

AJUSTES HEMATOLÓGICOS EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* CURVIER, 1818) EXPOSTO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CHORUME

HEMATOLOGICAL ADJUSTMENTS OF TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) EXPOSED TO DIFFERENT LEACHATE LEVELS

CAMBIOS HEMATOLÓGICOS EN CACHAMAS (*Colossoma macropomum* cuvier, 1818) EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PERCOLADO DE RELLENO SANITARIO

ANDRADE-JR, GILBERTO DE¹ MSc, ARIDE, PAULO HENRIQUE ROCHA² Dr, HONDA, RUBENS TOMIO¹ Dr, FERREIRA, MARCIO SOARES³ MSc, NOZAWA, SERGIO RICARDO¹ Dr, SANTOS, SUELEN MIRANDA² MSc, PANTOJA-LIMA, JACKSON² Dr.

¹Pós-graduação Biologia Urbana UniNilton Lins, Av. Prof. Nilton Lins, 3259, CEP 69058-030. Parque das Laranjeiras, Manaus-AM. ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – IFAM Campus Presidente Figueiredo, Av. Onça Pintada, 1308, Bairro Galo da Serra CEP. 69.735-000, Presidente Figueiredo-AM. ³Bolsista FAPEAM – Programa de Pós-graduação Biologia de Água Doce e Pesca Interior/INPA, Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69060-001 - Manaus -AM, Brasil

Correspondência: jacksonpantoja@gmail.com

Recibido: 30-08-2012; Aceptado: 04-12-2012.

Resumo

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar as alterações fisiológicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposto ao chorume. O chorume é um líquido produzido pela massa orgânica do lixo durante o processo de degradação biológica. Este chorume foi adquirido no aterro controlado da cidade de Manaus localizado no km 19, rodovia AM 010 (Manaus-Itacoatiara). Os experimentos foram realizados no laboratório do Centro Universitário Nilton Lins (CUNL). Foram realizados dois experimentos, determinação da CL₅₀, estabelecido em 2,06 v/v para o tempo de 24 horas e análises hematológicas utilizando a CL₅₀ pré-determinada. Foram analisados os índices de cortisol, glicose, Hematócrito, Hemoglobina, células vermelhas, constantes corpusculares. Juvenis de tambaqui com pesos de 15±4,6g, e comprimento de 7±2cm foram utilizados. A espécie *Colossoma macropomum* não apresentou alterações estatísticas significativas nos índices hematológicos, de cortisol e de glicose quando expostos a concentração de 2,06 v/v de chorume por 3,6 e 9 horas.

Palavras chave: tambaqui, chorume, ajustes fisiológicos, cortisol, glicose.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the physiological changes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposed to leachate. The leachate is a liquid

produced by the organic mass waste during the process of biological degradation. It was purchased in landfill controlled the city of Manaus located in Manaus-Itacoatiara highway (Km19). The experiments were conducted in the laboratory of the University Center Nilton Lins (CUNL). Two experiments were carried out, determining the LC50 (2.06 v / v) to the time of 24 hours, and hematological analysis using the LC50 pre-determined, which analyzed the concentrations of cortisol, glucose, Ht, Hb, CBR, VCM, MCH and MCHC. Juveniles of tambaqui with weights of 15 ± 4.6 g, and length of 7 ± 2 cm was used. *Colossoma macropomum* specie not showed statistically significant changes in haematological parameters, cortisol and glucose when exposed to a concentration of 2.06 v / v slurry for 3.6 and 9 hours.

Key words: tambaqui, leachate, physiological responses, cortisol, glucose.

Resumen

El objetivo principal de este estudio fue evaluar los cambios fisiológicos de cachamas (*Colossoma macropomum*) expuestas a la influencia de un relleno sanitario. La suspensión es un líquido producido por la masa de residuos orgánicos en el proceso de degradación biológica. Esta suspensión fue adquirida en un vertedero controlado de la ciudad de Manaus, ubicada en el km 19 de la carretera AM 010 (Manaus-Itacoatiara). Los experimentos se realizaron en el laboratorio del Centro Universitário Nilton Lins (CUNL). Se realizaron dos experimentos, la determinación de la CL₅₀ (2,06 v / v) para el tiempo de 24 horas y hematológicos analiza utilizando el LC₅₀ predeterminado. Se analizaron los niveles de cortisol, glucosa, hematocrito, hemoglobina, glóbulos rojos corpusculares. Fueron utilizados cachamas con peso de $15 \text{ g} \pm 4,6$ y longitud de 7 ± 2 cm. La especie *Colossoma macropomum* no mostraron cambios estadísticos significativos para los parámetros hematológicos cuando el cortisol y la concentración de glucosa se exponen a 2,06 v/v de suspensión durante 3,6 horas y 9 horas.

Palabras clave: cachama, percolado de relleno sanitario, cambios fisiológicos, cortisol, glucosa.

Introdução

As alterações dos ambientes aquáticos constituem um dos mais sérios problemas ecológicos da atualidade. Tais alterações são provocadas por inúmeras atividades humanas que estão relacionadas à necessidade de um constante crescimento econômico (JARDIM, 1992). Isto tem gerado à necessidade de se monitorar e controlar a contaminação dos diversos ambientes por meio de avaliações de parâmetros físico-químicos e biológicos, principalmente os ambientes aquáticos (CONAMA, 2005).

O grande número de avaliações já realizadas referente aos efeitos biológicos de substâncias químicas nos organismos aquáticos tem se baseado nos

resultados de testes de toxicidade laboratoriais. Este processo gerou uma padronização dos testes fisiológicos, com eficiência e custos moderados para o monitoramento de algumas substâncias químicas e suas potencialidades (RAND e PETROCELLI, 1985; FERREIRA, 2002; METCALF e EDDY, 2003).

Entre os vários agentes tóxicos que influenciam drasticamente a qualidade dos ambientes aquáticos podemos destacar o chorume, líquido produzido pela massa orgânica do lixo durante o processo de degradação biológica. Este líquido em contato com a água da chuva percola a massa de lixo, geralmente depositado na forma de aterro, gerando assim o lixiviado tóxico. O chorume pode ser considerado como um efluente complexo que pode conter diversos compostos orgânicos (ácidos orgânicos, substâncias húmicas, solventes, alcoóis, fenóis, compostos aromáticos, pesticidas, entre outros), metais potencialmente tóxicos (Cd, Zn, Cu, Pb, entre outros) e muitos outros íons (NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , S^{2-} , HCO_3^-) (CABRERA e RODRIGUEZ, 1999).

Vários organismos-teste, preferencialmente espécies de peixes autóctones, estão sendo utilizados para avaliar a toxicidade aguda de agentes químicos (IBAMA, 1987). Neste contexto, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) tem sido utilizado por ser uma espécie de fácil manejo e manutenção em laboratório (ARIDE *et al.*, 2010). Estas características são requisitos básicos para experimentos de toxicidade e tolerância em ambientes experimentais (SPRAGUE, 1990). Vários são os trabalhos que expuseram o tambaqui a agentes estressante, como o pH (WOOD *et al.*, 1998; ARIDE, 1998), temperatura (MOURA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2001) metais pesados (MATSUO *et al.*, 2003; MENEZES, 2002; OLIVEIRA, 2003; MENEZES, 2005), petróleo e seus derivados (COSTA *et al.*, 1996; MACO GARCIA, 1997).

Vários estudos apontam a importância da realização de testes de toxicidade com organismos aquáticos, para tê-los como um instrumento de alerta para um possível problema ambiental, uma vez que os compostos xenobióticos podem ser transmitidos indiretamente a outros organismos (SCHVARTSMAN, 1991; ZAGATTO e GOLDSTEIN, 1991; ABEL, 1998; SALDIVA e BÖHM, 1998).

O objetivo do presente estudo foi de estabelecer os índices de alterações fisiológicas (estresse e perfil hematológico) para juvenis de tambaqui quando expostos ao chorume. Desta maneira, estabelecendo uma relação de causa e efeito na avaliação de risco à saúde, para fins de diagnóstico ambiental e clínico (W.H.O, 1993).

Material e Métodos

Foram utilizados cerca de 300 indivíduos juvenis de tambaqui ($15 \pm 4,6$ g) de uma fazenda de criação localizada no município de Rio Preto da Eva-AM. Os animais foram transportados para o laboratório de Toxicologia ambiental do Centro Universitário Nilton Lins (CUNL), e aclimatados por um período de 48 horas em tanques de 500 litros munidos de aeração constante (Blower 1/4 HP).

O chorume utilizado no experimento foi coletado no Aterro Controlado da cidade de Manaus-AM, localizado no km 19 da estrada Manaus-Itacoatiara. Este foi utilizado para a determinação da CL_{50} com o tambaqui, e posteriormente para o experimento de tolerância a CL_{50} predeterminada.

Para determinação da CL_{50} foram utilizados 70 animais em 7 tanques de 60 litros, contendo 10 peixes em cada tanque. Foram aclimatados por um período de 24 horas, com aeração contínua (Blower 1/4 HP). O chorume foi diluído em diferentes concentrações (35%, 25%, 15%, 5%, 3%, 1,5%, e 0,5%) em tanques de 60L. De acordo com as mortalidades obtidas em cada uma das concentrações descritas, o valor da CL_{50} para o tempo de 24 horas foi estimado em 2,06v/v, por meio do programa estatístico Trimed Spermán Karber (HAMILTON *et al.*, 1977). Posteriormente foram calculados para os tempos de 48, 72 e 96 horas (Sistema estático). Houve uma depuração por 24 horas, e neste período foi observada a sanidade dos animais (IBAMA, 1987). As medidas de oxigênio e temperatura foram registradas com auxílio de um oxígenômetro (YSI 550 AA), e o pH foi obtido por meio de um pHmetro digital (JENWAY, 350).

Foi analisado Hematócrito (Ht), por meio da técnica de microhematócrito usando tubos capilares em uma centrifuga (FANEM mod. 207N) durante 10 minutos. A leitura da taxa de sedimentação foi feita em cartão padronizado;

Hemoglobina (Hb), determinada pelo método descrito por KAMPER e ZIJLSTRA (1964) que consiste em diluir 10 μ l de sangue em 2 ml de reagente de Drabkin (KCN 0,5g; KH_2PO_4 1,4g e $K_3 [Fe(CN)_6]$ 2,0 g em 1000 ml de água destilada);

Com os dados obtidos para Ht, Hb e RBC, foram determinadas as constantes corpusculares: volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), segundo método descrito por BROW (1976).

O RBC foi determinado a partir da diluição do sangue em formol-citrato na proporção de 1:200. A contagem dos eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer por meio de microscopia óptica. O valor foi expresso em número de eritrócitos por mm^3 ;

Para o cortisol (Fig. 1) foi determinado os níveis plasmáticos utilizando o método de enzima-imuno ensaio, com equipamento ELISA e kit comercial Human 5550;

A glicose (Fig. 2), que foi analisada imediatamente após a coleta do sangue no laboratório CUNL, por meio do método eletroquímico com o uso do equipamento Advantage II (Roche). Foram realizadas análises de variância (ANOVA one-way) em relação ao controle. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (SEM).

Para o experimento de análises hematológicas com a CL₅₀ já determinada, foram utilizados 24 animais, distribuídos em 8 tanques de 60 litros contendo 6 animais em cada tanque com aeração constante (4x2). Foram tomadas medidas de pH, temperatura e oxigênio. Os animais não receberam alimentação durante o período experimental e foram aclimatados por 24 horas, os tempos utilizados foram de 0, 3, 6, e 9 (horas) na concentração de chorume de 2,06 v/v (CL₅₀).

As médias e os respectivos desvios foram calculados para cada grupo de dados e a significância ($P < 0,05$) das diferenças foram estabelecidas por meio de análise de variância (ANOVA ONE-WAY), com teste de Dunnett's ($P < 0,05$) (ZAR, 1996). No caso de violação das premissas para testes paramétricos, foi aplicada estatística não paramétrica, observando os cuidados para as análises de dados toxicológicos (ZAR, 1984; SPRAGUE, 1990). Para cada análise, os animais foram retirados de maneira randômica.

Resultados e discussão

Na determinação da CL₅₀, juvenis de tambaqui foram expostos as concentrações (3%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,0% e 0,5%) por 24 horas. De acordo com as mortalidades obtidas em cada uma das concentrações, o valor da CL₅₀ para o tempo de 24 horas foi estimado em 2,06v/v, por meio do programa estatístico Trimed Spermán Karber (HAMILTON *et al.*, 1977), que também calculou os valores para 48, 72 e 96 horas. Foi verificada uma redução do valor da CL₅₀ com o passar das horas. As medidas de parâmetros físico-químicos foram de 6,0 ($\pm 0,6$) para pH, 5,8 ($\pm 0,9$ mg/l) de oxigênio dissolvido (OD) e 27 ($\pm 1,4$ °C) de temperatura. Em sistemas de cultivo intensivo para peixes tropicais, estes índices estão dentro dos padrões normais (pH 6,5 a 9,0 / OD >4,0 mg/L / T 28 a 32°C) (BOYD, 1996).

Os índices de Ht, Hb e de RBC, além dos índices de cortisol (Fig. 1) e glicose (Fig. 2), não apresentaram diferença estatística significativa ($P > 0,05$) para a exposição ao chorume nos diferentes períodos. Assim como para o VCM,

HCM, CHCM (Tabela 1). Esta espécie é descrita como rústica e com alta capacidade para adaptação a condições de estresse no meio, como observado neste experimentos e já descrito por outros autores (COSTA, 1996; MARCON, 1996; ARIDE, 1998; PORTELA, 1998; PORTO, 2005; GOMES, 2003^a; CHAGAS, 2006). A tolerância a alterações no meio aquático não se restringem ao tambaqui. O estudo de BORGES *et al.* (2007) com jundiá demonstrou uma boa tolerância desta espécie. O estudo de FERREIRA (2006) obteve índices similares de tolerância do tambaqui quando exposto a hipóxia, e posteriormente submetido a exercício natatório. Porém o estudo de MENEZES (2005) submeteu o tambaqui a exposição de pH ácido, e observou várias alterações significativas nos índices hematológicos e de estresse. Isto sugere que alterações nos índices de estresse no tambaqui podem ser decorrentes de alterações na qualidade da água, como excesso de amônia, temperatura elevada, níveis baixos de oxigênio dissolvido e queda no pH (WAICHMAN *et al.*, 2001).

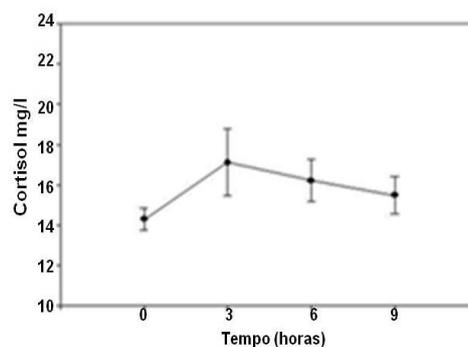


Figura 1. Cortisol no plasma sanguíneo do tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos ao chorume (concentração de 2,06 v/v) em diferentes tempos (0, 3, 6 e 9 horas)

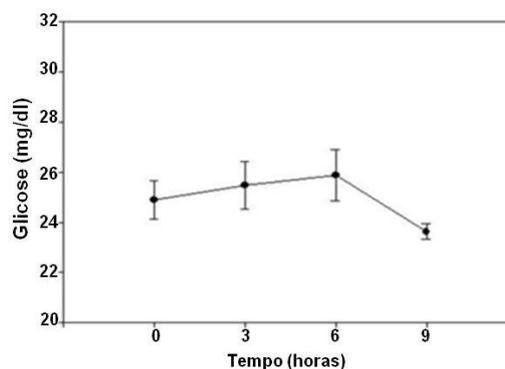


Figura 2. Glicose no plasma sanguíneo do tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos ao chorume (concentração de 2,06 v/v) em diferentes tempos (0, 3, 6 e 9 horas)

Várias são as respostas que as espécies desenvolvem em resposta a agentes estressores, sendo estas de procedência química ou física, proporcionando-lhes uma flexibilidade de resposta a cada estímulo recebido. Segundo VAL (1995) os peixes sofrem ajustes por meio de mecanismos homeostáticos quando expostos as condições estressantes. Os peixes quando entram em contato com qualquer agente estressor, ativa dois eixos neuro-endócrinos: o eixo hipotálamo - sistema nervoso simpático - células cromafins (HSC), que liberam catecolaminas: epinefrina e norepinefrina como produtos finais; e o eixo hipotálamo – hipófise – inter-renal (HHI) que libera o corticosteróide cortisol e a cortisona (PERRY e LAURENT, 1993; WENDELAAR BONGAR, 1997).

Tabela 1. Hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (RBC) e constantes corpusculares (VCM, HCM e CHCM) do sangue arterial de seis (06) exemplares de *Colossoma macropomum* exposto ao chorume. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média (sem)

Variáveis	Tempo (horas)			
	0	3	6	9
Ht %				
Média	23,6667	19,6667	24,6	23,7833
Sem	0,6667	2,3356	0,9688	0,8761
Hb (mg %)				
Média	0,2403	0,2322	0,2643	0,239
Sem	0,0201	0,0121	3,9384	5,698
Eritrócitos RBC (X10⁶mm³)				
Média	1,608	1,5125	1,5929	1,6097
Sem	0,0984	0,1212	0,1673	0,1129
VCM (µm³)				
Média	149,2005	129,1076	160,1977	149,726
Sem	7,1123	9,7583	12,475	6,3244
HCM (pg)				
Média	29,8253	31,1798	34,5048	30,259
Sem	1,4302	1,8632	2,5333	1,6597
CHCM (%)				
Média	20,2161	24,68	21,6184	20,1776
Sem	1,3649	2,004	0,6739	0,5625
Cortisol				
Média	1,608	1,512	1,592	1,609
Sem	0,241	0,297	0,401	0,276

(*) indica P<0,05 em relação ao controle

Neste estudo, o tambaqui não apresentou alterações estatísticas significativas nos níveis de cortisol e glicose. Apesar disto, o perfil encontrado demonstra a alteração deste índice entre 3 e 6 horas após a introdução do poluente (Chorume), com posterior recuperação a partir das 9 horas de exposição. O fato de não ocorrer liberação deste hormônio (cortisol) em peixes pode ser consequência do estresse crônico que pode ser ocasionado por alterações na qualidade da água (PICKERING e POTTINGER, 1987) ou a presença de poluentes ambientais (HONTELA *et al.* 1995). Alguns autores (BARTON e IWAMA, 1991; VIJAYAN *et al.*, 1994; ACERETE *et al.*, 2004, BARTON *et al.*, 2005) analisaram os índices de cortisol em resposta a estímulos físicos de curta duração, descrevendo um rápido aumento inicial e retornando a níveis basais em algumas horas ou até minutos, dependendo da espécie, da intensidade e da duração do agente estressor.

A glicose é um dos principais índices utilizados para alterações de níveis fisiológicos e bioquímicos, sendo um bom indicativo secundário (BARTON, 1997). Embora os resultados de cortisol e glicose neste estudo não tenham apresentado diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, a concentração destes parâmetros em peixes são bastante utilizados como indicativo de estresse. O estudo de BRANDÃO *et al.* (2006) descreve respostas significativas de cortisol, glicose e hematócrito, para pirarucus (*Arapaima gigas*) submetidos a transporte e adensamento, e durante práticas de rotinas em piscicultura. O estudo de PORTO (2005) expôs juvenis de tambaqui a estresse de manejo e ao herbicida Roundup®, obtendo alterações estatísticas significativas para a glicose, porém os índices de cortisol e hematócrito não apresentaram diferença significativa. O estudo de BARCELLOS *et al.* (2001) indicou alterações significativas dos níveis de cortisol e glicose após transporte de jundiá (*Rhandaia quelen*). A diversidade de respostas fisiológicas em diferentes espécies de peixes demonstra a gama de possibilidades que estas apresentam para tentar adaptar-se as adversidades causadas pelos agentes estressores, que variam de acordo com a dose e o tempo de exposição a estes agentes (MORGAN e IWAMA, 1997; URBINATI *et al.*, 2004).

Conclusões

A CL₅₀ para juvenis de tambaqui expostos ao chorume é de 2,06 v/v para um tempo de 24 hs; A espécie *Colossoma macropomum* não apresenta alterações estatísticas significativas nos índices hematológicos, de cortisol e de glicose quando expostos a concentração de 2,06 v/v de chorume por 3,6 e 9 horas; O tambaqui em contato com o chorume demonstrou uma rápida capacidade de adaptação mostrando a sua grande rusticidade a este agente estressor.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado de GA-Jr. (CT-AMAZONIA CNPq 553219/2005-7), ao Projeto ALTALI-PPG7 (CNPQ 557094/2005-4 e CNPQ 554009/2006-4) e ao Dr. Adalberto Luis Val (INPA/ Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular) pela ampla ajuda nas análises laboratoriais.

Referências

ABEL, P.D. 1998. *Water pollution biology*. 2.ed. London: Taylor & Francis. Gunpowder Square, London.

ACERETE, L.; BALASCHA, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* 1:167-178.

ARIDE, P.H.R. 1998. *Efeito do pH da água nos parâmetros hematológicos do Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação do mestrado. Instituto de Pesquisa do Amazonas/Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas.

ARIDE, P.H.R.; FERREIRA, M.S.; DUARTE, R.M.; OLIVEIRA A.M.; FREITAS, D.V.; SANTOS, A.L.W.; NOZAWA, S.R.; VAL, A.L. 2010. Ascorbic Acid (Vitamin C) and iron concentration in tambaqui, *Colossoma macropomum*, iron absorption. *Journal of The World Aquaculture Society* 41:291-297.

BARCELOS, L.J.G.; WOEHL, V.M; WASSERMANN, G.F.; QUEVEDO, R.M.; ITTZÉS, I.; KRIEGER, M.H. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (QUOY e GAIMARD), a South American catfish. *Aquaculture Research* 32:121-123.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *American Review of Fish Disease* 1:3-26.

BARTON, B.A.; RIBAS, L.; ACERETE, L.; TORT, L. 2005. Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research* 36:172-179.

BOYD, C.E. 1996. *Water quality in ponds for aquaculture*. Auburn University. Auburn, USA.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C.; ARAUJO, L.D. 2004. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(4):357-362.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica* 36(3):349 – 356.

BROWN, B.A. 1976 . *Hematology principles and procedures* 2 ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 1976. Cabrera, GL; Rodriguez, DMG. Genotoxicity of

leachates from a landfill using three bioassays. *Mutation Research* 426:207-210.

CHAGAS, E.C.; ARAUJO, L.D.; FERREIRA, A.L.S.; GOMES, L.C.; BRANDÃO, F.R. 2006. Respostas fisiológicas de tambaqui a banhos terapêuticos com mebendazol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41(4):713-716.

COSTA, O.T.F.; PEDRAÇA, E.B.; VAL, A.L. 1996. Efeito do petróleo sobre o consumo de oxigênio tissular e níveis de eletrólitos plasmáticos de *Colossoma macropomum* (Caraciformes, Serrassalmidae). *Revista da Universidade do Amazonas. Ciências Biológicas* 1(1):85-95.

FERREIRA, C.M. 2002. *Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802) como animais sentinelas*. São Paulo. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; Brasil.

FERREIRA, M.S. 2006. *Certificado de vigor físico para o tambaqui (Colossoma macropomum; Curvier, 1818)*. Dissertação de Mestrado. INPA-UFAM. Manaus, Amazonas, Brasil.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P. 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society* 34:76-84.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. 1977. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology* 7(11):714 -719.

HONTELA, A.; DUMONT, P.; DUCLOS, D.; FORTIN, R. 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Archival of Environmental Contamination Toxicology*. New York, USA. 14: 725-731.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. 1987. *Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos: Avaliação da toxicidade aguda para peixes*. Brasília; Brasil.

KAMPER, E.J.; ZIJLSTRA W.G. 1964. Standartization of haemoglobinometry. In: *Erythrocytometric methods and their standartization*. Bibliography of Haematology. Eds. G. Boroviczeny 18:68-72.

MACO GARCIA, J.T. 1997. *Influencia da água de formação da extração de petróleo do rio Urucu sobre aspectos hematológicos e conteúdo iônico de Colossoma macropomum e Glyptoperichthys joselimainanus*. Dissertação de Mestrado. INPA/UFAM. Manaus, Amazonas, Brasil.

MATSUO, A.Y.O.; VAL, A.L. 203. *Aluminum effects in Colossoma macropomum exposed to softwater, calcium, and humic substances at low pH*:

Implications for local aquaculture. Annual Meeting of the World Aquaculture Society, Salvador Bahia, Brasil.

MENEZES, A.C.L. 2002. *Avaliação de dois Metais pesados presentes na água de formação, derivada da extração de petróleo da província de Urucu, sobre o tambaqui (Colossoma macropomum).* Monografia. Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

MENEZES, A.C.L. 2005. *Toxicidade do cobre sobre o tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) em pH 4,0 e pH 8,0.* Dissertação de Mestrado INPA/UFAM. Manaus, Amazonas, Brasil.

METCALF, L.; EDDY, H.P. 2003. *Wastewater engineering treatment in reuse.* 4.ed. Mcgraw Hill. Boston, USA.

MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. 1997. Measurements of stressed states in the field. Págs: 247-270. Em: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Eds.). *Fish stress and health in aquaculture.* Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, USA.

MOURA, M.A.F.; FARIAS, I.P.; VAL, A.L. 1994. Effects of temperature on leukocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27:1589-1598.

MOURA, M.A.F.; OLIVEIRA, M.I.S.; VAL, A.L. 1997. Effects of hipoxia on leukocytes of two amazon fish *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale*. *Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas* 1(2):13-22.

OLIVEIRA, C.P.F.; CHAGAS, E.C.; VAL, A.L. 2001. Efeito do cobre sobre o tamoáta *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828): *Respostas enzimáticas e níveis de estresse durante a exposição à concentração subletal.* 7ª Reunião Especial da SBPC. Manaus, Amazonas, Brasil.

PERRY, S.F.; LAURENT, P. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. Págs: 231-264. Em: RANKIN, J.C.; JENSEN, F.B. (Eds.) *Fish Ecophysiology.* Chapman & Hall, London, England.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. 1987. Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. *Journal of Fish Biology* 30:363-374.

PORTO, M.S.A. 2005. *Indicadores de estresse em peixes da Amazônia: sensibilidade em face do tipo de estressor.* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Brasil.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications.* Hemisphere. Washington, D.C., USA

SALDIVA, P.H.N.; BÖHM, G.M. 1998. Animal indicators of adverse effects promoted by air pollution. *Ecosystem Health* 4(4):230-235.

SCHVARTSMAN, S. 1991. *Intoxicações agudas*. 4.ed. Sarvier. São Paulo, Brasil.

SELYE, H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal* 1:1383-1392.

SPRAGUE, J.B. 1990. Aquatic Toxicology. Págs: 491-528. Em: SCHERENCH, C.B.; MOYLE, PB (Eds.). *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA.

URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CARMARGO, A.C.S.; LANDINES, M.A. 2004. Loading and transport stress in juveniles matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture* 229:389-400.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 1995. Fishes of the Amazon and their environmental: physiological and biochemical aspects. *Zoophysiology* 32:1-10.

VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C.; MOON, T.W. 1994. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. *Comparative Biochemical Physiology*: 321-329.

WAICHMAN, A.V.; PINHEIRO, M.; MARCON, J.L. 2001. Water Quality Monitoring During the Transporte of Amazonian Ornamental Fish. *Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro basin, Amazonian, Brasil – Projeto Piaba*. Chao, N. L; Petry, P; Prang, G; Sonneschien, L; Tilusty, M. (Eds.). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

WENDELAAR BONGA, S.E. 1997. The Stress Response in Fish Physiology 77: 591-625.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.1993. *International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Geneva, Gland.

WOOD, C.M.; WILSON, R.W.; GONZALEZ, R.J.; PATRICK, M.L.; BERGMAN, H.L.; NARAHARA, A.; VAL, A.L. 1998. Responses of a Amazonian Teleost, the Tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in Extremely Soft Water. *Physiological Zoology* 6:658-670.

ZAGATTO, P.A.; GOLDSTEIN, E.G. 1991. Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. *Ambiente* 5(1):13-20.

ZAR, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, USA.