

## AVALIAÇÃO METODOLÓGICA PARA OBTENÇÃO DA TEMPERATURA CRÍTICA MÁXIMA (CTMAX) EM EMBRIÕES DE PEIXES

LUIZE REAL LANSINI<sup>1</sup>; ANA BEATRIZ HENZEL<sup>2</sup>; RICARDO BERTEAUX ROBALDO<sup>3</sup>; YURI DORNELLES ZEBRAL<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [luizerlansini@gmail.com](mailto:luizerlansini@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [biahenzel@hotmail.com](mailto:biahenzel@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [ricardo\\_robaldo@ufpel.tche.br](mailto:ricardo_robaldo@ufpel.tche.br)

<sup>4</sup> Fundação Universidade Federal de Rio Grande – [yurizebral@hotmail.com](mailto:yurizebral@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A temperatura é um fator de extrema importância para a manutenção dos diversos níveis da vida, influenciando desde reações bioquímicas até a estruturação de comunidades (HILLMAN, 1969; SHEN, 1988; MIRANDA, 2013; CHOUDRI, 2013; BOWDEN, 2014). Frente a isso, o desafio que o processo do aquecimento irá gerar aos sistemas biológicos vem preocupando a comunidade. As previsões mais recentes (IPPC) demonstram que, se o efeito estufa continuar constante, haverá um aumento da temperatura de 0.1-0.2°C por década (MANCIOCCO, 2014). A forma como as populações animais e vegetais irão lidar com esse aquecimento são desconhecidas, mas processos de extinção são esperados (TERBLANCHE, 2011). Dentro deste contexto, existe um grande interesse em entender os mecanismos que determinam os limites térmicos das espécies e os fatores que podem alterá-los (REZENDE, 2011).

Por ser uma característica plástica, a tolerância térmica pode ser influenciada por diversos fatores (REZENDE, 2011). Entre as ferramentas existentes para se determinar o limite térmico das espécies, a Temperatura Crítica Máxima (CTMax) é uma das mais populares. Este método foi introduzido por Cowles e Borget em 1944 (LUTTERSCHIMIDT, 1997), e que Becker (1979) define como sendo um aumento gradual da temperatura de aclimatação até se atingir uma resposta de desordem física (*endpoint*) que antecede a morte. Dessa forma, determina o limite entre a tolerância e resistência do indivíduo (LUTTERSCHIMIDT, 1997). No entanto, o uso errôneo da técnica pode influenciar nos resultados finais (REZENDE, 2011; LUTTERSCHIMIDT, 1997). Algumas variáveis podem ser fatores de confusão na interpretação final do resultado obtido. São exemplos: o tamanho dos indivíduos (CHOW, 2009; RECSETAR, 2012), os indicadores do *endpoint* (LUTTERSCHIMIDT, 1997, LIGHTON, 2004) e a intensidade das taxas de aquecimento as quais os animais são expostos (LUTTERSCHIMIDT, 1997; MORA, 2006).

Frente ao observado, pretendemos avaliar a CTMax de embriões de peixes em nosso laboratório. Contudo, o objetivo do nosso trabalho foi testar diversos métodos para a obtenção da CTMax e selecionar aquele que apresentasse melhor desempenho. Conjuntamente, foram feitos testes para avaliar a confiabilidade e a reproduzibilidade do método proposto.

### 2. METODOLOGIA

Para a obtenção da taxa de aquecimento, foram realizados testes utilizando a placa de aquecimento DB-IVA Hotplate® ajustada à variadas temperaturas constantes (50, 60, 65, 67 e 70°C). Utilizaram-se diferentes materiais (placa de petri e potes de plástico) e volumes de água (20, 100 e 150

mL) com o intuito de definir qual se adequaria melhor para testar o objetivo buscado.

#### *Desenho amostral*

Os métodos utilizados foram os seguintes (material/volume de água/temperatura constante da placa de aquecimento): placa de petri/20mL t/50°C, placa de petri/20mL/60°C, placa de petri/20mL/65°C, placa de petri/20mL/67°C, placa de petri/20mL/70°C, pote de plástico de 600mL/100mL/65°C, pote de plástico de 600 mL/150mL/65°C. Cada um dos métodos supracitados foi realizado da seguinte maneira: as unidades experimentais (cada recipiente) foram posicionadas no mesmo local sobre a placa em todos os ensaios. A temperatura inicial da água era de 28°C e foi aquecida até chegar a temperatura final de 40°C. O aquecimento da água foi controlado com o auxílio de três termômetros digitais que foram fixados ao fundo da unidade experimental. A cada um minuto as temperaturas marcadas em cada um dos termômetros eram anotadas a fim de se ter a taxa de aquecimento média por minuto. Após da realização do ensaio com cada método eram avaliados a taxa média de aquecimento por minuto desvio padrão e o tempo a atingir a temperatura final estipulada. A partir da seleção do método que apresentou melhor desempenho inicial, foram seguidos os experimentos para os testes de confiabilidade e reproduzibilidade. O teste de confiabilidade se relaciona a presença de estratificação térmica dentro de cada unidade amostral. Para esta análise, as taxas de aquecimento dos termômetros de cada unidade amostral foram comparadas. As análises de reproduzibilidade foram avaliadas a partir da comparação entre as réplicas de cada potência testada.

#### *Análise estatística*

Os dados, por não apresentarem distribuição normal, foram analisados através do teste analítico para dados não paramétricos de Kruskall-Wallis com nível de significância de 95%.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os testes realizados com as placas de petri apresentaram taxas médias de aquecimento de  $0,2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na temperatura de 50°C,  $0,3 \pm 0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na temperatura de 60°C,  $0,7 \pm 0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na temperatura de 65°C e  $0,7 \pm 0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $1,1 \pm 0,9$  para as temperaturas de 67 e 70°C, respectivamente. Os testes com placa de petri nas temperaturas de 50 e 60°C a temperatura da água estabilizou antes da atingir os 40°C. O método em que foi utilizado o pote de plástico de 600 mL com 100 mL de água (65°C), apresentou uma taxa média de aquecimento de  $0,6 \pm 0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Para o pote plástico de 600 mL com 150 mL de água (65°C) foi obtida taxa média de aquecimento de  $0,4 \pm 0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Depois da realização dos ensaios, o pote plástico de 600 mL com volume de 100 mL de água, em comparação aos outros, apresentou um desempenho mais satisfatório e foi o escolhido para a realização dos demais testes. Foram feitos então mais seis ensaios (réplicas) com esse método e não foram observadas diferenças entre as taxas de aquecimento médias entre os termômetros dentro de cada unidade experimental (teste de confiabilidade), nem entre as taxas médias de aquecimento entre cada um dos ensaios feitos (teste de reproduzibilidade). A tabela 1 apresenta os resultados da análise de estratificação

térmica de cada unidade amostral, enquanto a tabela 2 apresenta o resultado da comparação entre as taxas médias de aquecimento de cada réplica.

Tabela 1. Dados da análise de estratificação térmica de cada unidade amostral, referentes à análise de confiabilidade. Os dados são apresentados em forma de média e desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ).

Ensaio	Termômetros	Taxa média de aquecimento $\pm$ desvio padrão ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
Ensaio I	Termômetro I	$0.3 \pm 0.2$
	Termômetro II	$0.3 \pm 0.2$
	Termômetro III	$0.4 \pm 0.2$
Ensaio II	Termômetro I	$0.4 \pm 0.2$
	Termômetro II	$0.4 \pm 0.2$
	Termômetro III	$0.4 \pm 0.2$
Ensaio III	Termômetro I	$0.4 \pm 0.2$
	Termômetro II	$0.4 \pm 0.2$
	Termômetro III	$0.5 \pm 0.2$
Ensaio IV	Termômetro I	$0.4 \pm 0.2$
	Termômetro II	$0.4 \pm 0.2$
	Termômetro III	$0.4 \pm 0.2$
Ensaio V	Termômetro I	$0.3 \pm 0.2$
	Termômetro II	$0.3 \pm 0.2$
	Termômetro III	$0.3 \pm 0.2$
Ensaio VI	Termômetro I	$0.3 \pm 0.2$
	Termômetro II	$0.3 \pm 0.2$
	Termômetro III	$0.3 \pm 0.2$

Tabela 2. Teste de reprodutibilidade: Taxas médias de aquecimento por ensaio realizado. Os dados são apresentados em forma de média  $\pm$  desvio padrão. Os dados são referentes aos ensaios I, II, III, IV, V e VI respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ).

Ensaio	Taxa média de aquecimento $\pm$ desvio padrão ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
Ensaio I	$0.4 \pm 0.2$
Ensaio II	$0.4 \pm 0.2$
Ensaio III	$0.5 \pm 0.2$
Ensaio IV	$0.4 \pm 0.2$
Ensaio V	$0.4 \pm 0.2$
Ensaio VI	$0.3 \pm 0.2$

#### 4. CONCLUSÕES

O método desenvolvido neste trabalho demonstrou ser confiável e reprodutível, nos permitindo futuramente a testar a CTMax em embriões de peixe em nosso laboratório. Além do mais, é um método no qual não exige materiais sofisticados, podendo ser reproduzível em laboratórios com poucos recursos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HILLMAN, P. E. Habitat specificity in three sympatric species of Ameiva (Reptilia: Teiidae). **Ecology**, v.50 p.476-481, 1969.
- SHEN, K.; SCHWARTZKROIN, P. A. Effects of temperature alterations on population and cellular activities in hippocampal slices from mature and immature rabbit. **Brain Research**, v.475, p.305-316, 1988.
- MIRANDA, L. A. Et al. Effects of global warming on fish reproductive endocrine axis, with special emphasis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.192, p.45-54, 2013.
- CHOUUDRI, B. S.; BAAWAIN, M. Thermal Effects. **Water Environment Research**, v.85, n.10, p.1934-1953, 2013.
- BOWDEN, A. J. Et al. Alterations in gill structure in tropical reef fishes as a result of elevated temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.175, p. 64-71, 2014.
- MANCIOCCO, A.; CALAMANDREI, G.; ALLEVA, E. Global warming and environmental contaminants in aquatic organisms: the need of the etho-toxicology approach. **Chemosphere**, v.100, p.1-7, 2014.
- TERBLANCHE, J.S. et al. Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. **The Journal of Experimental Biology**, v.214, p.3713–3725, 2011.
- REZENDE, E.L.; TEJEDO, M.; SANTOS, M. Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: Methodological problems and evolutionary implications. **Functional Ecology**, v.25, n.1, p.111–121, 2011.
- LUTTERSCHIMIDT, W.I.; HUTCHINSON, V.H. The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. **Canadian Journal of Zoology**, v.75, p.1553–1560, 1997.
- CHOWN, S.L.; JUMBAM, K.R.; SORENSE, J.G.; TERBLANCHE, J.S. Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. **Functional Ecology**, v.23, p.133–140, 2009.
- LIGHTON, J.R.B.; TURNER, R.J. Thermolimit respirometry: an objective assessment of critical thermal maxima in two sympatric desert harvester ants, *Pogonomyrmex rugosus* and *P. californicus*. **The Journal of Experimental Biology**, v.207 p.1903–1913, 2004.
- MORA, C.; MAYA, M. F. Effectt of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. **Journal of Thermal Biology**, v.31, p.337-341, 2006.
- RECSETAR, M. S. Et al. Relationship between fish size and upper thermal tolerance. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.141, n.6, p.1433-1438, 2012.