são consideradas severas para organismos em estágio inicial de desenvolvimento, haja visto o comprometimento da natação, o que pode causar altos índices de predação e mortalidade (Georgakopoulou et al., 2010). As larvas que apresentaram maior índice dessas anomalias foram as submetidas ao cenário A2, o qual também demonstrou baixo desempenho zootécnico e baixo índice de qualidade larval.

As larvas submetidas aos cenários A1B e A2 apresentaram alta incidência de larvas deformadas (34,82% e 39,91%, respectivamente). Porém, enquanto o desempenho zootécnico das larvas do cenário A1B foi satisfatório em comparação às do cenário Atual, as larvas submetidas às condições climáticas mais drásticas (A2) apresentaram desempenho muito inferior, acompanhado pelo menor registro de sobrevivência e maior incidência de anomalias, ao final do experimento. Assim, é possível afirmar que a lordose é uma anomalia severa para larvas de peixes, como relatado por Boglione et al. (2013^b).

O aparecimento de anomalias esqueléticas relaciona-se com a temperatura, fatores genéticos e de qualidade de água (Boglione et al., 2013^b). Fatores genéticos atuam no aparecimento de anomalias esqueléticas quando algum fator epigenético (e.g. nutrição, temperatura ou pH da água) está também presente, principalmente alterando a expressão de genes relacionados à osteogênese (Wargelius et al., 2005). O ponto ótimo de temperatura para que o desenvolvimento esquelético ocorra normalmente varia de acordo com a fase de desenvolvimento dos peixes (Georgakopoulou et al. 2010) e está diretamente relacionado com o desenvolvimento do sistema esquelético normal (Pittman et al., 2013).

Estudos relativos à anomalias esqueléticas são mais comuns com espécies marinhas, sendo escassa a literatura que trata de espécies de água doce. Polo et al. (1991) relacionaram aumentos da temperatura da água com o aparecimento de anomalias nas nadadeiras, mandíbula e na notocorda para a espécie *Sparus aurata*. Para a mesma espécie, Georgakopoulou et al. (2010) observaram que até a fase de juvenil, a temperatura exerce efeito significativo no aparecimento de anomalias operculares, de lordose e nas nadadeiras caudal e dorsal. Já para a espécie *Solea senegalensis*, temperaturas mais altas do que o normal para espécie contribuíram para o aparecimento de anomalias vertebrais (Dionísio et al., 2012).

O potencial hidrogeniônico (pH) da água é outro fator epigenético passível de causar problemas durante a osteogênese em larvas de peixes. A acidificação da água é reconhecida por afetar o desempenho, crescimento e reprodução dos peixes, pois mesmo sendo capazes de manter a homeostase por regulação iônica, esse processo demanda muita energia (Portner et al., 2005). Além disso, Feely et al. (2004) relataram que a acidificação da água é potencialmente prejudicial para organismos com estruturas calcificadas, como moluscos gastrópodes e peixes de esqueleto ósseo, como também apresentado por Foster et al. (2016), os quais relataram deformidades esqueléticas no esqueleto de juvenis de corais.

Aumentos na concentração de CO₂ na água podem levar à interação deste gás com o plasma sanguíneo dos organismos aquáticos, caracterizando a hipercapnia (Guyton e Hall, 1996). O sangue acidificado pode gerar uma série de implicações para a homeostase corpórea, prejudicando processos como a ossificação. O microambiente ósseo quando com baixa irrigação sanguínea e em condições desfavoráveis de temperatura e acidez, pode demonstrar atividade enzimática de células-chave comprometida. Os osteoblastos e osteoclastos, responsáveis pela formação e remodelação óssea, respectivamente, devem expressar suas proteínas adequadamente para exercer suas funções. Por exemplo, a osteoprotegerina se relaciona com a formação dos arcos branquiais (Kimmel et al., 2003), enquanto a fosfatase ácida, a qual só é ativa quando em microambientes ácidos, relaciona-se com a manutenção de ossos como a coluna vertebral. Caso o microambiente ósseo não esteja homeostático, com irrigação e oxigenação adequadas, a ossificação pode ser comprometida. Devido à menor pressão parcial de O₂ resultante da interação do CO₂ na água, tais situações podem ter ocorrido, prejudicando a mineralização óssea das larvas de tambaqui.

Existem evidências que os peixes são relativamente resistentes a pequenos aumentos da concentração de CO₂ e acidificação da água (Ishimatsu et al., 2005, 2008). Os aumentos da concentração de CO₂ na água verificados no presente estudo foram significativos quando comparados com o cenário Atual. No entanto, maiores concentrações desse gás podem não ser prejudiciais aos peixes. Munday et al. (2009), utilizando concentrações atmosféricas muito semelhantes às utilizadas neste trabalho, relataram que pequenas diminuições no pH da água resultaram em larvas maiores e mais pesadas da espécie *Amphiprion percula*. O

mesmo foi verificado nas larvas de tambaqui, às quais apresentaram maior crescimento e ganho em massa em águas ligeiramente mais ácidas (cenários B1 e A1B).

O efeito combinado do aumento da temperatura com a diminuição do pH da água pode causar efeitos deletérios em organismos em início de desenvolvimento (Reynaud et al., 2003; Hill e Magnuson, 2011), como visualizado no presente estudo, no qual a combinação entre esses fatores resultou em larvas maiores e mais pesadas (cenários B1 e A1B) e em larvas menores e com desempenho inferior (cenário A2). No entanto, a incidência de anomalias esqueléticas - sendo na mandíbula, maxila e lordose as mais comuns - entre os diferentes cenários foi crescente e significativa, atingindo valores preocupantes no cenário A2. Sendo assim, mesmo que em temperaturas mais elevadas as larvas tendam a desempenhar melhor em termos de crescimento, o desenvolvimento normal das estruturas esqueléticas é comprometido por conta do efeito combinado entre a temperatura e a acidificação da água.

6 CONCLUSÕES

Na fase larval, o tambaqui se mostrou parcialmente resistente às condições ambientais adversas, porém dentro de um limite de tolerância, visto que em condições climáticas extremas, o desempenho zootécnico e o desenvolvimento normal da espécie foram comprometidos.

Os efeitos das mudanças climáticas sobre o desenvolvimento esquelético de larvas de tambaqui foram negativos, haja visto a maior incidência de deformidades registradas, especialmente nas larvas submetidas ao cenário mais drástico.

As larvas da espécie *Colossoma macropomum*, quando submetidas às temperaturas mais elevadas, podem apresentar melhor desempenho zootécnico, porém quando este aumento acompanha a redução do pH da água, efeitos deletérios podem surgir, como anomalias esqueléticas e altas taxas de mortalidade. No entanto, a espécie parece estar suficientemente adaptada caso as mudanças no clima que venham a ocorrer não sejam tão severas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, M.N.P.; FERREIRA-NOZAWA, M.S.; ARAÚJO, R.M.; VAL, A.L.; NOZAWA, S.R. Anoxia and hypoxia-induced expression of LDH-A in the Amazon oscar, *Astronotus crassipinis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 2, p. 315-322, 2011.
- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L. Adaptação bioquímica em peixes da Amazônia. **Ciência Hoje**, v. 11, p. 62-67, 1990.
- AMBRIZZI, T.; ROCHA, R.P.; MARENGO, J.A.; PISNITCHENCO, I.; NUNES, L.A.; FERNANDEZ, J.P.R. 2007. Cenários regionalizados de clima no Brasil e América do Sul para o século XXI: Projeções de clima futuro usando três modelos regionais. Relatório 3, Ministério do Meio Ambiente, 68. Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Diretoria de Conservação da Biodiversidade. São Paulo, SP. 108 pp.
- ARUL, V. Effect of temperature on yolk utilization of *Channa striatus*. **Journal of Thermal Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 1991.
- AZEVEDO, T.P.; WITTEN, P.E.; HUYSSEUNE, A.; BENSIMON-BRITO, A.; WINKLER, C.; TO, T.T.; PALMEIRIN, I. Interrelationship and modularity of notochord and somites: a comparative view on zebrafish and chicken vertebral body development. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 3, p. 316-319, 2012.
- BEGGS, G.L.; GUNN, J.M. Response of lake trout (*Salvelinus namaycush*) and brook trout (*S. fontinalis*) to surface water acidification in Ontario. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 30, n. 3, p. 711-717, 1986.
- BEITINGER, T.L.; BENNETT, W.A.; MCCAULEY, R.W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. **Environmental Biology of Fishes**, v. 58, n. 3, p. 237-275, 2000.
- BIRD, C.B.; MABEE, P.M. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). **Developmental Dynamis**, v. 228, p. 337-357, 2003.
- BOGLIONE, C.; GAVAIA, P.; KOUMOUNDOUROS, G.; GISBERT, E.; MOREN, M.; FONTAGNÉ, S.; WITTEN, P.E. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. S1, p. S99-S120, 2013^a.

BOGLIONE, C.; GISBERT, E.; GAVAIA, P.; WITTEN, P.E.; MOREN, M.; FONTAGNÉ, S.; KOUMOUNDOUROS, G. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. S1, p. S121-S167, 2013^b.

BOGLIONE, C.; MARINO, G.; GIGANTI, M.; LONGOBARDI, A.; DE MARZI, P.; CATAUDELLA, S. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. **Aquaculture**, v. 291, n. 1-2, p. 48-60, 2009.

BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn, Auburn University, 183 p.

BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasil, 2011.

CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 245-258, 2003.

CAI, W.; BORLACE, S.; LENGAGNE, M.; VAN RENSCH, P.; COLLIN, M.; VECCHI, G.; TIMMERMAN, A.; SANTOSO, A.; MCPHADEN, M.J.; WU, L.; ENGLAND, M.H.; WANG, G.; GUILYARDI, E.; JIN, F.F. Increasing frequency of extreme El Niño events due to greenhouse warming. **Nature Climate Change**, v. 4, p. 111-116, 2014.

CAMARA, E.M.; CARAMASCHI, E.P.; PETRY, A.C. Fator de condição: bases conceituais, aplicações e perspectivas de uso em pesquisas ecológicas com peixes. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 2, p. 249-274, 2011.

CASTELLO, L.; MACEDO, M.N. Large-scale degradation of Amazonian freshwater ecosystems. **Global Change Biology**, 2015. Artigo aceito para publicação.

CHAGAS, E.C.; VAL, A.L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 397-402, 2003.

CHIPPARI-GOMES, A.R.; GOMES, L.C.; LOPES, N.P.; VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and

anoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 141, p. 347-355, 2005.

CUBBAGE, C.C.; MABEE P.M. Development of the Cranium and Paired Fins in the Zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). **Journal of Morphology**, v. 229, p. 121-160, 1996.

DEAN, M.N.; SHAHAR, R. The structure - mechanics relationship and the response to load of the acellular bone of neoteleost fish: a review. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 3, p. 320-329, 2012.

DIONÍSIO, G.; CAMPOS, C.; VALENTE, L.M.P.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; CANCELA, M.L.; GAVAIA, P.J. Effect on egg incubation temperature on the occurrence of skeletal deformities in *Solea senegalensis*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 3, p. 471-476, 2012.

DIXSON, D.L.; MUNDAY, P.L.; JONES, G.P. Ocean acidification disrupts the innate ability of fish to detect predator olfactory cues. **Ecology Letters**, v. 13, n. 1, p. 68-75, 2010.

FÉ, L.M.L. **Expressão gênica e atividade enzimática da L-Lactato Desidrogenase (LDH) de *Paracheirodon axelrodi* (Schultz 1956) e *Paracheirodon simulans* (Géry 1963) expostos aos cenários climáticos previstos pelo IPCC para o ano de 2100.** 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, Manaus, 2014.

FEELY, R.A.; SABINE, C.L.; LEE, K.; BERELSON, W. KLEYPAS, J.; FABRY, V.J.; MILLERO, F.J. Impact of Anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 362-366, 2004.

FISHBASE. *Collossoma* macropomum (<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/819d6a87a748f6d1bf45619ce1dc03ab>). Acesso em: 13/01/2016.

FLORINDO, L.H.; LEITE, C.A.C.; KALININ, A.L.; REID, S.G.; MILSOM, W.K.; RANTIN, F.T. The role of branchial and orobranchial O₂ chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the Neotropical fish tambaqui (*Collossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 9, p. 1709-1715, 2006.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture. 243 pp, 2014.

FOSTER, T.; FALTER, J.L.; MCCULLOCH, M.T.; CLODE, P.L. Ocean acidification causes structural deformities in juvenile coral skeletons. **Science Advances**, v. 2 (2), p. 1-7, 2016.

FRIEDLINGSTEIN, P.; HOUGHTON, R.A.; MARLAND, G.; HACKLER, J.; BODEN, T.A.; CONWAY, T.J.; CANADELL, J.G.; RAUPACH, M.R.; CIAIS, P.; LE QUÉRÉ, C. Update on CO₂ emissions. **Nature Geoscience**, v. 3, n. 12, p. 811-812, 2010.

FRIIS-CHRISTENSEN, E.; LASSEN, K. Length of the solar cycle: an indicator of solar activity closely associated with climate. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 698-700, 1991.

FROESE, R. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 4, p. 241-253, 2006.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Cartilagem e Tecido Ósseo. Em: GARTNER, L.P.; HIATT, J.L (Eds.). Tratado de Histologia em Cores. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2007, p. 133-161.

GEORGA, J.; GLYNATSI, N.; BALTZOIS, A.; KARAMANOS, D.; MAZURAS, D.; DARIAS, M.J.; CAHU, C.L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; KOUMOUNDOUROS, G. Effect of vitamin A on the skeletal morphogenesis of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research**, v. 42, n. 5, p. 684-692, 2011.

GEORGAKOPOULOU, E.; KATHARIOS, P.; DIVANACH, P.; KOUMOUNDOUROS, G. Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). **Aquaculture**, v. 308, n. 1-2, p. 13-19, 2010.

GERLACH, T. Volcanic versus anthropogenic carbon dioxide. **Eos**, v. 92, n. 24, p. 201-202, 2011.

GISBERT, E.; MERINO, G.; MUGUET, J.B.; BUSH, D.; PIEDRAHITA, R.H.; CONKLIN, D.E. Morphological development and Allometric growth patterns in

hatchery-reared California halibut larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. 5, p. 1217-1229, 2002.

GOMES, L.C.; SIMÕES, L.N.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Orgs.) Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, Editora UFSM, 2013, p. 175-204.

GREEN, B.S.; FISHER, R. Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 299, n. 1, p. 115-132, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Transporte de Oxigênio e de Dióxido de Carbono no Sangue e em Outros Líquidos Corporais. Em: Guyton, A.C.; HALL, J.E. (Eds.) **Tratado de Fisiologia Médica**. Nona Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 1996. p. 377-385.

HAINES, T.A. Acidic precipitation and its consequences for aquatic ecosystems: a review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 110, n. 6, p. 669-707, 1981.

HALL, B.K. Bones and Cartilage: Developmental Skeletal Biology. 760 p. Elsevier, London, 2005.

HARDY, R.S.; LITVAK, M.K. Effects of temperature on the early development, growth, and survival of shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, and Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, yolk-sac larvae. **Environmental Biology of Fishes**, v. 70, n. 2, p. 145-154, 2004.

HAYASHI, M.; KITA, J.; ISHIMATSU, A. Acid-base responses to lethal aquatic hypercapnia in three marine fishes. **Marine Biology**, v. 144, n. 1, p. 153-160, 2003.

HILL, D.K.; MAGNUSON, J.J. Potential effects of global climate warming on the growth and prey consumption of great lakes fish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 119, p. 265-275, 2011.

HILL, R.W.; WYSE, G.A.; ANDERSON, M. Introdução à Fisiologia do Oxigênio e do Dióxido de Carbono. Em: HILL, R.W.; WYSE, G.A.; ANDERSON, M. (Eds.) *Fisiologia Animal* (2ª Ed.), pp. 531-545, 2012.

HOEGH-GULDBERG, O.; MUMBY, P.J.; HOOTEN, A.J.; STENECK, R.S.; GREENFIELD, P.; GOMEZ, E.; HARVELL, C.D.; SALE, P.F.; EDWARDS, A.J.; CALDEIRA, K.; KNOWLTON, N.; EAKIN, C.M.; IGLESIAS-PRIETO, R.; MUTHIGA, N.; BRADBURY, R.H.; DUBI, A.; HATZIOLOS, M.E. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. **Science**, v. 318, p. 1737-1742, 2007.

IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) 2007. Synthesis Report: An Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 73 p.

IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) 2014. Synthesis Report: Summary for Policymakers, 31 p.

ISHIMATSU, A.; HAYASHI, M.; KIKKAWA, T. Fishes in high-CO₂, acidified oceans. **Marine Ecology Progress Series**, v. 373, p. 295-302, 2008.

ISHIMATSU, A.; HAYASHI, M.; LEE, K.S.; KIKKAWA, T.; KITA, J. Physiological effects on fishes in a high-CO₂ world. **Journal of Geophysical Research**, v. 110, n. C9, p. 1-8, 2005

ISHIMATSU, A.; KIKKAWA, T.; HAYASHI, M.; LEE, K.S.; KITA, J. Effects of CO₂ on marine fish: larvae and adults. **Journal of Oceanography**, v. 60, n. 4, p. 731-741, 2004.

IZQUIERDO, M.S.; SOCORRO, J.; ROO, J. Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live preys. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 2, p. 320-326, 2010.

JAKSIC, F.M. Ecological effects of El Niño in terrestrial ecosystems of western South America. **Ecography**, v. 24, n. 3, p. 241-250, 2001.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 277-287, 2003.

JUNK, W.J.; BAILEY, P.B.; SPARKS, R.E. The flood pulse concept in river-floodplain systems. In: DODGE, D.P. (ed.) **Proceedings of the International Large River Symposium**, p.110-127, 1989.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. Em: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (Eds.) *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 135-152.

KARL, T.R.; TRENBERTH, K.E. Modern Global Climate Change. **Science**, v. 302, p. 1719-1723, 2003.

KOUMOUNDOUROS, G.; DIVANACH, P.; ANEZAKI, L.; KENTOURI, M. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Marine Biology**, v. 139, n. 5, p. 817-830, 2001.

KOVAK, V. Synchrony and heterochrony in ontogeny (of fish). **Journal of Theoretical Biology**, v. 217, n. 4, p. 499-507, 2002.

KOVEN, C.D.; SCHUUR, E.A.G.; SCHADEL, C.; BOHN, T.J.; BURKE, E.J.; CHEN, G.; CHEN, X.; CIAIS, P.; GROSSE, G.; HARDEN, J.W. et al. A simplified, data-constrained approach to estimate the permafrost carbon-climate feedback. **Philosophical Transactions A**, v. 373, p. 1-23, 2015.

LALL, S.P.; LEWIS-MCCREA, L.M.L. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - an overview. **Aquaculture**, v. 267, p. 3-19, 2007.

LEE, K.S.; KITA, J.; ISHIMATSU, A. Effects of lethal levels of environmental hypercapnia on cardiovascular and blood-gas status in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. **Zoological Science**, v. 20, n. 4, p. 417-422, 2003.

LEITÃO, N.J.; PAI-SILVA, M.D.; ALMEIDA, F.L.A.; PORTELLA, M.C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v. 315, n. 1-2, p. 78-85, 2011.

LIMA-JUNIOR, S.E.; CARDONE, I.B.; GOITEIN, R. Determination of a method for calculation of Allometric Condition Factor of fish. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 397-400, 2002.

LINNEA, A.; DIBBLE, M.V.; TURKIKI, P.R.; MITCHELL, H.S.; RYNBERGEN, H.J. **Nutrição**, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1998.

LOPES, T.S.; FREITAS, T.M.; JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; PORTELLA, M.C. Skeletal anomalies of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, larvae from a wild-caught broodstock. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, n. 1, p. 15-27, 2014.

MACKIE, E.J.; AHMED, Y.A.; TATARCZUCH, L.; CHEN, K.-S.; MIRAMS, M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, p. 46-62, 2008.

MASS, C.F.; PORTMAN, D.A. Major volcanic eruptions and climate: a critical evaluation. **Journal of Climate**, v. 2, p. 566-593, 1989.

MCDONALD, D.G. The effects of H⁺ upon the gills of freshwater fish. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, n. 4, p. 691-703, 1983.

MCPHADEN, M.J. The child prodigy of 1997-98. **Nature**, v. 398, p. 559-562, 1999.

MENOSSE, O.C.C.; TAKATA, R.; SÁNCHEZ-AMAYA, M.I.; FREITAS, T.M.; YÚFERA, M.; PORTELLA, M.C. Crescimento e estruturas do sistema digestório de larvas de pacu alimentadas com dieta microencapsulada produzida experimentalmente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 1, p. 1-10, 2012.

MORIN-KENSICKI, E.M.; MELANCON, E.; EISEN, J.S. Segmental relationship between somites and vertebral column in zebrafish. **Development**, v. 129, n. 16, p. 3851-3860, 2002.

MUNDAY, P.L.; DIXSON, D.L.; DONELSON, J.M.; JONES, G.P.; PRATCHETT, M.S.; DEVITSINA, G.V.; DØVING, K.B. Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 1848-1852, 2009.

NALON, M.A.; MATTOS, I.F.A.; FRANCO, G.A.D.C. Meio físico e aspectos da fragmentação da vegetação. Em: Diretrizes para a Conservação e Restauração da Biodiversidade no Estado de São Paulo. Programa BIOTA/FAPESP, São Paulo - Brasil, 2008.

NICIEZA, A.G.; METCALFE, N.B. Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: responses to depressed temperature and food availability. **Ecology**, v. 78, n. 8, p. 2385-2400, 1997.

NOBLE, C.; JONES, H.A.C.; DAMSGARD, B.; FLOOD, M.J.; MIDLING, K.Ø.; ROQUE, A.; SÆTHER, B.S.; COTTEE, S.Y. Injuries and deformities in fish: their

potential impacts upon aquacultural production and welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 61-83, 2012.

NOBRE, C.A.; SAMPAIO, G.; SALAZAR, L. Mudanças Climáticas e Amazônia. **Ciência e Cultura**, v. 59, p. 22-27, 2007.

OLIVEIRA, A.M. **Influência da temperatura ambiental e dos cenários climáticos futuros sobre os ácidos graxos ω -3 e ω -6 e desempenho zootécnico do tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2014. 138 f. Tese (Doutorado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, Manaus, 2014.

OU, M.; HAMILTON, T.J.; EOM, J.; LYALL, E.M.; GALLUP, J.; JIANG, A.; LEE, J.; CLOSE, D.A.; YUN, S.S.; BRAUNER, C.J. Responses of pink salmon to CO₂-induced aquatic acidification. **Nature Climate Change**, v. 5, p. 950-957, 2015.

PAGE, S.E.; SIEGERT, F.; RIELEY, J.O.; BOEHM, H.D.V.; JAYA, A.; LIMIN, S. The amount of carbon released from peat and forest fires in Indonesia during 1997. **Nature**, v. 420, p. 61-65, 2002.

PARRA, G.; YÚFERA, M. Feeding, physiology and growth responses in first-feeding gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae in relation to prey density. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 243, n. 1, p. 1-15, 2000.

PITTMAN, K.; YÚFERA, M.; PAVLIDIS, M.; AUDREY, A.J.; KOVEN, W.; RIBEIRO, L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; TANDLER, A. Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. S1, p. S224-S267, 2013.

POLO, A.; YÚFERA, M.; PASCUA, E. Effects of temperature on egg and larval development of *S. aurata* L. **Aquaculture**, v. 92, p. 367-375, 1991.

PORTELLA, M.C.; JOMORI, R.K.; LEITÃO, N.J.; MENOSSI, O.C.C.; FREITAS, T.M.; KOJIMA, J.T.; LOPES, T.S.; CLAVIJO-AYALA, J.A.; CARNEIRO, D.J. Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A review. **Aquaculture**, v. 432, p. 402-417, 2014.

PORTELLA, M.C.; LEITÃO, N.J.; TAKATA, R.; LOPES, T.S. Alimentação e Nutrição de Larvas. In: FRACALLOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. (Eds.) NUTRIAQUA: Nutrição

e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012, 185-216.

PORTNER, H.O.; KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. **Science**, v. 315, p. 95-97, 2007.

PORTNER, H.O.; LANGENBUCH, M. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: from Earth history to global change. **Journal of Geophysical Research**, v. 110, p. 1-15, 2005.

POTTHOFF, T. Clearing and staining techniques. In: MOSER, H.G.; RICHARDS, W.J.; COHEN, D.M.; FAHAY, M.P.; KENDALL JR., A.W.; RICHARDSON, S.L. (Eds.) *Ontogeny and Systematics of Fishes*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Special Publication, p. 35-37, 1984.

REYNAUD, S.; LECLERCQ, N.; ROMAINE-LIOUD, S.; FERRIER-PAGÉS, C.; JAUBERT, J.; GATTUSO, J.P. Interacting effects of CO₂ partial pressure and temperature on photosynthesis and calcification in a scleractinian coral. **Global Change Biology**, v. 9, p. 1660-1668, 2003.

ROSENZWEIG, C.; KAROLY, D.; VICARELLI, M.; NEOFOTIS, P.; WU, Q.; CASASSA, G.; MENZEL, A.; ROOT, T.L.; ESTRELLAS, N.; SEGUIN, B.; TRYJANOWSKI, P.; LIU, C.; RAWLINS, S.; IMESON, A. Attributing physical and biological impacts to anthropogenic climate change. **Nature**, v. 453, p. 353-358, 2008.

SAINT-PAUL, U. Diurnal routine O₂ consumption at different O₂ concentrations by *Colossoma macropomum* and *Colossoma brachypomum* (Teleostei: Serrasalminidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 89, n. 4, p. 675-682, 1988.

SAINT-PAUL, U.; SOARES, G.M. Diurnal distribution and behavioral responses of fishes to extreme hypoxia in an Amazon floodplain lake. **Environmental Biology of Fishes**, v. 20, n. 2, p. 91-104, 1987.

SALAZAR, L.F.; NOBRE, C.A.; OYAMA, M.D. Climate change consequences on the biome distribution in tropical South America. **Geophysical Research Letters**, v. 34, p. 1-6, 2007.

SAYER, M.D.J.; READER, J.P.; DALZIEL, T.R.K. Freshwater acidification: effects on the early life stages of fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 3, n. 2, p. 95-132, 1993.

SCHAEFER, K.; ZHANG, T.; BRUHWILLER, L.; BARRETT, A.P. Amount and timing of permafrost carbon release in response to climate warming. **Tellus B**, v. 63, p. 165-180, 2011.

SELF, S.; RAMPINO, M.R. The relationship between volcanic eruptions and climate change: still a conundrum? **Eos**, v. 69, n. 6, p. 74-86, 1988.

SUNDIN, L.; REID, S.G.; RANTIN, F.T.; MILSOM, W.K. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 1225-1239, 2000.

TACON, A.G.J. Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming systems. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 11, n. 3-4, p. 205-214, 1995.

TESCH, F.W. Age and growth. In: RICKER, W.E. (Ed.) Methods for assessment of fish production in fresh waters. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1968 p. 93-123.

TSENG, Y.C.; HU, M.Y.; STUMPP, M.; LIN, L.Y.; MELZNER, F.; HWANG, P.P CO₂-driven seawater acidification differentially affects development and molecular plasticity along life history of fish (*Oryzias latipes*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 165, n. 2, p. 119-130, 2013.

VIEIRA, V.L.A.; JOHNSTON, I.A. Muscle development in the tambaqui, an important Amazonian food fish. **Journal of Fish Biology**, v. 49, p. 842-853, 1996.

VIEIRA, V.L.A.; JOHNSTON, I.A. Temperature and neuromuscular development in the tambaqui. **Journal of Fish Biology**, v. 55, n. SA, p. 66-83, 1999.

VILLACORTA-CORREA, M.A.; SAINT-PAUL, U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in central Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 4, 1999.

WARGELIUS, A.; FJELLDAL, P.G.; HANSEN, T. Heat shock during early somitogenesis induces caudal vertebral column defects in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Development Genes and Evolution**, v. 215, n. 7, p. 350-357, 2005.

WERTH, D.; AVISSAR, R. The local and global effects of Amazon deforestation. **Journal of Geophysical Research**, v. 107, n. D20, 8087, 2002.

WILLEMSSEN, H.; KAMERS, B.; DAHLKE F.; HAN, H.; SONG, Z.; PIRSARAEI, Z.A.; TONA, K.; DECUYPERE, E.; EVERAERT, N. High and low temperature manipulation during late incubation: effects on embryonic development, the hatching process, and metabolism in broilers. **Poultry Science**, v. 89, p. 2678-2690, 2010.

WILSON, S.M.; NAGLER, J.J. Age, but not salinity, affects the upper lethal temperature limits for juvenile walleye (*Sander vitreus*). **Aquaculture**, v. 257, n. 1-4, p. 184-193, 2006

YÚFERA, M.; DARIAS, M.J. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 53-63, 2007.

ZANIBONI-FILHO, E.; MEURER, S. Limitações e potencialidades do cultivo de tambaqui (*Colossoma macropomum*) na região subtropical brasileira. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 24 (edição especial), p. 169-172, 1997.

ZHAO, M.; PITMAN, A.J.; CHASE, T. The impact of land cover change on the atmospheric circulation. **Climate Dynamics**, v. 17, p. 467-477, 2001.

8. LEGENDAS DE TABELAS

Tabela 1. Valores referentes ao aumento da temperatura e concentração média de gás carbônico dos principais cenários previstos para o final do século XXI, estimados a partir de modelos climáticos e dados socioambientais. **AR4**: quarto relatório divulgado pelo IPCC em 2007; **AR5**: quinto relatório divulgado pelo IPCC entre 2013 e 2014; **°C**: graus Celsius; **ppm**: partes por milhão.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água ao longo do experimento desenvolvido em salas climatizadas, representando diferentes cenários de mudança climática previstas pelo IPCC. Um asterisco indica diferença significativa em relação ao cenário Atual ($P < 0,05$). **Atual**: condições climáticas atuais; **B1**: cenário brando; **A1B**: cenário moderado; **A2**: cenário drástico.

Tabela 3. Valores médios do comprimento total (μm), massa úmida (μg) e sobrevivência ao longo do experimento (16 dias pós-eclosão). Médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($P < 0,05$), segundo o teste de Tukey. **Atual**: condições climáticas atuais; **B1**: cenário brando; **A1B**: cenário moderado; **A2**: cenário drástico.

Tabela 4. Incidência de anomalias esqueléticas encontradas em larvas de tambaqui submetidas à diferentes cenários de mudanças climáticas. **Atual**: condições climáticas atuais; **B1**: cenário brando; **A1B**: cenário moderado; **A2**: cenário drástico. A porcentagem total de larvas deformadas em cada cenário, seguidas por letras diferentes, indicam diferença significativa ($P < 0,05$) segundo o teste de Tukey.

Tabela 5. Frequências observadas menos frequências esperadas obtidas após padronização dos dados pelo teste Chi-quadrado. Valores positivos (negrito) indicam possíveis associações significativas entre linhas e colunas da tabela.

9. LEGENDAS DE FIGURAS

Figura 1. Emissões antropogênicas de gás carbônico oriundas da queima de combustíveis fósseis, produção de cimento e uso da terra. O acúmulo das emissões de gás carbônico é apresentado em barras. Fonte: IPCC (2014).

Figura 2. Variações da temperatura (A) e dos níveis de CO₂ (B) atmosféricos nas salas experimentais simulando os diferentes cenários de mudança climática previstos pelo IPCC para o final do século. **Atual:** condições climáticas atuais; **B1:** cenário brando; **A1B:** cenário moderado; **A2:** cenário drástico.

Figura 3. Massa (A) e comprimento total (B) das larvas de tambaqui submetidas a diferentes cenários de mudança climática. As letras indicam a comparação entre as médias dos tratamentos para cada coleta (dias). Médias estatisticamente semelhantes segundo o teste de Tukey ($P > 0,05$) não foram representadas por letras, enquanto letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$). **Atual:** condições climáticas atuais; **B1:** cenário brando; **A1B:** cenário moderado; **A2:** cenário drástico.

Figura 4. Consumo das reservas vitelínicas pelas larvas submetidas aos cenários de mudança climática ao longo dos seis dias de alimentação endógena. Médias estatisticamente semelhantes segundo o teste de Tukey ($P > 0,05$) não foram representadas por letras, enquanto letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$). **Atual:** condições climáticas atuais; **B1:** cenário brando; **A1B:** cenário moderado; **A2:** cenário drástico.

Figura 5. Índices zootécnicos de larvas de tambaqui submetidas aos cenários de mudança climática previstos pelo IPCC para o final do século, calculados entre os intervalos de biometria (5, 10 e 16 dias pós-eclosão). (A) Taxa de crescimento específico (% $\cdot$ dia⁻¹) aos 5, 10 e 16 dias pós-eclosão; (B) Ganho em massa (mg). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) segundo o teste de Tukey. **Atual:** condições climáticas atuais; **B1:** cenário brando; **A1B:** cenário moderado; **A2:** cenário drástico.

Figura 6. Fator de condição alométrico (K) de larvas de tambaqui submetidas à cenários de mudança climática, calculado a partir dos dados de massa (μ g) e comprimento (μ m) ao final dos 16 dias de experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) segundo o teste de Tukey.

Figura 7. Vista látero-lateral de larva de tambaqui recém-eclodida apresentando eixo corporal curvado dorso-ventralmente (A); larva de tambaqui submetida ao cenário Atual apresentando início da formação das estruturas ósseas craniais (3 dias pós-eclosão) (B); larva de tambaqui submetida ao cenário Atual evidenciando redução do saco vitelínico e notocorda desenvolvida (3 dias pós-eclosão) (C); **Sv:** saco vitelínico; **Nt:** notocorda; rastros branquiais (seta branca).

Figura 8. Vista látero-lateral de larva de tambaqui com 6 dias pós-eclosão evidenciando o aparelho de Weber (seta preta) já desenvolvido (A); vista ventrodorsal da larva evidenciando os rastros branquiais (seta branca) na porção dorsal do crânio; **Sv:** saco vitelínico.

Figura 9. Vista látero-lateral das larvas de tambaqui com 16 dias pós-eclosão submetidas ao cenário Atual de mudança climática. (A) início da formação das nadadeiras dorsal (**Nd**), adiposa (**Na**) e pélvica (**Np**); (B) flexão notocordal (seta preta) formando o pedúnculo caudal e dando origem à nadadeira caudal (**Nc**); (C) início da formação dos corpos vertebrais (seta branca) e esqueleto craniofacial com as regiões olfatória (**Olf**), orbital (**Orb**), mandibular (**Mand**), ótica (**Ótc**), hióide (**Hio**), branquial (**Branq**), opercular (**Op**), occipital (**Occp**); **Nt**: notocorda.

Figura 10. Anomalias no esqueleto axial de larvas de tambaqui submetidas ao cenário Drástico (A2) de mudança climática, indicados por setas pretas. (A) lordose: dobramento dorsolateral da notocorda; (B) cifose: dobramento ventrodorsal da notocorda; (C) escoliose: dobramento látero-lateral no eixo corpóreo.

Figura 11. Anomalias na região craniofacial de larvas de tambaqui submetidas ao cenário Brando (B1) de mudança climática. (A) anomalia na mandíbula; (B) anomalia na maxila.

Figura 12. Dendrograma obtido na análise de agrupamento por método hierárquico e distâncias euclidianas.

Figura 13. Mapa perceptual mostrando associações estatisticamente significativas entre deformidades esqueléticas e condições climáticas encontradas em larvas de tambaqui submetidas à diferentes cenários de modificações no clima. Tratamento Atual: condições climáticas atuais; B1: cenário brando; A1B: cenário moderado; A2: cenário drástico.

10. FIGURAS E TABELAS

Figura 1

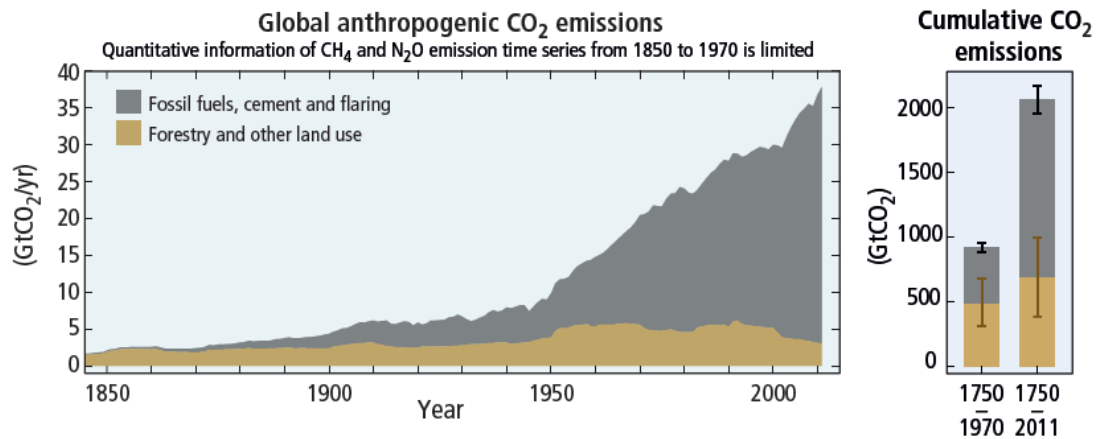


Figura 2 - A

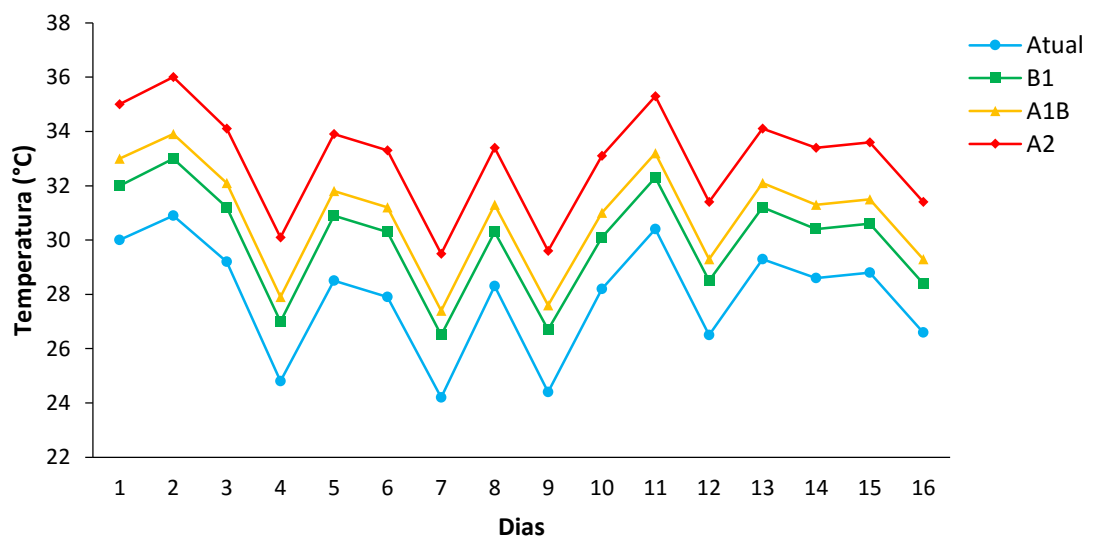


Figura 2 - B

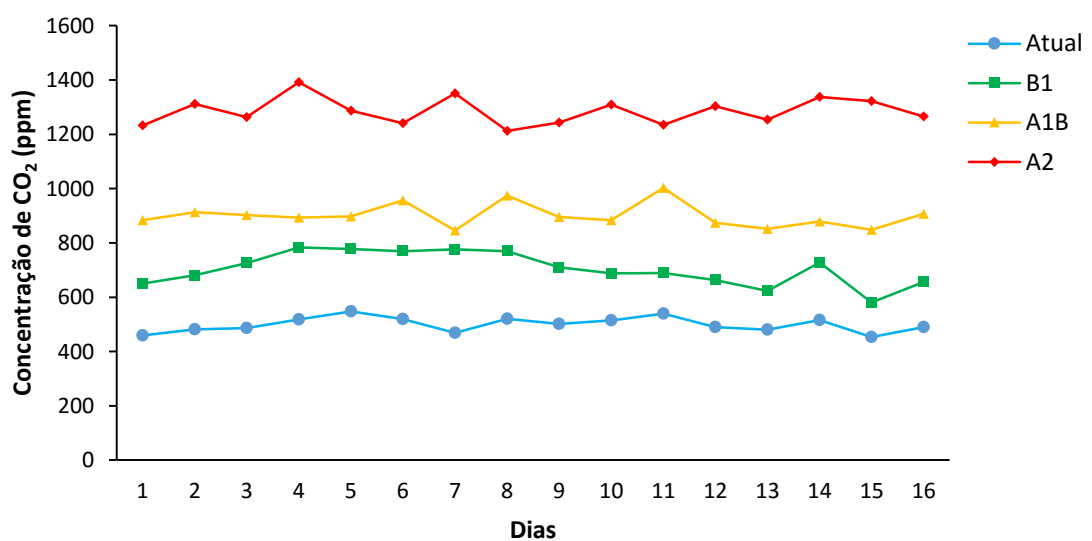


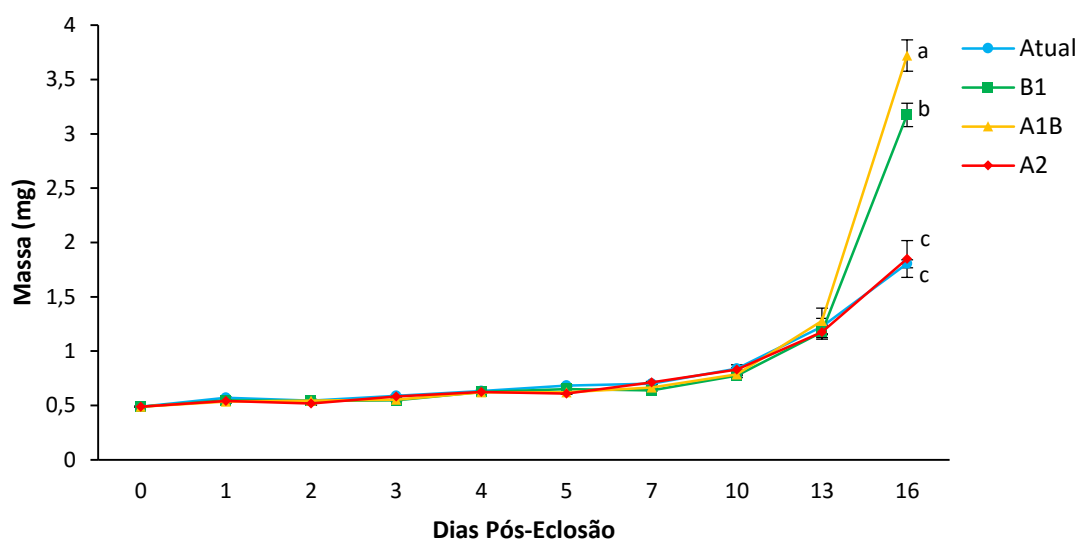
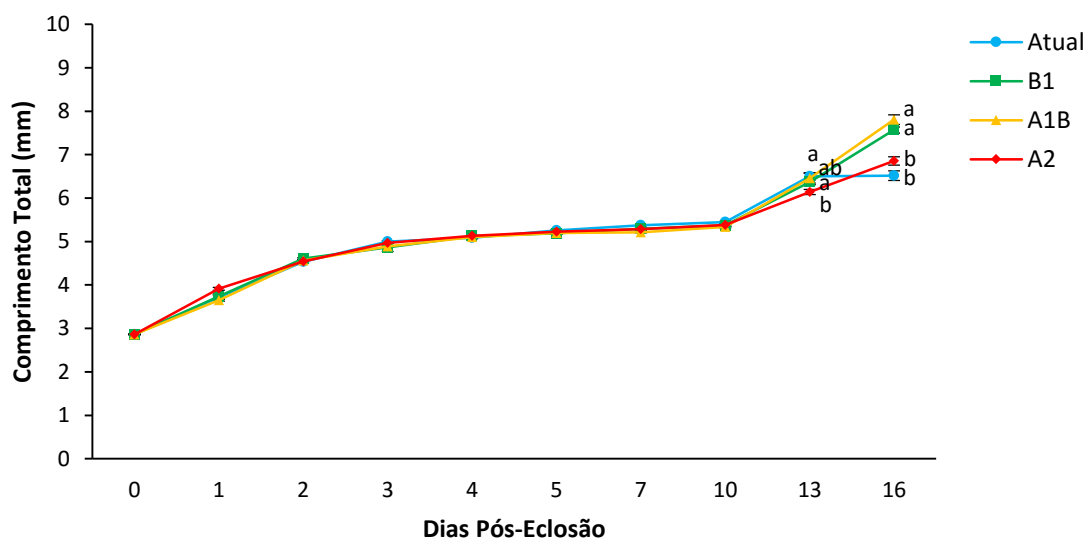
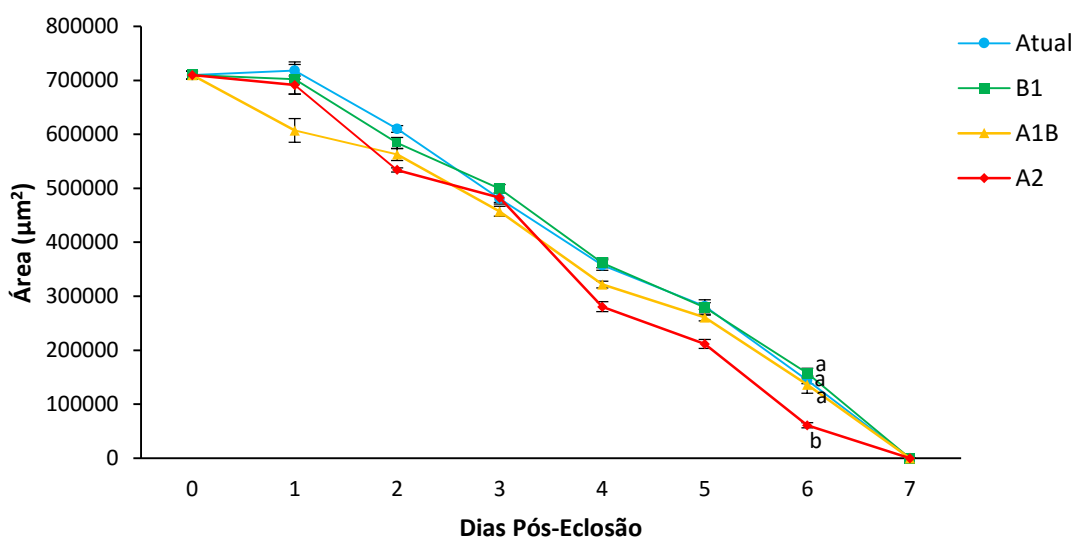
Figura 3 - A**Figura 3 - B****Figura 4**

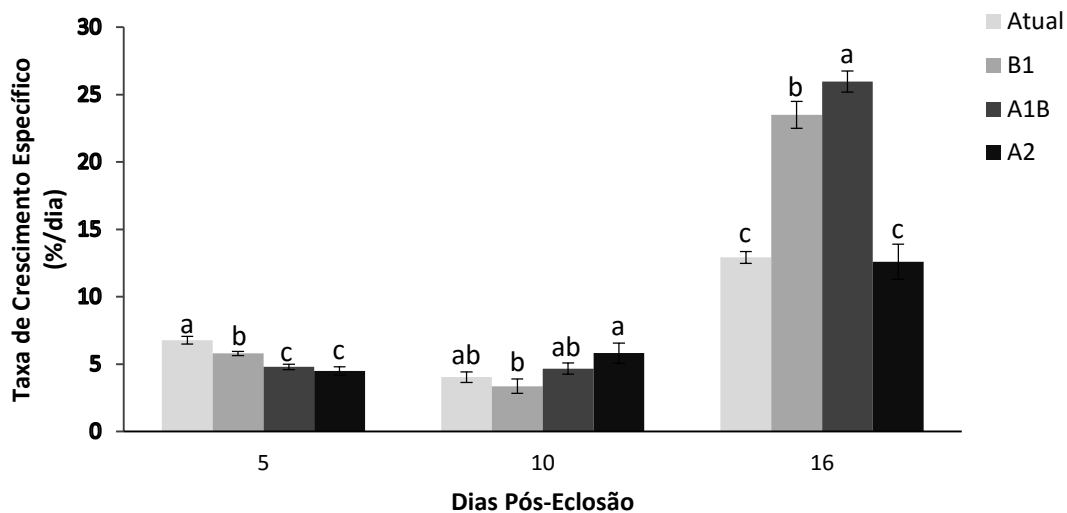
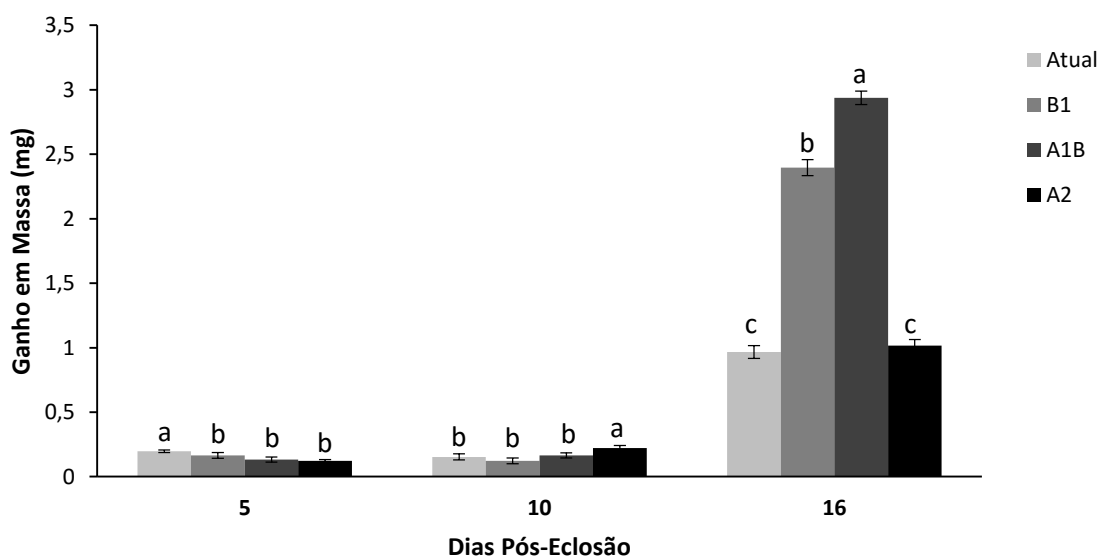
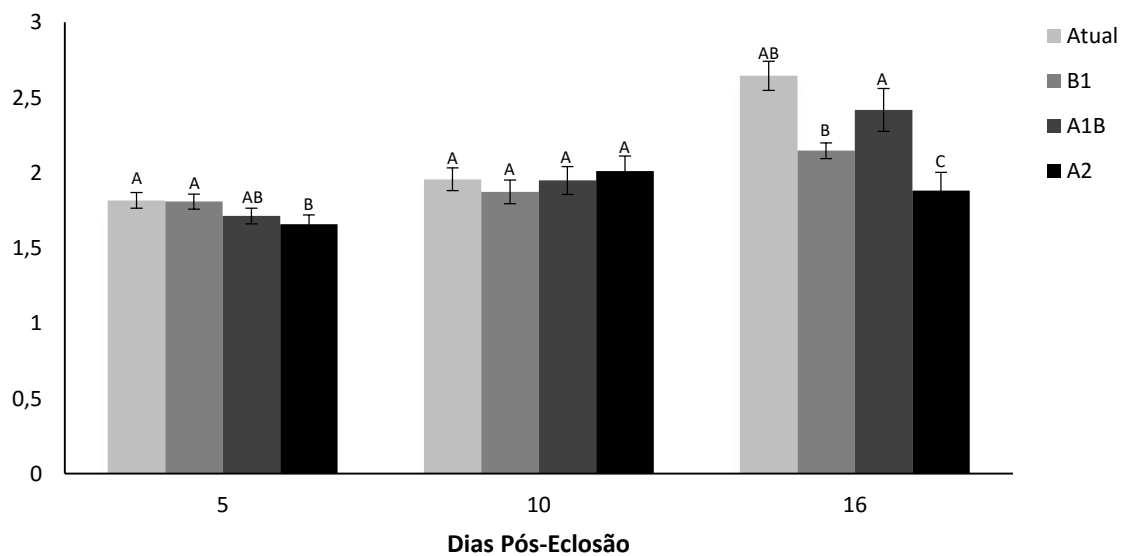
Figura 5 - A**Figura 5 – B****Figura 6**

Figura 7

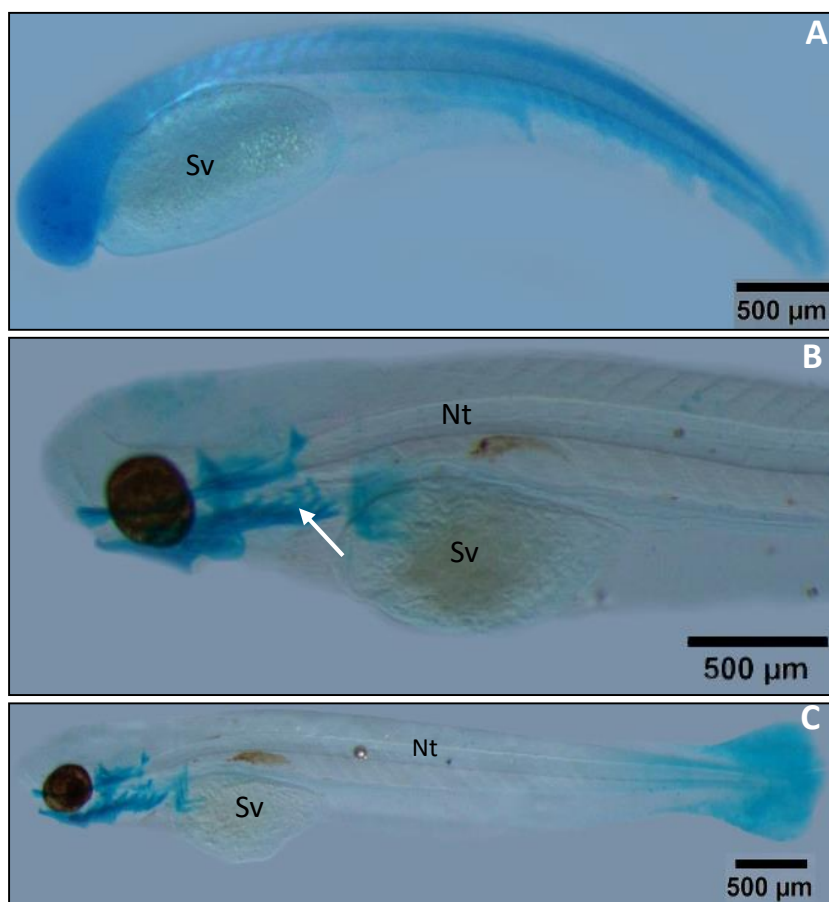


Figura 8

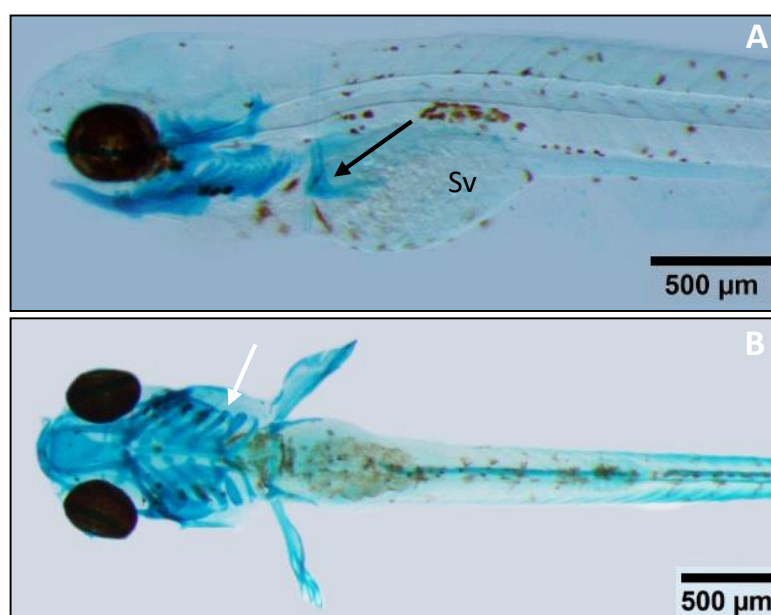


Figura 9

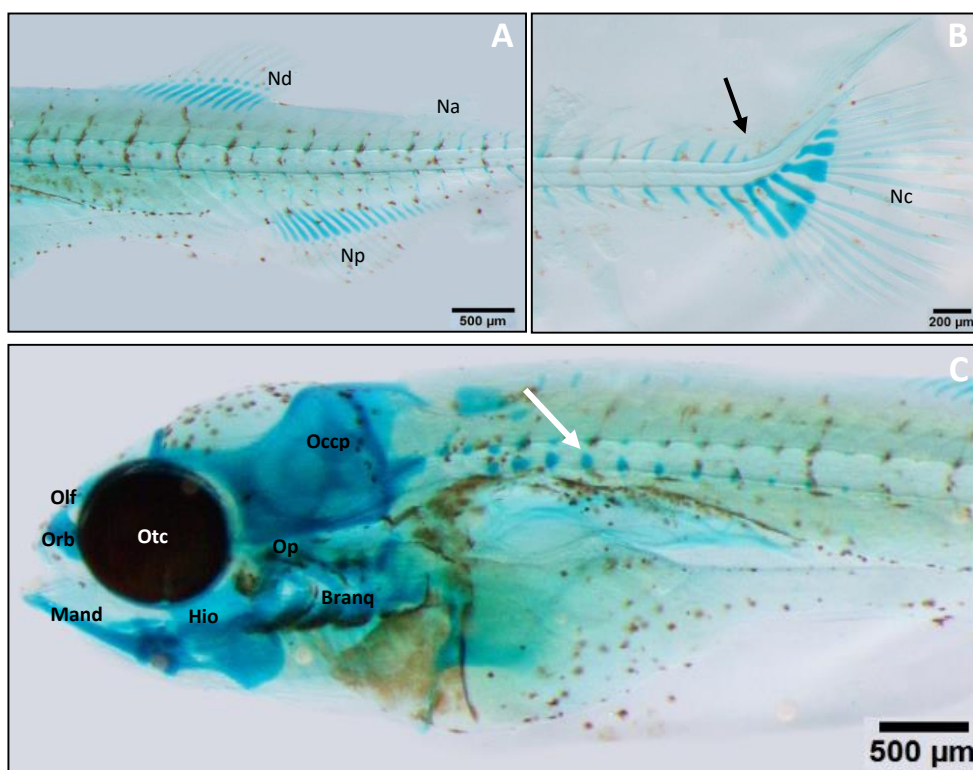


Figura 10

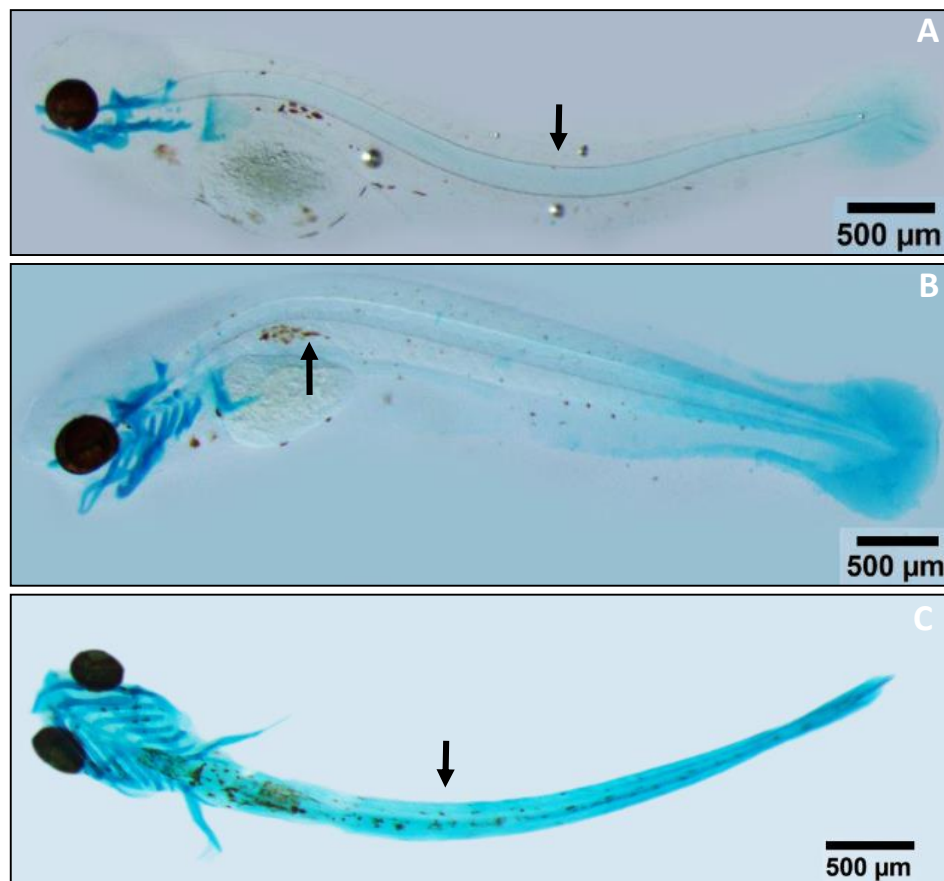


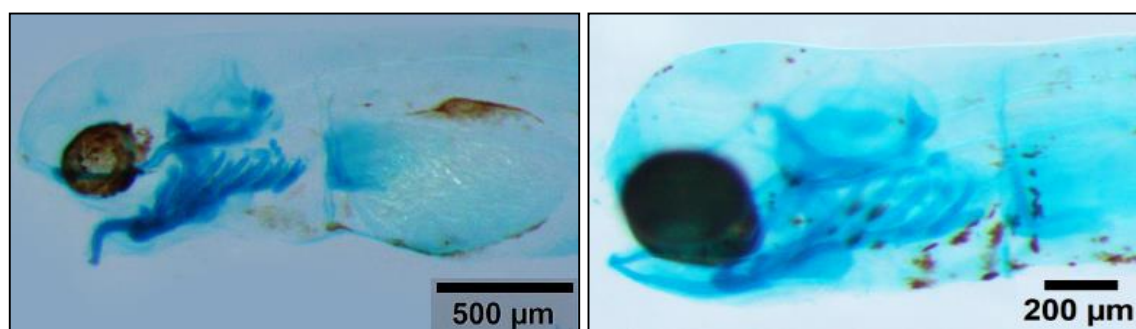
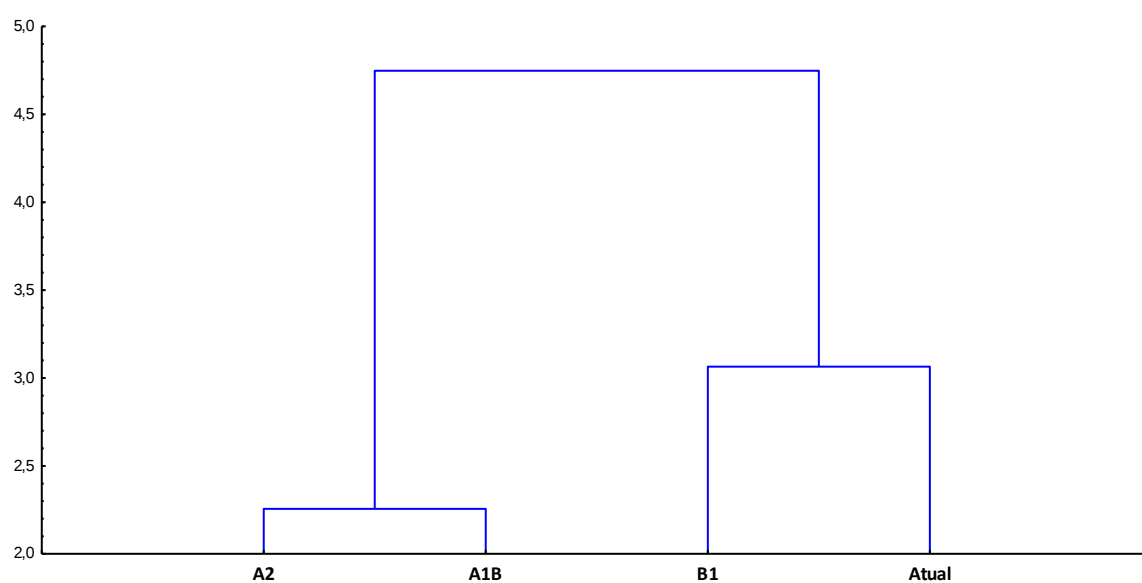
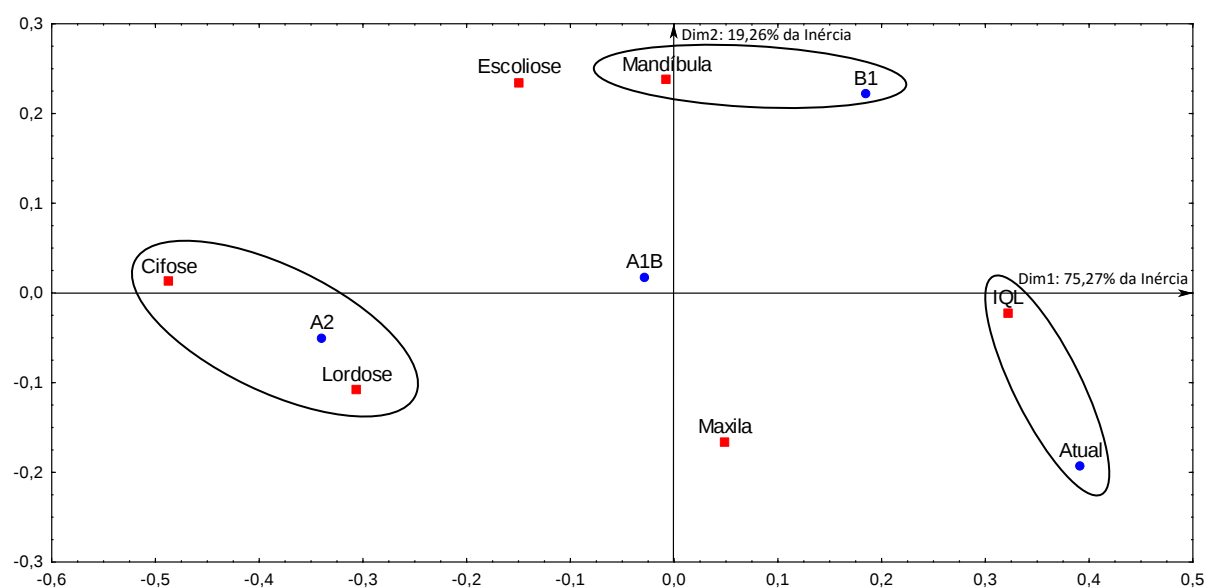
Figura 11**Figura 12****Figura 13**

Tabela 1

Cenários AR4	Aumento da Temperatura	Valores da Concentração de CO ₂
<i>B1</i>	1.1 - 2.9 °C	600 ppm
<i>A1B</i>	1.7 - 4.4 °C	850 ppm
<i>A2</i>	2.0 - 5.4 °C	1250 ppm
Cenários AR5		
<i>RCP2.6</i>	0.3 - 1.7 °C	450 ppm
<i>RCP4.5</i>	1.1 - 2.6 °C	650 ppm
<i>RCP6.0</i>	1.4 - 3.1 °C	860 ppm
<i>RCP8.5</i>	2.6 - 4.8 °C	>1000 ppm

Tabela 2

Cenário	Temperatura (°C)	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	CO ₂ (ppm)	pH
Atual	28,30 ± 0,30	7,34 ± 0,09	5,26 ± 0,27	7,10 ± 0,07
B1	30,00 ± 0,29*	7,07 ± 0,07	7,17 ± 0,48*	7,03 ± 0,09
A1B	31,02 ± 0,25*	6,88 ± 0,06*	11,16 ± 1,36*	6,96 ± 0,07
A2	32,50 ± 0,18*	6,64 ± 0,06*	15,20 ± 1,00*	6,80 ± 0,09

Tabela 3

Variáveis	Atual	B1	A1B	A2
Comprimento Total (µm)				
0 dpe	2862,5 ± 11,5 ^a	2862,5 ± 11,5 ^a	2862,5 ± 11,5 ^a	2862,5 ± 11,5 ^a
1 dpe	3742,1 ± 33,3 ^b	3694,6 ± 41,9 ^b	3665,1 ± 26,0 ^b	3911,3 ± 33,5 ^a
2 dpe	4530,7 ± 33,1 ^a	4606,7 ± 24,8 ^a	4566,2 ± 28,4 ^a	4543,2 ± 15,3 ^a
3 dpe	4998,7 ± 23,2 ^a	4865,5 ± 96,0 ^{ab}	4887,4 ± 16,4 ^b	4970,4 ± 19,0 ^a
4 dpe	5087,7 ± 21,9 ^a	5121,4 ± 8,2 ^a	5103,3 ± 16,6 ^a	5131,4 ± 14,7 ^a
5 dpe	5256,7 ± 14,7 ^a	5188,7 ± 23,6 ^a	5194,0 ± 18,3 ^a	5228,8 ± 17,0 ^a
7 dpe	5373,9 ± 12,2 ^a	5280,0 ± 15,1 ^b	5214,9 ± 16,0 ^c	5288,3 ± 28,7 ^{bc}
10 dpe	5444,7 ± 14,7 ^a	5331,4 ± 21,8 ^b	5326,2 ± 19,8 ^b	5372,1 ± 25,2 ^{ab}
13 dpe	6502,7 ± 82,1 ^a	6370,1 ± 61,1 ^{ab}	6460,4 ± 112,4 ^a	6127,2 ± 55,1 ^b
16 dpe	6494,8 ± 72,7 ^b	7567,3 ± 68,6 ^a	7804,9 ± 111,7 ^a	6846,9 ± 90,1 ^b
Massa Úmida (µg)				
0 dpe	486,8 ± 6,3 ^a	486,8 ± 6,3 ^a	486,8 ± 6,3 ^a	486,8 ± 6,3 ^a
1 dpe	569,5 ± 7,8 ^a	547,3 ± 9,7 ^a	535,3 ± 10,8 ^a	541,3 ± 13,6 ^a
2 dpe	544,5 ± 4,4 ^a	541,3 ± 4,4 ^a	544,6 ± 10,3 ^a	517,3 ± 15,3 ^a
3 dpe	589,4 ± 5,2 ^a	535,0 ± 6,0 ^b	538,1 ± 3,6 ^b	582,6 ± 4,4 ^a
4 dpe	631,4 ± 7,2 ^a	622,6 ± 4,8 ^a	620,5 ± 6,2 ^a	624,9 ± 5,2 ^a
5 dpe	683,9 ± 8,1 ^a	641,8 ± 4,2 ^b	619,2 ± 5,3 ^c	610,2 ± 7,9 ^c
7 dpe	698,7 ± 6,0 ^{ab}	639,5 ± 8,4 ^c	664,4 ± 5,9 ^{bc}	712,8 ± 6,9 ^a
10 dpe	837,7 ± 11,2 ^a	773,4 ± 18,2 ^a	785,0 ± 11,6 ^a	831,1 ± 42,3 ^a
13 dpe	1225,8 ± 75,4 ^a	1173,3 ± 47,4 ^a	1278,1 ± 101,1 ^a	1155,7 ± 103,1 ^a
16 dpe	1821,1 ± 34,3 ^c	3168,0 ± 91,3 ^b	3698,1 ± 128,8 ^a	1795,1 ± 129,5 ^c
Sobrevivência (%)	29,3 ± 0,3 ^a	27,5 ± 0,6 ^{ab}	26,3 ± 0,7 ^b	24,7 ± 1,0 ^b

Tabela 4

Deformidades Esqueléticas	Atual	B1	A1B	A2	TOTAL
Lordose (%)	4,59	4,77	7,43	15,19	31,98
Escoliose (%)	0,88	3,01	3,71	3,71	11,31
Cifose (%)	0,70	1,93	3,01	6,36	12,00
Mandíbula (%)	3,01	7,24	5,65	7,06	22,96
Maxila (%)	5,30	3,35	6,55	6,55	21,75
Larvas Avaliadas	501	512	402	486	1901
Σ de larvas deformadas (%)	15,38 ^c	21,28 ^{bc}	34,82 ^b	39,91 ^a	—

Tabela 5

Cenários	Lordose	Escoliose	Cifose	Mandíbula	Maxila	IQL
Atual	-9,3010	-7,4821	-9,2622	-8,3542	6,0109	28,3886
B1	-14,0376	2,4895	-4,4174	11,5255	-8,8874	13,3274
A1B	-3,3718	4,9569	-0,0457	-0,5874	6,1672	-7,1191
A2	26,7103	0,0357	13,7254	-2,5837	-3,2907	-34,5969