

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

Exposição do tabaqui ao petróleo: marcadores fisiológicos, bioquímicos e
comportamentais

DAIANI KOCHHANN

Manaus, Amazonas

2010

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

**Exposição do tabaqui ao petróleo: marcadores fisiológicos, bioquímicos e
comportamentais**

DAIANI KOCHHANN

ORIENTADOR: Adalberto Luis Val, Dr.

CO-ORIENTADORA: Fabíola Xochilt Valdez Domingos, Dra.

FONTE FINANCIADORA: CNPq

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

Manaus, Amazonas 2010

À melhor família do mundo:
Otávio, Eli, Fabiane, André e Ana Laura
que mesmo longe
sempre estiveram do meu lado.

K76

Kochhann, Daiani

Exposição do tambaqui ao petróleo: marcadores fisiológicos, bioquímicos e comportamentais /Daiani Kochhann.--- Manaus :

[s.n.], 2010

xii, 63 f. : il.

Dissertação (mestrado)-- INPA, Manaus, 2010

Orientador : Adalberto Luis Val

Co-orientador : Fabíola Xochilt Valdez Domingos

Área de concentração : Biologia de Água Doce e Pesca Interior

1. Tambaqui – Urucu, Rio (AM) – Biomarcador. 2. Colossoma

Macropomum. 3. Impacto ambiental – Petróleo – Amazônia. I. Título.

CDD 19. ed. 597.50415

Sinopse

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de concentrações subletais de petróleo, por diferentes períodos de tempo, em parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais relacionados à sobrevivência e ao crescimento de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Também foi verificada a toxicidade das diferentes frações do óleo (solúvel e insolúvel) e a existência de um efeito mecânico da camada de óleo na superfície da água.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Adalberto Luis Val, pela orientação, estímulo, ensinamentos na HPLC, críticas e desafios lançados que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente.

À minha co-orientadora, Fabíola Xochilt Valdez Domingos, pelos ensinamentos e pelo apoio quando da minha chegada à Manaus.

A Vera Maria Fonseca de Almeida e Val pelo apoio, amizade e pelas palavras certas nos momentos que eu precisava.

A Maria de Nazaré Paula da Silva por toda a ajuda logística prestada durante esses dois anos, por me ensinar muito do funcionamento do laboratório, e até por levar bronca junto comigo.

A Raquel, Sylvia e Luiza pela ajuda nas mais variadas frentes do laboratório.

A Maria Angélica Laredo por toda a ajuda logística no laboratório enquanto estive lá, mas acima de tudo e principalmente, por cuidar de mim, por ser “minha mãe preta” aqui em Manaus e por me permitir entrar na sua família e conhecer pessoas tão maravilhosas. À minha família manauara pelos deliciosos domingos em família.

A equipe do LEEM pela ajuda prestada e principalmente pelas conversas animadas e amizade. A Manoela e Sandra, meus braços direito e esquerdo durante a realização dos experimentos e análises comportamentais. A Viviane, Karen e Daniel pela ajuda nas análises comportamentais. A Vivian pela ajuda na leitura da acetilcolinesterase e ao Ronildo pela ajuda na leitura da fosfatase alcalina. A Christiane por tirar sangue dos meus “cardinais” e pelas deliciosas conversas. Aos ex-companheiros de sala,

Katherine e Marcos pelas conversas, amizade e apoio. A Zizi pela sempre animada companhia no ET bar. A todos do LEEM que de alguma forma me ajudaram, seja logisticamente ou me dando um “bom-dia” animado em algum dia que precisava.

A Ana Helena, companheira de LEEM, mas muito mais que isso, amiga, pela ajuda, amizade, baladas, apoio e incentivo quando eu achava que nada mais daria certo, sempre por perto e com paciência nas minhas crises de mau humor e desespero.

A turma de 2008 do mestrado do BADPI pelos agradáveis momentos passados juntos.

A Carminha por toda ajuda e apoio durante os dois anos de mestrado e por conduzir a secretaria do BADPI maravilhosamente.

A Dra Angela Varela por toda a ajuda logística e preocupação com o bom andamento dos alunos e a todos os professores do BADPI pelos ensinamentos e conversas.

Ao meu pai científico, Bernardo Baldisserotto, pelos ensinamentos que levarei por toda à vida, por me ensinar a fazer ciência e a gostar de fazer. Aos amigos do laboratório de Santa Maria presentes até hoje na minha vida, por tudo que me ensinaram e pela amizade.

Às meninas daqui de casa pela amizade conquistada, pelo convívio intenso, pela paciência com meu humor nem sempre agradável e pela companhia nas festas e faxinas. A Mimimi pela companhia e “conversas” durante o final de ano em Manaus, e pelas deliciosas lambidas matinais.

Aos velhos amigos, que estão longe mas sempre por perto, e aos novos amigos feitos aqui.

Ao Ígor por todo apoio, amizade, compreensão, paciência, companheirismo e por acreditar e fazer parte dos meus sonhos.

E, principalmente e acima de tudo, à minha família, mãe Eli, pai Otávio, irmã Fabiane, irmão André e minha sobrinha Ana Laura, por suportarem a ausência que já dura 6 anos, pelo amor, paciência e amizade eternos. Por sempre apoiar meus sonhos e me deixar segui-los. Por fazerem parte da minha vida e me fazerem ser a pessoa que sou hoje. Amo vocês, incondicionalmente.

Obrigada a todos!

Abstract

The largest Brazilian terrestrial province of petroleum mining is located at the margins of Urucu River, Amazonas state. All crude oil produced there is transported along 400 km across Solimões River to be refined in Manaus. The possibility of an oil spill in the aquatic environments of the Amazon requires a prompt analysis of the effect of petroleum on Amazon fishes. Thus, the main goal of this study was to evaluate the effects of crude oil exposure on biochemical, physiological and behavioral parameters related to survival and growth of juveniles of tambaqui (*Colossoma macropomum*). We also analyzed the toxicity of different oil fractions (soluble and insoluble) and the existence of a mechanical effect of crude oil on the water surface. The following parameters were evaluated: a) swimming activity, related to foraging, b) acetylcholinesterase activity, an enzyme that cleaves the transmitter acetylcholine in neuromuscular junctions, c) swimming capacity, considered an indicator of the functional integrity of an organism, d) response to alarm substance, an important pheromone that inform conspecific fishes on the presence of a predator and e) the alkaline phosphatase levels, an indicator of hepatic damage. The results showed a strong mechanical effect of oil at the water surface. Only the exposure to higher levels of the petroleum water soluble fraction induced alterations in the studied parameters, contrasting with the exposure to water insoluble fraction of petroleum that induced alterations of all the analyzed parameters, both at high and sublethal conditions.

Resumo

A maior província terrestre de mineração de petróleo está localizada as margens do rio Urucu, no estado do Amazonas. Todo o petróleo lá produzido é transportado ao longo de 400 km através do rio Solimões para ser refinado em Manaus. A possibilidade de um derramamento de petróleo nos ecossistemas aquáticos da Amazônia requer uma pronta análise dos efeitos do petróleo em peixes amazônicos. Assim, o objetivo principal desse estudo foi avaliar o efeito da exposição ao óleo cru em parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais relacionados à sobrevivência e ao crescimento de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Nós também analisamos a toxicidade das diferentes frações do óleo (solúvel e insolúvel) e a existência de um possível efeito mecânico da camada de óleo cru na superfície da água. Os parâmetros escolhidos para o estudo foram: a) atividade natatória espontânea, relacionada à procura por alimento, b) atividade da enzima Ache responsável pela clivagem do neurotransmissor acetilcolina na placa motora, c) capacidade natatória, considerada um indicador da integridade funcional do organismo, d) resposta à substância de alarme, um importante feromônio que informa peixes conspecíficos sobre a presença de um predador e e) os níveis de fosfatase alcalina, um indicador de dano hepático. Os resultados mostraram um forte efeito mecânico da camada de óleo na superfície da água. Apenas a exposição a altas concentrações de fração solúvel do petróleo causou alterações nos parâmetros estudados, contrastando com a exposição a fração insolúvel do petróleo que causou alterações todos os parâmetros analisados, tanto na exposição a concentração letal e subletal.

Sumário

<i>Introdução</i>	1
Petróleo na Amazônia	1
Efeitos do petróleo em organismos aquáticos	2
Comportamento como biomarcador	6
Desempenho e atividade natatória de peixes e o efeito de poluentes	8
Olfacção, substância de alarme e o efeito de poluentes	9
O tabaqui.....	10
<i>Justificativa</i>	12
<i>Objetivo geral</i>	13
<i>Objetivos específicos</i>	13
<i>Materiais e métodos</i>	13
Aquisição e aclimatação dos animais.....	13
Exposição dos peixes ao petróleo	14
<i>Exposição à concentração subletal</i>	14
<i>Exposição à alta concentração</i>	16
Análise da atividade de rotina	17
Preparação dos estímulos.....	17
Análise da velocidade crítica de natação (U_{crit})	18
Análise da atividade das enzimas acetilcolinesterase e fosfatase alcalina	19
<i>Análise estatística</i>	20
<i>Resultados</i>	21
<i>Exposição à concentração subletal</i>	21
<i>Atividade natatória</i>	22
<i>Resposta à substância alarme</i>	23
<i>Velocidade crítica de natação U_{crit}</i>	28
<i>Atividade enzimática</i>	29

<i>Exposição a alta concentração</i>	30
<i>Atividade natatória</i>	32
<i>Resposta à substância de alarme</i>	33
<i>Atividade enzimática</i>	37
<i>Discussão</i>	39
<i>Exposição à concentração subletal</i>	39
<i>Exposição a altas concentrações</i>	44
<i>Conclusões</i>	48
<i>Referências</i>	50

Introdução

A Amazônia é um ecossistema gigante, de natureza essencialmente anfíbia, resultado de complexos processos geológicos e evolutivos (Val e Almeida-Val, 1995). A variedade de habitats e sua constante mudança favoreceram o surgimento da fauna aquática mais diversa do mundo (Val e Almeida-Val, 1999). Essa diversidade biológica torna os ecossistemas amazônicos bastante vulneráveis à interferência antrópica.

Apesar do advento das novas formas de energia, o petróleo ainda é a principal matéria-prima envolvida em inúmeros processos essenciais ao homem, especialmente para o transporte, produção de energia elétrica, entre outros (CETESB, 2008). As taxas de crescimento populacional, industrialização e consumo de energia sempre positivas contribuem para a crescente demanda por esse produto (Petrobras, 2007).

Petróleo na Amazônia

Em 1948, foram iniciados os estudos de prospecção dos solos amazônicos pela Petrobras, objetivando encontrar petróleo e gás natural na região. Em 1986, ocorreu a primeira descoberta de uma jazida com óleo e gás natural economicamente explorável na região. Após essa descoberta, sucederam-se outras nas proximidades, sendo esse local denominado, então, Província Petrolífera do Urucu (Petrobras, 2008).

Segundo dados da Petrobras a produção média de petróleo na região de Urucu é de cerca de 50 mil barris por dia, sendo esse petróleo utilizado na fabricação de derivados nobres, como querosene de aviação, gasolina e óleo diesel (Castelões, 2003; Cardoso, 2006; Petrobras, 2008). Já em 2006, a Petrobras iniciou novas atividades exploratórias nas proximidades da Província do Urucu na tentativa de encontrar novas jazidas de petróleo, motivada especialmente pela ótima qualidade do

óleo amazônico e pelo baixo custo de produção em relação a outras áreas petrolíferas (Cardoso, 2006).

Todo o óleo extraído de Urucu é transportado por dutos até o Terminal Solimões em Coari. A partir daí segue pelo Rio Solimões em navios petroleiros para a Refinaria Isaac Sabbá, em Manaus (Petrobras, 2008), localizada a aproximadamente 400 km de Coari. Não obstante os rígidos protocolos de segurança seguidos pela Petrobrás (Petrobras, 2006) e de nenhum grande vazamento de óleo ter ocorrido até então na região, alguns pequenos derramamentos já ocorreram (Couceiro *et al.*, 2006) fazendo necessário o estudo e a avaliação dos efeitos do petróleo sobre a biota aquática da região.

Efeitos do petróleo em peixes

O petróleo é uma mistura de compostos orgânicos, principalmente hidrocarbonetos, sendo produzido pela decomposição incompleta da matéria-orgânica (Val e Almeida-Val, 1999; CETESB, 2008). Os hidrocarbonetos de cadeia curta, que incluem os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), são na sua maioria solúveis e voláteis possuindo um baixo tempo de permanência no ambiente aquático, sendo, entretanto, os de maior toxicidade aguda (Heath, 1995). Já os hidrocarbonetos de cadeia longa são menos solúveis e persistentes no ambiente aquático sendo considerados menos tóxicos aos peixes (Neff, 1979; Freedman, 1989).

Organismos aquáticos expostos ao petróleo podem exibir mudanças bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (Cohen *et al.*, 2001). Essas mudanças em parâmetros biológicos que são relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de um poluente são chamadas de biomarcadores (Peakall, 1994). Os efeitos da fração

solúvel do petróleo (FSP) e dos PAHs em peixes são bem documentados. Exposição a FSP causa distúrbios endócrinos em peixes. Exemplares de linguado (*Pleuronectes flesus*) expostos por 48h a altas concentrações de PAHs presentes na FSP apresentaram desordens fisiológicas e endócrinas, como aumento nos níveis de cortisol e diminuição no hematócrito, concentração de hemoglobina e oxigenação do sangue (Alkindi *et al.*, 1996). Também foram documentados distúrbios nos hormônios esteróides, com uma diminuição nos níveis de testosterona e um aumento nos níveis de 17beta-estradiol em *Danio rerio* expostos a WSF (Arukwe *et al.*, 2008). Aumento nos níveis de cortisol, tiroxina e diminuição da atividade natatória também foram observados em larvas de *Scophthalmus maximus* expostas a altas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos (Stephens *et al.*, 1999). A exposição de *Oncorhynchus mykiss* aos hidrocarbonetos fenantreno e benzo(a)pireno altera os níveis de melatonina, podendo alterar o ritmo biológico normal dessa espécie (Gesto *et al.*, 2009) . Esses autores também encontraram uma aparente diminuição na frequência de ventilação branquial. Já na espécie amazônica *Hoplosternum littorale* exposta a até 37,5% da WSF do petróleo do Urucu observou-se um aumento na frequência da respiração, sendo esse aumento provavelmente relacionado a uma resposta geral ao estresse (Brauner *et al.*, 1999). *Clupea pallasii* expostas à fração solúvel de petróleo, apresentaram elevados níveis de cortisol e indução de enzimas de biotransformação (CYP4501A e EROD), enquanto animais expostos de forma crônica sofreram distúrbios osmorregulatórios (Kennedy e Farrell, 2005). Trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas cronicamente a WSF apresentaram erosão das nadadeiras, crescimento reduzido e aumento do conteúdo de água no corpo (Lockhart *et al.*, 1996). Esse aumento do conteúdo de água no corpo pode estar relacionado a distúrbios

osmorregulatórios. Aumento da atividade de enzimas ligadas a detoxificação, como a enzima glutathione S-transferase, e de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, também pode ser observado durante a exposição a hidrocarbonetos do petróleo (Kopecka-Pilarczyk e Correia, 2009).

Fatores ambientais, como a salinidade, podem afetar a solubilidade dos PAHs na água, causando uma diminuição na concentração de hidrocarbonetos em água salgada e fazendo com que testes feitos com organismos marinhos sejam inadequados para estimar os efeitos de um derramamento de petróleo em ambientes de água doce (Shukla *et al.*, 2007).

Embora os PAHs hidrossolúveis sejam considerados os compostos mais tóxicos presentes no petróleo (Heath, 1995), a exposição ao óleo é ambientalmente mais realista, simulando o que acontece no caso de um derramamento de petróleo na natureza. Além disso, há um aumento da toxicidade do petróleo devido ao contato dos animais com a camada de óleo da superfície ou com as gotículas que acabam passando para a coluna de água (González-Doncel *et al.*, 2008). Animais expostos cronicamente ao óleo cru apresentaram uma piora na conversão alimentar e, portanto, redução do crescimento, apesar do aumento no consumo de alimento (Vignier *et al.*, 1992). Essa redução no crescimento pode ser consequência de alterações no gasto energético causada pela exposição ao petróleo (Olsen *et al.*, 2007). Exposição ao petróleo causa distúrbios na habilidade respiratória, na capacidade aeróbica e anaeróbica e em parâmetros hematológicos, além de prejudicar o sistema imunológico, como evidenciado em trutas arco-íris (Gagnon e Holdway, 1999; Cohen *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2005). Distúrbios morfológicos, fisiológicos e genéticos

também foram encontrados em animais coletados após a ocorrência de derramamento de petróleo na baía de Paranaguá no estado do Paraná (Katsumiti *et al.*, 2009).

Na região amazônica, muitas espécies de peixes, incluindo o tambaqui (*Colossoma macropomum*), usam a interface água-ar ou utilizam o oxigênio do ar para respirar (Val e Almeida-Val, 1995), podendo entrar em contato e até mesmo ingerir a camada de óleo superficial no caso de um derramamento de petróleo. Em *Hoplosternum littorale*, por exemplo, a ingestão de óleo cru causa distúrbios osmorregulatórios e sinais de hipoxemia (Brauner *et al.*, 1999). Em juvenis de *Scophthalmus maximus* expostos ao óleo cru através da dieta foram observados aumento na atividade da EROD e nos níveis de metabólitos fluorescentes da bile (FACs), além de uma redução nos níveis de testosterona circulante (Martin-Skilton *et al.*, 2008). A ingestão de óleo em *Boreogadus saida* causou um aumento da expressão de CYP4501A1 e glutathione S-transferase, além de um aumento na atividade da EROD e nos níveis de FACs (Nahrgang *et al.*, 2010).

Peixes expostos ao petróleo em testes laboratoriais bem como coletados de ambientes naturais contaminados com petróleo apresentaram elevada atividade de CYP1A e EROD e aumentos nos níveis de metabólitos biliares relacionados à detoxificação de compostos petrogênicos sendo essas alterações consideradas boas biomarcadoras de exposição à contaminação por hidrocarbonetos (Aas *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2006; Correia *et al.*, 2007; Damásio *et al.*, 2007; Martinez-Gomez *et al.*, 2009). Embora a inibição da enzima acetilcolinesterase, responsável pela clivagem do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas e nas junções musculares, tenha sido sugerido por alguns autores como um bom biomarcador de exposição a

hidrocarbonetos (Buet *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2008) os resultados obtidos por alguns estudos são contraditórios. Enquanto alguns autores mostram uma inibição dessa enzima em organismos expostos ao óleo e seus compostos (Rodríguez-Fuentes e Gold-Bouchot, 2000; Hansson *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2008) outros mostram que a exposição a esses poluentes não altera a atividade dessa enzima (Silva *et al.*, 2009).

Respostas comportamentais de peixes como biomarcadoras de exposição a poluentes

Um biomarcador é definido como a mudança em uma resposta biológica relacionada à exposição ou aos efeitos tóxicos de um agente químico (Peakall, 1994). Esses efeitos de contaminantes podem ser estudados em vários níveis da organização biológica, incluindo desde os níveis moleculares, bioquímicos e celulares até o nível de estrutura de comunidade, sendo assumido que efeitos em níveis iniciais de organização precedem efeitos nos níveis finais (Weis *et al.*, 2001). Biomarcadores em nível molecular e celular são importantes porque são capazes de responder rapidamente e, frequentemente, de forma específica aos poluentes (van der Oost *et al.*, 2003). A frequente indução de CYP1A, EROD e aumento de metabólitos biliares fluorescentes tem feito desses parâmetros bons indicadores de exposição a hidrocarbonetos aromáticos, porém não se sabe o que o aumento nesses parâmetros causa em níveis mais altos da organização biológica (Lee e Anderson, 2005).

O comportamento é uma resposta em nível de organismo que possui claras ligações com níveis bioquímicos, além de conexões com efeitos nos níveis de populações e comunidades (Weis *et al.*, 2001), sendo sensível a uma variedade de contaminantes em concentrações subletais (Little *et al.*, 1990). Análises de respostas

comportamentais fornecem medidas quantitativas de alteração neural e mecânica, refletindo alterações bioquímicas e fisiológicas (Brewer *et al.*, 2001), sendo medidas sensíveis e não invasivas. Os efeitos de contaminantes no comportamento podem causar profundas mudanças na habilidade do organismo em obter alimento, evitar predação e se reproduzir com sucesso (Smith, 1997).

Essas alterações comportamentais são bons indicadores de mudanças em níveis mais altos da organização biológica. Por exemplo, a capacidade de evitar a predação é essencial para o crescimento e a sobrevivência do indivíduo, sendo importante para manter o tamanho da população e sua estrutura de idade e tamanho (Maltby, 1999a; Weis *et al.*, 2001). Presas podem ser mais vulneráveis à predação devido à incapacidade em detectar predadores, o que tem implicações na transferência de contaminantes através da cadeia alimentar (Weis *et al.*, 2001). Um dos mecanismos por trás dessas mudanças comportamentais que ocorrem como consequência da exposição a contaminantes envolve danos na estrutura (morte celular de neurônios, por exemplo) e/ou na função (alteração de síntese de neurotransmissores, por exemplo) do sistema nervoso (Weis *et al.*, 2000).

Estudos avaliando o efeito do petróleo em aspectos comportamentais de peixes são raros. Animais expostos ao petróleo apresentam diminuição na atividade natatória, letargia e desorientação (Anderson, 1975; Ellgaard *et al.*, 1979; Engelhardt *et al.*, 1981). Exposição isolada ao fenantreno também causa diminuição da atividade natatória, provavelmente para compensar os altos custos dos processos de detoxificação do fenantreno (Correia *et al.*, 2007). Juvenis de tambaqui expostos agudamente a altas concentrações desse mesmo hidrocarboneto apresentaram

elevada produção de muco, perda de equilíbrio e nado desorientado (Chavez-Veintemilla, 2005). Estudos de evasão mostraram que tanto animais previamente expostos como não expostos ao fluoranteno evitam locais onde este ocorre em concentrações superiores a 14,7 µg/L (Farr *et al.*, 1995).

Desempenho e atividade natatória de peixes e o efeito de poluentes

O desempenho natatório é considerado um importante fator na sobrevivência de peixes, já que influencia fortemente a habilidade do animal em obter alimento, reproduzir-se e evitar condições desfavoráveis (Drucker, 1996), sendo a principal característica afetando a capacidade de sobrevivência e reprodução (Reidy *et al.*, 1999). Assim, a capacidade natatória é um indicador da integridade funcional do animal, podendo ser utilizado como um biomarcador fisiológico de exposição a poluentes (McKenzie *et al.*, 2007).

A velocidade crítica de natação (U_{crit}) é uma medida padrão para avaliar a capacidade natatória de peixes, sendo largamente usada para investigar os efeitos de condições ambientais e poluentes (Plaut, 2001; Waser *et al.*, 2009). A velocidade crítica de natação também estima a máxima velocidade de natação aeróbica, refletindo, além disso, a máxima capacidade de consumo de oxigênio (Hammer, 1995). A atividade natatória de rotina é uma resposta comportamental fácil de medir durante estudos de toxicidade, sendo considerada de alta relevância e apropriada para uso como biomarcador em níveis mais altos da organização biológica (Little *et al.*, 1990; Grillitsch *et al.*, 1999).

Alterações na atividade natatória também podem afetar os padrões alimentares, já que a atividade natatória tem uma influência direta na taxa de encontro de alimento (Laurence, 1972; Zhou *et al.*, 2001). Assim, a diminuição na atividade natatória leva a uma diminuição na taxa de encontro de alimento. Essa redução na alimentação leva a uma redução no aporte de energia, podendo afetar a estrutura populacional (Maltby, 1999b).

A atividade natatória tem papel fundamental na sobrevivência dos organismos já que ela também influencia as relações predador-presa (Domenici *et al.*, 2007). Esta ligação entre locomoção e interações predador-presa se dá uma vez que padrões de atividade natatória de um peixe presa influenciam sua susceptibilidade à predação já que presas hiperativas são mais visíveis e, portanto, mais vulneráveis à predação (Werner e Anholt, 1993; Weis *et al.*, 2000).

Olfacção, substância de alarme e o efeito de poluentes

Sinais químicos constituem importantes formas de comunicação em ambientes aquáticos, onde visão e audição são menos precisas. Organismos aquáticos utilizam sinais químicos para alimentação, orientação, estruturação social e reprodução (Zielinski *et al.*, 2005; Tierney *et al.*, 2009). Esses compostos químicos são também responsáveis pela mediação das interações predador-presa e competição interespecífica, fatores que desempenham papéis fundamentais na determinação da estrutura da comunidade e função do ecossistema (Burks e Lodge, 2002). O sistema olfatório de peixes é particularmente vulnerável a poluentes, já que os neurônios receptores localizados na roseta olfatória estão direta e continuamente em contato com o ambiente aquático (Julliard *et al.*, 1995; Bettini *et al.*, 2006; Hamdami e Doving,

2007; Matz e Patrick, 2007), possuindo grande significado biológico e um importante papel na detecção das condições do ambiente e no comportamento de peixes (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 1999).

Os peixes do grupo dos ostariofíseos, que inclui cerca de 80% das espécies de peixes de água doce da região Neotropical, incluindo o tambaqui, possuem células epiteliais especializadas que produzem um sinal químico, chamado substância de alarme. Essa substância é liberada quando o peixe sofre algum dano na pele como, por exemplo, ao ser atacado por um predador (Mathis e Smith, 1993). Outros peixes-presa detectam essa substância pelo olfato (Chivers e Smith, 1993) e exibem comportamentos de evasão ao predador (diminuição de natação, aumento do uso de abrigo) que diminuem seu risco de predação (Smith, 1992; Chivers e Smith, 1993). A presença de substância de alarme, entre outras características, tem sido apontada como um dos fatores do grande sucesso evolutivo do grupo dos ostariofíseos e a falha nesse sistema de comunicação pode trazer sérias consequências no equilíbrio da relação predador-presa (Lürling e Scheffer, 2007). Animais expostos a metais tendem a perder a resposta à substância de alarme (Scott *et al.*, 2003; Honda *et al.*, 2008; Kochhann *et al.*, 2009).

O tambaqui

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie de peixe típica da Amazônia que apresenta sua biologia especialmente adaptada às condições especiais encontradas nesse ecossistema. Quando adulto, é um peixe essencialmente frugívoro, alimentando-se de frutos e sementes que caem na água na floresta inundada na cheia (Ferreira *et al.*, 1998). Os jovens de tambaqui são encontrados principalmente em bancos de macrófitas flutuantes. As águas barrentas da maioria dos habitats de

criação de jovens de tambaqui na várzea do rio Solimões/Amazonas, e o ambiente escuro embaixo da vegetação flutuante, sugerem que o uso da visão é muito limitado (Araujo-Lima e Goulding, 1998) sendo a olfação, portanto, determinante na aquisição de informações acerca do ambiente. Acredita-se também que o tambaqui adulto localize as espécies de árvores das quais se alimenta dos frutos e sementes pelo olfato, por meio dos compostos químicos liberados pela planta na época da maturação (Goulding, 1997).

O tambaqui possui comportamento migratório movendo-se sazonalmente entre os rios de água preta e branca (Aride *et al.*, 2007). Durante a enchente/cheia move-se para a floresta inundada, normalmente de rios de águas pretas ou claras, para se alimentar dos frutos e sementes. Após a enchente, migra rio acima para o canal principal de rios de água branca, desovando nas margens desses rios (Araujo-Lima e Goulding, 1998). Durante o período de migração no leito do rio passa por longos períodos de privação alimentar, momento em que se utiliza das reservas de gordura acumuladas durante o período de cheia (Santos *et al.*, 2006).

Quando em ambientes de baixas concentrações de oxigênio o tambaqui respira na interface ar-água, local normalmente mais oxigenado. Para tanto, desenvolveu uma adaptação popularmente conhecida como aiú, que consiste na expansão do lábio inferior que então auxilia na captação dessa água de interface (revisado por Val e Almeida-Val, 1995).

Essa adaptação para tolerar as baixas quantidades de oxigênio que normalmente ocorrem nos ambientes amazônicos, juntamente com sua biologia alimentar que faz com que ele busque os frutos e sementes que boiam na superfície

tornam o tabaqui uma espécie bastante vulnerável no caso de um derramamento de petróleo na várzea amazônica, já que ele entrará mais facilmente em contato com a camada de óleo na superfície (Val e Almeida-Val, 1999).

Justificativa

Estudos sobre os efeitos do petróleo em peixes amazônicos são importantes já que o petróleo é intensamente explorado na região próxima a Manaus e a procura por mais reservas está em curso na região. A imensa diversidade ambiental e biológica encontrada na Amazônia torna essa região especialmente vulnerável a interferências humanas. Além disso, estudos com espécies de água doce são escassos, já que a exploração de petróleo é associada mais fortemente a ambientes costeiros. A avaliação dos efeitos da exposição ao óleo cru é importante em peixes amazônicos já que esses possuem adaptações que podem deixá-los mais vulneráveis a esse tipo de contaminação. Estudos com marcadores comportamentais são válidos, uma vez que estes efeitos, em geral, precedem efeitos fisiológicos. Além disso, parâmetros comportamentais como padrões de locomoção e interações predador-presa são componentes fundamentais para o sucesso reprodutivo e para o crescimento populacional (Domenici *et al.*, 2007). Também é de extrema importância que estudos que visam avaliar o efeito de poluentes verifiquem mudanças que possam estar ocorrendo nos diferentes níveis da organização biológica, incluindo níveis bioquímicos, fisiológicos e em nível de indivíduo, para facilitar a predição do que acontecerá em níveis populacionais e de comunidade.

Objetivo geral

Avaliar os efeitos do petróleo em parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais de juvenis de tambaqui, procurando evidenciar a relação entre os diferentes níveis de biomarcadores.

Objetivos específicos

Analisar o efeito da exposição ao petróleo sobre a atividade natatória espontânea do tambaqui e sobre a capacidade dos animais em responder a presença de substância de alarme.

Determinar o efeito da exposição ao petróleo na capacidade natatória do tambaqui, por meio da análise da velocidade crítica de natação.

Verificar a alteração de parâmetros bioquímicos relacionados à atividade e à capacidade natatórias, relacionando-os com esses parâmetros.

Avaliar a toxicidade das frações solúvel e insolúvel do petróleo em juvenis de tambaqui, bem como a existência de um efeito mecânico da camada de óleo na superfície da água sobre o tambaqui.

Materiais e métodos

Aquisição e aclimação dos animais

Juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) ($6,2 \pm 0,4$ g; $5,1 \pm 0,3$ cm) foram adquiridos em pisciculturas da região e transportados até o Laboratório de

Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), localizado nas dependências do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) na cidade de Manaus. Os peixes foram mantidos em tanques de 2000L com aeração constante e alimentados até a saciedade duas vezes por dia com ração comercial contendo 35% de proteína bruta. O período de aclimação foi de pelo menos duas semanas com foto-período de 12h a 25°C.

Exposição dos peixes ao petróleo

Exposição à concentração subletal

Após o período de aclimação os animais foram transferidos para aquários de vidro com um volume de 3L (12 aquários por tratamento, 1 peixe por aquário e no caso do controle 18 peixes) onde foram expostos por 1 (exposição aguda), 15 (exposição subcrônica) ou 30 dias (exposição crônica) a cinco diferentes tratamentos: água do poço (controle), fração insolúvel do óleo cru, fração solúvel do óleo cru, fração insolúvel do óleo mineral inerte e fração solúvel do óleo mineral inerte. A exposição ao óleo mineral inerte foi utilizada para testar somente o efeito mecânico da camada de óleo na superfície da água sobre os peixes, sem os efeitos dos componentes tóxicos do petróleo. Seis peixes de cada tratamento foram utilizados para os testes de atividade natatória, resposta à substância de alarme e atividade enzimática (n=6). Outros seis foram utilizados para o teste de capacidade natatória (Ucrit) (n=6). No caso do teste de resposta à substância de alarme, 12 peixes foram observados em dois diferentes estímulos, sendo portanto, 6 peixes para cada estímulo (n=6). A concentração utilizada nos diferentes tratamentos foi de 3,96 mL/L, correspondente a 35% da CL_{50-96h} de petróleo para juvenis de tambaqui, determinada previamente por Brust (2006). O sistema de exposição foi semi-estático, com renovação de 20% de

água (com as mesmas condições e concentração de hidrocarbonetos do início dos experimentos) a cada 3 dias, sendo os animais alimentados com ração comercial no dia anterior à troca de água. Cada aquário possuía um cano onde estava inserida a mangueira de aeração e através do qual os peixes eram alimentados, a troca de água era realizada e a água para as análises de qualidade de água e quantificação de hidrocarbonetos era coletada. A aeração estava protegida nesse cano para evitar que ela afastasse o óleo para uma das extremidades do aquário, mantendo assim uma fina camada de óleo em toda a superfície do aquário. Para a preparação das frações solúvel e insolúvel, 11,94 mL de petróleo ou óleo mineral foram adicionados em um béquer de vidro juntamente com 3 L de água. Essa solução foi mantida sob agitação através de um agitador magnético por 24h sendo então a fração oleosa retirada e utilizada como fração insolúvel e o restante utilizado como fração solúvel. Durante o período experimental a qualidade da água foi analisada a cada 3 dias para oxigênio ($6,2 \pm 0,4$ mg/L), pH ($6,4 \pm 0,2$), temperatura ($27,7 \pm 0,3^\circ\text{C}$), amônia ($1,0 \pm 0,07$ mg/L) e nitrito ($0,3 \pm 0,06$ mg/L) e semanalmente para alcalinidade ($12,4 \pm 0,8$ mg CaCO_3/L) e dureza ($16 \pm 0,8$ mg CaCO_3/L). Duas e 24 horas após o início do período experimental e após cada troca de água foi realizada a coleta de água para quantificação e qualificação dos 16 PAHs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) sugeridos pela Agência de proteção Ambiental Americana-EPA (Hodgeson *et al.*, 1990) para acompanhamento: naftaleno, acenaftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno. Primeiramente, foi realizada a extração e preconcentração dos hidrocarbonetos segundo o método descrito por Tavakoli *et al.* (2008). Foram

coletados 5 mL de água, sendo adicionados 1 mL de acetona contendo 8 µL de tetracloroetileno. Essa mistura foi então centrifugada a 6000 rpm por 1,5 min sendo o sedimentado utilizado para a dosagem dos PAHs. Os PAHs foram medidos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando um LKB Bromma 2152 HPLC acoplado com detector de UV 2220 LKB. As análises foram realizadas com uma coluna Supelcosil LC-PAH (Supelco) (15 cm X 4.6 mm I.D., partículas de 5 µm). A fase móvel foi composta de dois solventes: acetonitrila e água. O gradiente linear inicia-se com 50% de água e acetonitrila (0-5 min) e então é aumentado para 100% de acetonitrila, sendo mantido por 16 minutos. A detecção dos compostos foi realizada por meio de sua absorbância em 254 nm.

Exposição à alta concentração

Após o período de aclimatação os animais foram transferidos para aquários de vidro com capacidade para 3L onde foram expostos por 1, 3 ou 6 dias a três diferentes tratamentos: água do poço (controle), fração insolúvel do óleo cru e fração solúvel do óleo cru. Foram expostos 18 peixes em cada tratamento, sendo um peixe por aquário, para avaliação de mortalidade (n=18). Para a avaliação dos efeitos subletais foram utilizados 6 peixes por tratamento (n=6). A concentração utilizada nos diferentes tratamentos foi de 100 mL/L, concentração esta utilizada por outros autores para verificar os efeitos da exposição aguda à fração solúvel do petróleo e seus componentes (Alkindi *et al.*, 1996; Brauner *et al.*, 1999). O sistema de exposição foi estático e os animais foram mantidos sem alimentação durante o período experimental. A preparação das frações solúvel e insolúvel foi realizada como descrito anteriormente, exceto que 300 mL de petróleo foram adicionados em 3 L de água.

Essa solução foi mantida sob agitação por meio de um agitador magnético por 24h sendo então a fração oleosa retirada e utilizada como fração insolúvel e o restante utilizado como fração solúvel. Durante o período experimental a qualidade da água foi analisada a cada 2 dias para oxigênio ($5,6\pm 0,5$ mg/L), pH ($6,0\pm 0,4$), temperatura ($28,1\pm 0,3^{\circ}\text{C}$), amônia ($1,2\pm 0,07$ mg/L) e nitrito ($0,2\pm 0,07$ mg/L) e ao final do experimento para alcalinidade ($9\pm 0,8$ mg CaCO_3 /L) e dureza ($12\pm 0,3$ mg CaCO_3 /L). Duas, 24, 72 e 144 horas após o início do período experimental foi realizada a coleta de água para quantificação e qualificação dos PAHs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos), sendo esta feita da mesma maneira que no experimento anterior.

Análise da atividade de rotina

Após o período de exposição ao petróleo os peixes foram observados na própria unidade amostral ($n=6$). A atividade natatória de cada animal foi observada durante 10 min, sendo cronometrado o tempo em que o animal se manteve em movimento.

Preparação dos estímulos

Para a análise da resposta à substância de alarme intraespecífica, o extrato de pele foi preparado de acordo com Brown & Smith (1998). Juvenis de tambaqui foram decapitados e sua pele removida a fim de que a quantidade de pele fosse igual ou superior a duas gramas. A pele foi então triturada em água destilada (50 mL) com o auxílio de um homogeneizador. Posteriormente, o extrato foi filtrado e o volume final completado para 180 mL. O extrato foi dividido em alíquotas de 5 mL e mantido a -20°C até o momento do uso. Amostras de 5 mL de água destilada foram também

refrigeradas a -20°C para serem usadas como controle apenas nos peixes expostos à água do poço.

Análise da resposta à substância de alarme

As observações foram conduzidas de forma similar às aquelas realizadas por Scott *et al.* (2003) e Kochhann *et al.* (2009). O período de observação consistiu de 20 min, 10 min de pré-estímulo e 10 de pós-estímulo. Um pellet de ração foi oferecido ao peixe a cada minuto do período de observação. Uma amostra de estímulo (água destilada ou extrato de pele no caso dos animais do tratamento controle e extrato de pele no caso dos outros tratamentos, $n=6$) foi adicionada em uma das extremidades do aquário após os 10 minutos de pré-estímulo. Durante os períodos de observação (pré e pós-estímulo) foram cronometrados o tempo que o animal está nadando e o tempo que ele leva pra comer o primeiro pellet. Também foi quantificado o número de pellets consumidos. A partir das observações, analisou-se, para cada peixe, a diferença entre o tempo nadando, o tempo para comer o primeiro pellet e o número de pellets consumidos (variável no pós-estímulo – variável no pré-estímulo) entre os dois períodos de observação.

Análise da velocidade crítica de natação (U_{crit})

A velocidade crítica de natação (U_{crit}) foi definida por Brett (1964) como a velocidade máxima que o peixe pode manter por um determinado período de tempo. Ao final dos testes de respostas à substância de alarme, todos os animais de cada tratamento de petróleo testado no experimento de exposição subletal ($n=6$) foram transferidos em grupo para um túnel de natação aberto dotado de bombas com cabeçote de plástico, controladas por computadores. Os animais foram, então,

submetidos a uma velocidade de corrente de água de 10 cm.s⁻¹ (aproximadamente um comprimento de corpo por segundo) para recuperação do estresse de manejo por uma hora. Após esse período a velocidade da água foi aumentada em 10 cm.s⁻¹ a cada 30 min até a fadiga de todos os indivíduos. Os animais foram considerados fadigados quando permaneceram encostados na grade posterior do túnel, não oferecendo resistência à correnteza. A velocidade crítica de natação foi então calculada pela fórmula:

$$U_{\text{crit}} = U_i + [U_{ii} (T_i/T_{ii})]$$

onde U_i é a velocidade na qual o peixe chegou a exaustão (cm s⁻¹), U_{ii} é o incremento de velocidade (cm.s⁻¹), T_i é o tempo decorrido até a exaustão (min) e T_{ii} é o intervalo de tempo entre os incrementos de velocidade.

Análise da atividade das enzimas acetilcolinesterase e fosfatase alcalina

Ao final de cada período experimental os animais foram sacrificados por dissecação da medula espinhal sendo coletadas amostras de sangue, por meio de punção da veia caudal, e músculo, sendo as alíquotas de músculo imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior mensuração da atividade da enzima acetilcolinesterase (Ache). O sangue foi imediatamente centrifugado a 5000 rpm em uma centrífuga refrigerada MPW Med. Instruments, modelo MPW-350R, sendo o plasma recuperado e imediatamente congelado a -80°C para posterior avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina (FA). As amostras de músculo foram homogeneizadas com tampão fosfato 50 mM na proporção de 1:4 (tecido:tampão). A atividade da Ache foi determinada segundo o método descrito por

Ellman *et al.* (1961) que consiste na determinação da taxa de produção de tiocolina. A atividade cinética da Ache foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 412nm, em um espectrofotômetro Spectronic Genesis 2. As proteínas totais do músculo foram determinadas pelo método do biureto modificado usando um “kit” comercial Doles. As amostras foram lidas em um espectrofotômetro Spectronic Genesis-2 em 550nm. A concentração de proteínas nas amostras está expressa em g/dL. A atividade absoluta da enzima Ache é expressa em nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹. A concentração de FA no plasma foi dosada por meio de Kit da InVitro Diagnóstica. O método se baseia na hidrólise da timolftaleína monofosfato pela fosfatase alcalina, com liberação de timolftaleína que em meio alcalino apresenta cor azul cuja intensidade é diretamente proporcional à atividade enzimática. As amostras foram lidas no espectrofotômetro Spectronic Genesis-2 em 590 nm. A concentração é expressa em UI.

Análise estatística

Os resultados obtidos são expressos como média±erro padrão. O teste de Levene foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias entre os tratamentos. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram verificadas por análise de variância de um fator (ANOVA). Havendo diferença significativa o teste de Tukey foi utilizado para discriminação (Zar, 1984). O nível mínimo de significância foi de 95% (P < 0,05).

Resultados

Exposição à concentração subletal

A concentração inicial dos 16 hidrocarbonetos determinados na fração solúvel do petróleo (FSP) foi de $10,9 \pm 0,3$ $\mu\text{g/L}$ duas horas após o início do experimento. Nota-se uma diminuição na concentração de hidrocarbonetos da FSP de cerca de 60% já após 24h de exposição. Após esse período a concentração continua diminuindo, porém, em uma taxa menor, já que a substituição de água foi de apenas 20% e a volatilização continuou ocorrendo. Ao final do período de exposição à concentração de hidrocarbonetos na FSP foi de $4,6 \pm 1,5$ $\mu\text{g/L}$. Já a fração insolúvel do petróleo (FIP) iniciou-se com uma concentração de hidrocarbonetos um pouco abaixo da fração solúvel ($9,3 \pm 0,3$ $\mu\text{g/L}$), atingindo uma concentração de $10,5 \pm 0,4$ $\mu\text{g/L}$ ao final do período de exposição. A concentração de hidrocarbonetos do controle, fração solúvel do óleo mineral (FSM) e fração insolúvel do óleo mineral (FIM) mantiveram-se em torno de $0,15 \pm 0,005$ $\mu\text{g/L}$ ao longo de todo o período experimental (Figura 1).

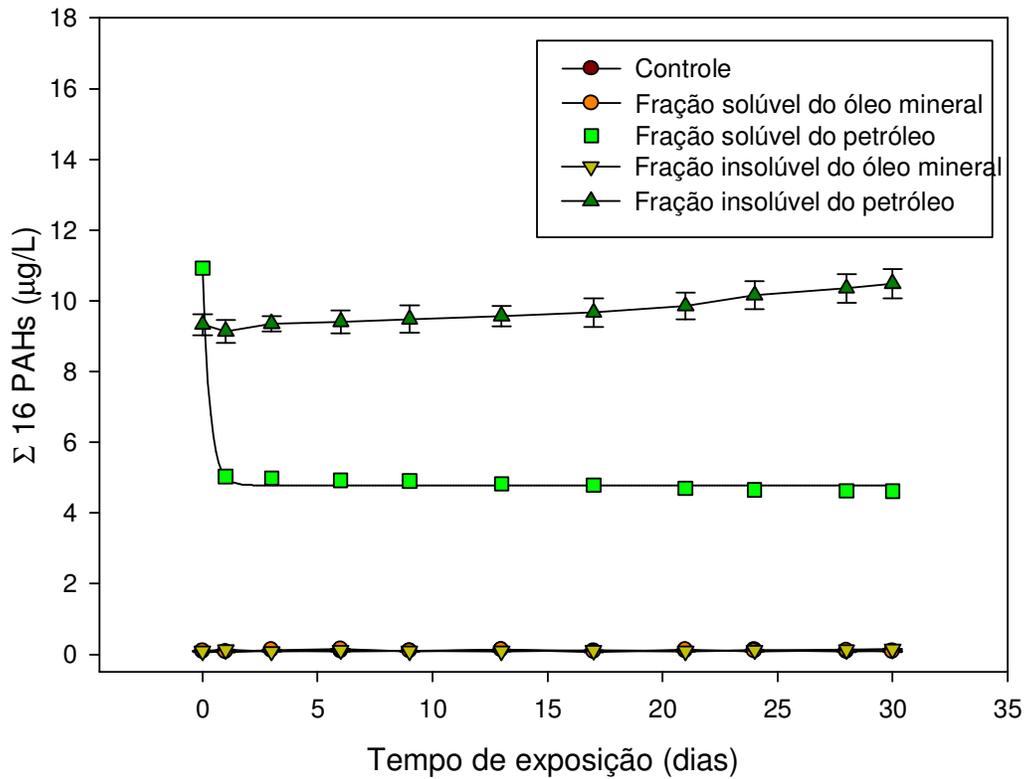


Figura 1. Somatório da concentração ($\mu\text{g/L}$) dos 16 PAHs dosados nas unidades experimentais ao longo do período de exposição durante o experimento de exposição subletal ao petróleo.

Atividade natatória espontânea

Juvenis de tambaqui expostos por um dia e 15 dias à fração insolúvel do petróleo tiveram sua atividade natatória significativamente reduzida quando comparada ao controle (Fig. 2). Após 30 dias de exposição essa diminuição na atividade natatória pode ser observada nos peixes expostos tanto a FIP quanto a FIM (Fig. 2).

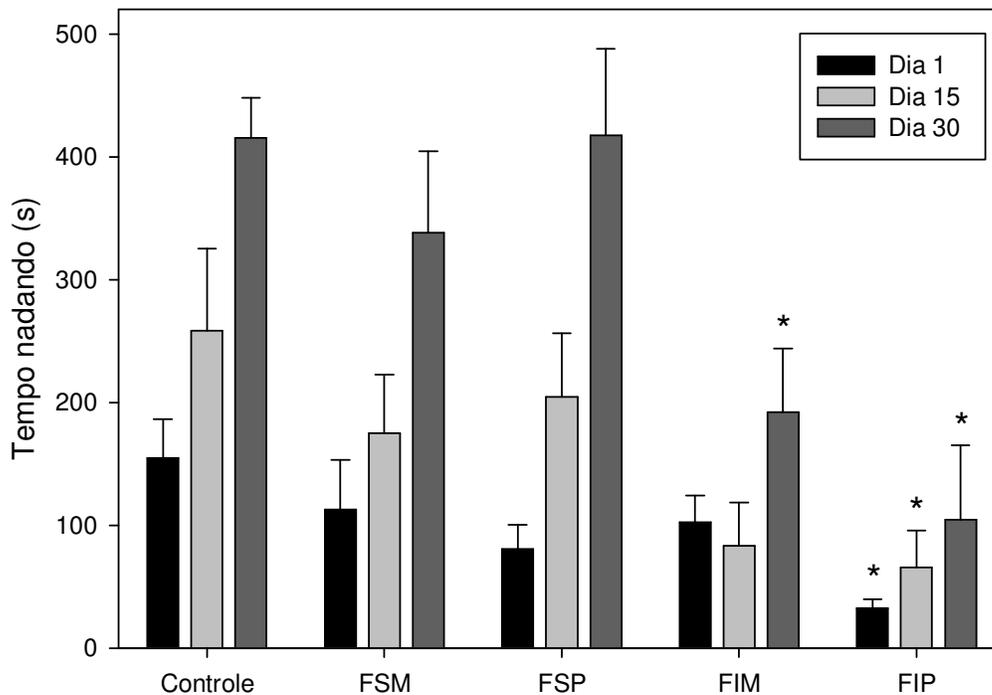


Figura 2. Atividade natatória espontânea de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após exposição a 1, 15 ou 30 dias a diferentes tratamentos. Controle: água do poço, FSM: fração solúvel do óleo mineral, FSP: fração solúvel do petróleo, FIM: fração insolúvel do óleo mineral, FIP: fração insolúvel do petróleo. *estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$).

Resposta à substância de alarme

Juvenis de tambaqui controle de qualquer período experimental (1, 15 ou 30 dias) e estimulados com extrato de pele responderam apropriadamente à substância alarme já que a mudança no tempo nadando e no número de pellets consumidos diminuiu significativamente em relação aos peixes expostos ao

controle e estimulados com água destilada (Fig. 3A e 3B, 4A e 4B e 5A e 5B, respectivamente). Além disso, nesses mesmos peixes observou-se um aumento no tempo para comer o primeiro pellet, em relação aos peixes controle estimulados com água destilada (Fig. 3C, 4C e 5C). Isso evidencia a existência do feromônio de alarme e das respostas comportamentais apropriadas nessa espécie. Esse mesmo padrão de resposta foi observado nos peixes submetidos a FSM, FSP em todos os tempos de exposição (Fig. 3, 4 e 5). Os peixes expostos por um dia a fração insolúvel do óleo mineral (FIM) também responderam apropriadamente à substância de alarme, tendo o seu tempo de natação e número de pellets consumidos diminuídos, e o tempo para comer o primeiro pellet aumentado em relação ao controle estimulado com água destilada (Fig 3A, 3B e 3C, respectivamente). Apesar dos peixes expostos à FIP por um dia também terem diminuído seu tempo de natação e número de pellets consumidos e aumentado o tempo para comer o primeiro pellet quando comparados aos peixes do controle estimulados com água destilada a mudança no tempo nadando e no tempo para comer o primeiro pellet foi estatisticamente diferente do controle estimulado com extrato de pele (Fig. 3A e 3C, respectivamente).

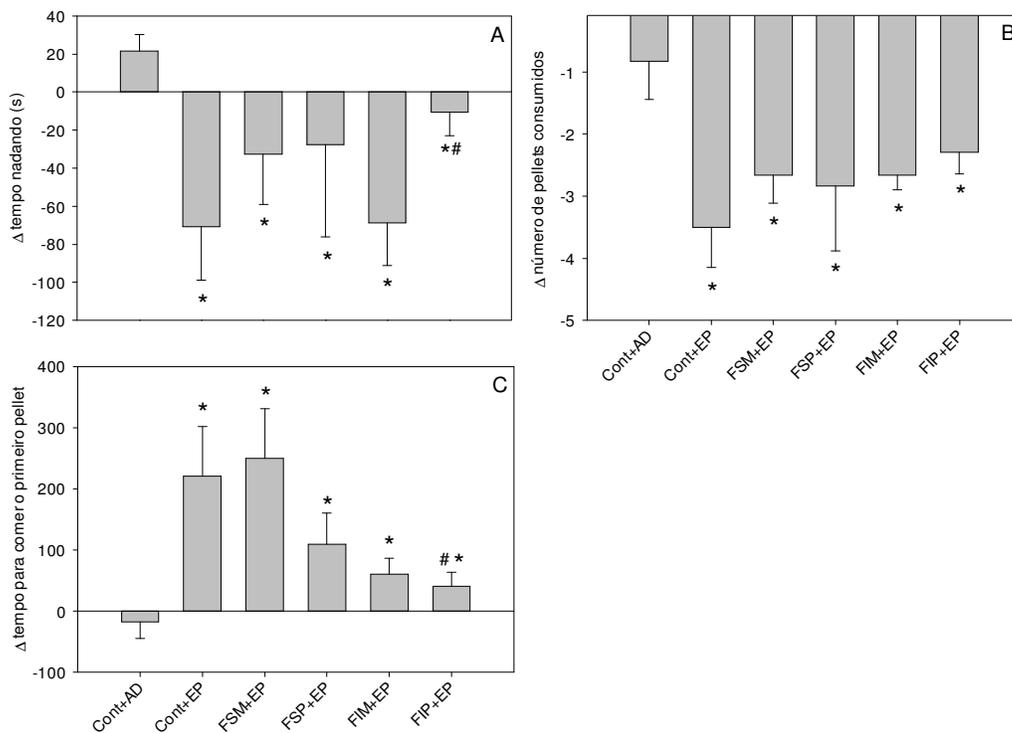


Figura 3. Resposta a substância de alarme em juvenis de tambaqui expostos por um dia a diferentes tratamentos. Mudança no tempo nadando (A), no número de pellets consumidos (B) e no tempo para comer o primeiro pellet (C). Cont+AD: controle+água destilada, Cont+EP: controle+extrato de pele, FSM+EP: fração solúvel do óleo mineral+extrato de pele, FSP+EP: fração solúvel do petróleo+extrato de pele, FIM+EP: fração insolúvel do óleo mineral+extrato de pele, FIP+EP: fração insolúvel do petróleo+extrato de pele. *estatisticamente diferente do controle+água destilada. #estatisticamente diferente do controle+extrato de pele.

Peixes expostos por 15 dias a FIM tiveram sua resposta à substância de alarme reduzida. A mudança no tempo nadando não foi estatisticamente diferente dos animais controle e estimulados com água destilada e, além disso, foi significativamente superior quando comparado aos peixes do controle e estimulado

com extrato de pele (Fig. 4A). Já a mudança no número de pellets consumidos diminuiu significativamente quando comparada ao controle estimulado com água destilada, mas aumentou significativamente quando comparada ao controle estimulado com extrato de pele (Fig. 4B). Com relação à mudança no tempo para comer o primeiro pellet houve um aumento significativo nos peixes expostos a FIM quando comparado ao controle estimulado com água destilada (Fig. 4C). Já peixes expostos por 15 dias à fração insolúvel do petróleo (FIP) perderam completamente a resposta à substância de alarme. A mudança no tempo nadando, no número de pellets consumidos e no tempo para comer o primeiro pellet foi estatisticamente igual ao controle estimulado com água destilada. Além disso, todos esses parâmetros foram estatisticamente diferentes dos peixes do controle estimulados com extrato de pele, sendo que a mudança no tempo nadando e o número de pellets consumidos aumentou significativamente e o tempo para comer o 1º pellet diminuiu (Fig. 4A, 4B e 4C, respectivamente).

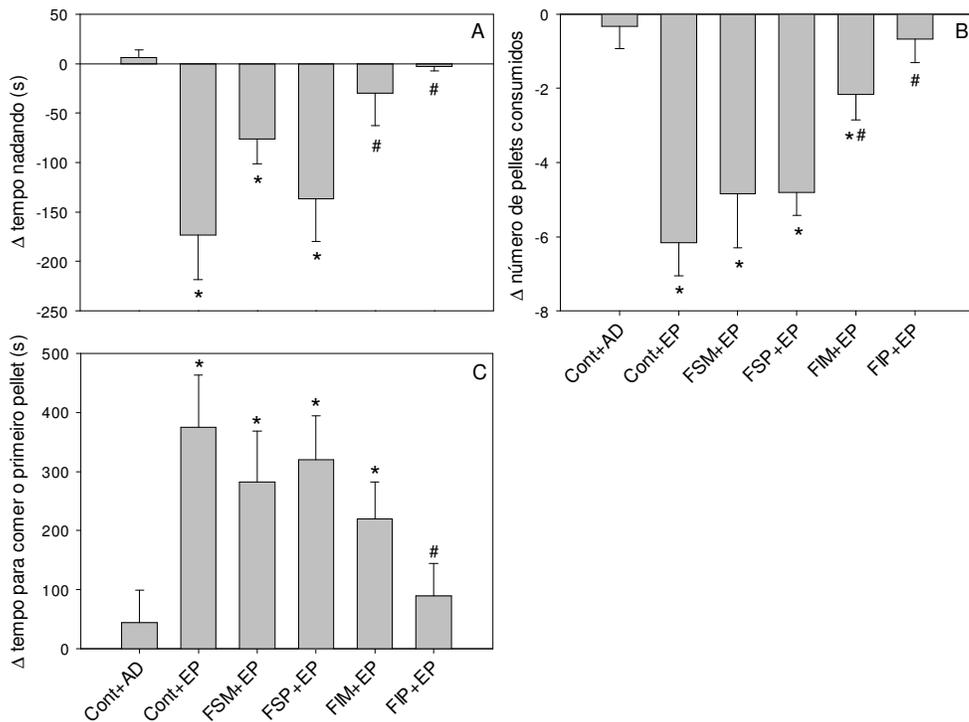


Figura 4. Resposta a substância de alarme em juvenis de tambaqui expostos por 15 dias a diferentes tratamentos. Mudança no tempo nadando (A), no número de pellets consumidos (B) e no tempo para comer o primeiro pellet (C). Cont+AD: controle+água destilada, Cont+EP: controle+extrato de pele, FSM+EP: fração solúvel do óleo mineral+extrato de pele, FSP+EP: fração solúvel do petróleo+extrato de pele, FIM+EP: fração insolúvel do óleo mineral+extrato de pele, FIP+EP: fração insolúvel do petróleo+extrato de pele. *estatisticamente diferente do controle+água destilada. #estatisticamente diferente do controle+extrato de pele.

Já na exposição crônica (30 dias) tanto os peixes expostos à FIM como os expostos a FIP não responderam à substância de alarme. Nos dois tratamentos o tempo nadando, número de pellets consumidos e tempo para comer o primeiro pellet foram estatisticamente iguais ao controle estimulado com água destilada. Ainda, o tempo nadando e o número de pellets consumidos aumentou e o tempo para comer o 1º pellet diminuiu significativamente quando comparados aos peixes expostos ao controle e estimulados com extrato de pele (Fig. 5A, 5B e 5C, respectivamente).

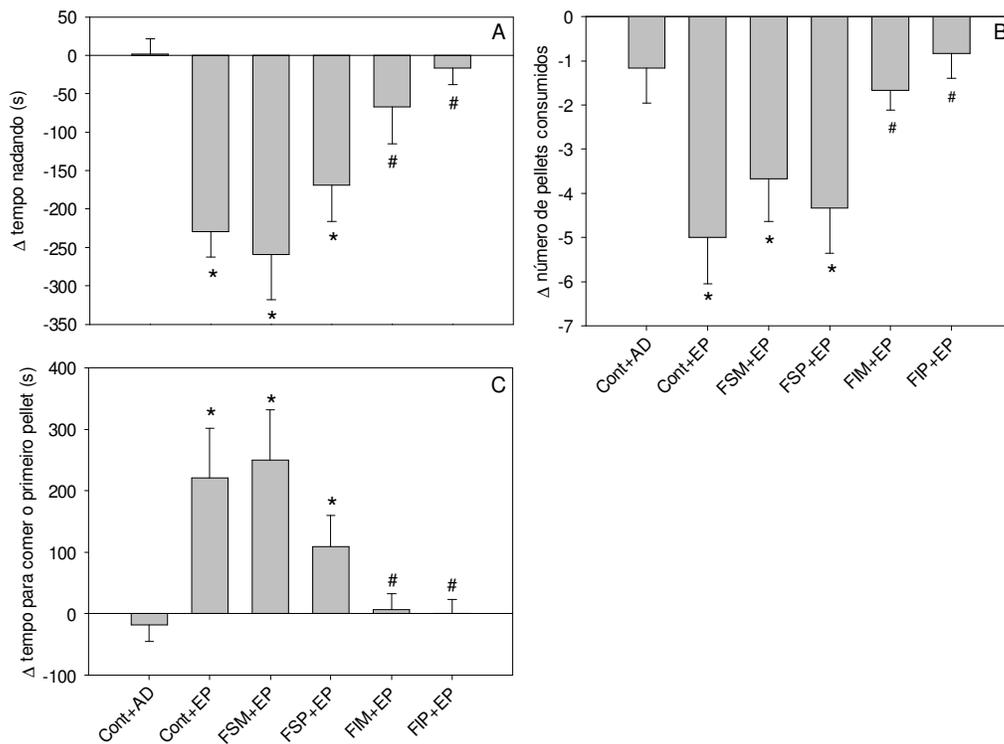


Figura 5. Resposta à substância de alarme em juvenis de tambaqui expostos por 30 dias a diferentes tratamentos. Mudança no tempo nadando (A), no número de pellets consumidos (B) e no tempo para comer o primeiro pellet (C). Cont+AD: controle+água destilada, Cont+EP: controle+extrato de pele, FSM+EP: fração solúvel do óleo mineral+extrato de pele, FSP+EP: fração solúvel do petróleo+extrato de pele, FIM+EP: fração insolúvel do óleo mineral+extrato de pele, FIP+EP: fração insolúvel do petróleo+extrato de pele. *estatisticamente diferente do controle+água destilada. #estatisticamente diferente do controle+extrato de pele.

Velocidade crítica de natação U_{crit}

A velocidade crítica de natação (U_{crit}) foi igual no dia 1 de exposição em todos os tratamentos testados. Já na exposição subcrônica (15 dias) houve uma redução significativa na U_{crit} nos peixes expostos a FIP quando comparada ao controle. Na exposição por 30 dias essa redução pôde ser observada nos peixes expostos tanto a FIM quanto a FIP (Fig. 6).

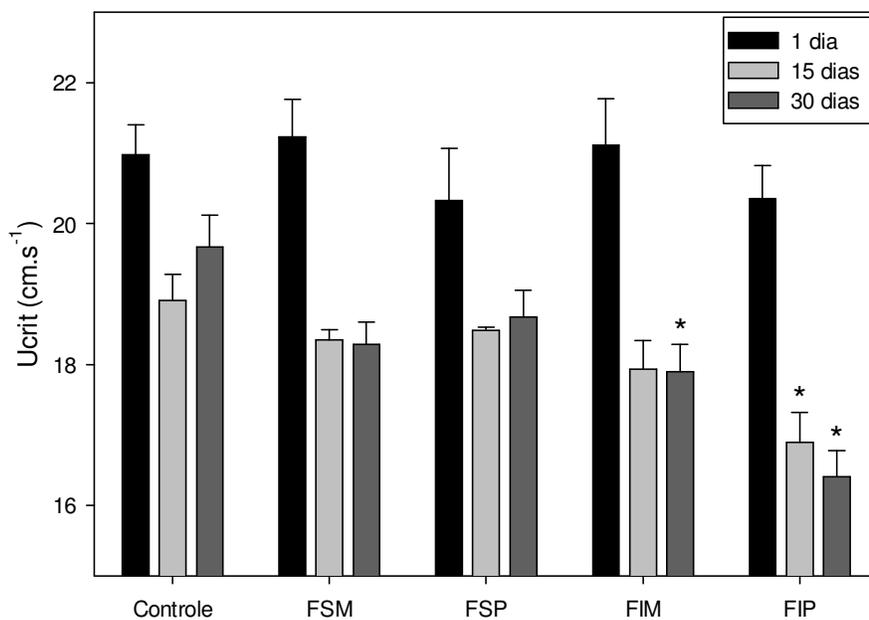


Figura 6. Velocidade crítica de natação em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos por 1, 15 ou 30 dias a diferentes tratamentos. Controle: água do poço, FSM: fração solúvel do óleo mineral, FSP: fração solúvel do petróleo, FIM: fração insolúvel do óleo mineral, FIP: fração insolúvel do petróleo. *estatisticamente diferente do controle no mesmo período de exposição ($p < 0,05$).

Atividade enzimática

Os níveis de FA aumentaram e a atividade da Ache diminuiu significativamente apenas nos peixes expostos por 30 dias à FIP quando comparados ao controle (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA) e acetilcolinesterase (Ache) em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos por 1, 15 ou 30 dias a diferentes tratamentos. Controle: água do poço, FSM: fração solúvel do óleo mineral, FSP: fração solúvel do petróleo, FIM: fração insolúvel do óleo mineral, FIP: fração insolúvel do petróleo. * estatisticamente diferente do controle no mesmo período de exposição.

Tempo de exposição (dias)	FA (UI)			Ache (nmol.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)		
	1	15	30	1	15	30
Controle	12,5±0,9	10,1±1,1	8,4±2,0	56,6±4,1	60,3±4,3	61,2±7,3
FSM	12,3±1,2	11,2±1,8	9,5±3,1	65,7±4,3	53,8±9,2	66,2±2,1
FSP	15,6±0,3	11,4±2,3	9,8±2,7	44,6±5,6	49,3±6,7	56,5±6,2
FIM	13,8±1,2	14,7±0,9	15,8±2,0	62,3±8,2	42,1±6,2	45,0±2,8
FIP	15,9±4,7	16,6±0,3	33,3±2,2*	47,3±4,6	41,7±8,3	39,6±2,2*

Exposição a concentração letal

O somatório da concentração inicial dos 16 hidrocarbonetos dosados na fração solúvel do petróleo foi de 204,8±14,6 µg/L duas horas após o início do experimento. Notou-se uma diminuição na concentração de hidrocarbonetos da FSP de cerca de 70% já após 24h de exposição. Após esse período a concentração continuou diminuindo. Ao final do período de exposição à concentração de hidrocarbonetos na FSP foi de 23,8±11,4 µg/L. Na fração insolúvel do petróleo inicia-se a concentração

inicial de hidrocarbonetos um pouco abaixo da fração solúvel ($174,2 \pm 17 \mu\text{g/L}$), mantendo-se próxima a esse valor ao longo do período de exposição. A concentração de hidrocarbonetos do controle manteve-se em torno de $0,11 \pm 0,007 \mu\text{g/L}$ ao longo de todo o período experimental (Figura 7).

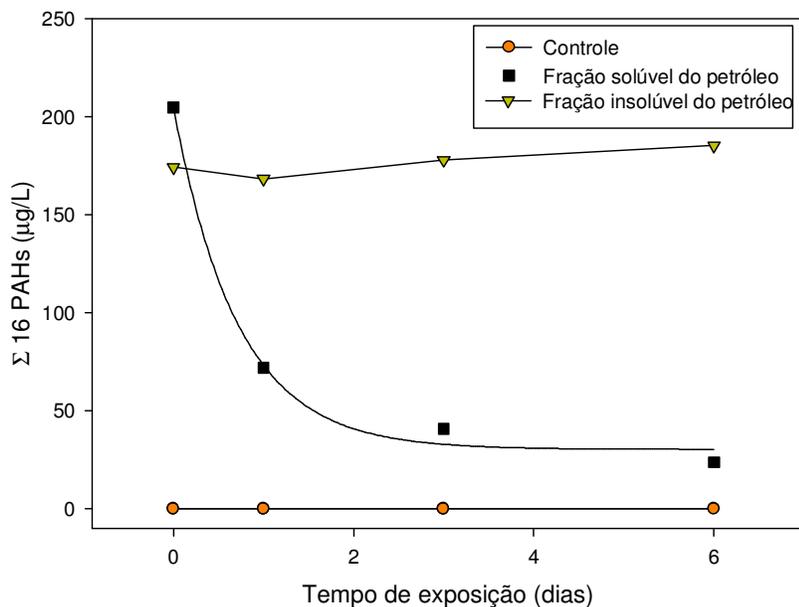


Figura 7. Somatório da concentração ($\mu\text{g/L}$) dos 16 PAHs dosados nas unidades experimentais ao longo do período de exposição durante o experimento de exposição as altas concentrações de petróleo.

Mortalidade

Peixes expostos ao controle e à FSP não sofreram mortalidade ao longo de todo o período experimental. Após 4 dias de exposição à FIP observou-se 10% de

mortalidade nesses peixes. Essa mortalidade chegou a 35% com 5 dias de exposição e atingiu 65% após 6 dias de exposição.

Atividade natatória

Peixes expostos por um dia a altas concentrações da fração solúvel do petróleo tiveram sua atividade natatória diminuída significativamente, enquanto peixes expostos à fração insolúvel tiveram sua atividade natatória aumentada significativamente, quando comparados ao controle (Fig.8). Já aos três dias de exposição, os peixes expostos à FIP mantiveram seu nível de atividade elevado quando comparados ao controle, enquanto nos expostos à FSP observou-se uma tendência de diminuição, porém sem diferença estatística quando comparados ao controle (Fig. 9). Nos peixes expostos a seis dias a FSP mantiveram esse mesmo padrão, ou seja, uma tendência à diminuição na atividade natatória, porém sem diferença estatística do controle. Já os expostos à FIP tiveram sua atividade natatória significativamente reduzida quando comparados ao controle (Fig.10).

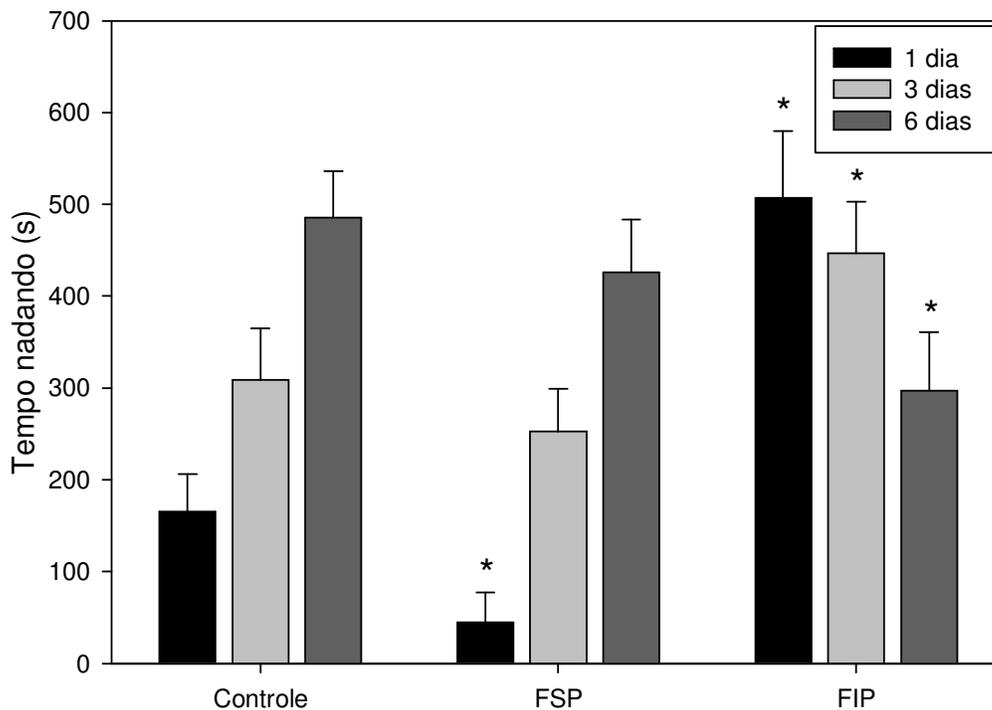


Figura 8. Atividade natatória espontânea de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos por 1, 3 e 6 dias a altas concentrações de petróleo. Controle: água do poço, FSP: fração solúvel do petróleo, FIP: fração insolúvel do petróleo.

Resposta à substância de alarme

Juvenis de tambaqui de qualquer período experimental (1, 3 ou 6 dias) expostos ao controle e estimulados com extrato de pele responderam apropriadamente à substância de alarme já que a mudança no tempo nadando e no número de pellets consumidos diminuíram significativamente em relação aos peixes expostos ao controle e estimulados com água destilada (Fig. 9A e 9B, 10A e 10B e 11A e 11B, respectivamente). Além disso, nesses mesmos peixes observou-se um aumento no tempo para comer o primeiro pellet em relação aos peixes controle

estimulados com água destilada (Fig. 9C, 10C e 11C). Isso evidencia a existência do feromônio de alarme e das respostas comportamentais apropriadas nessa espécie.

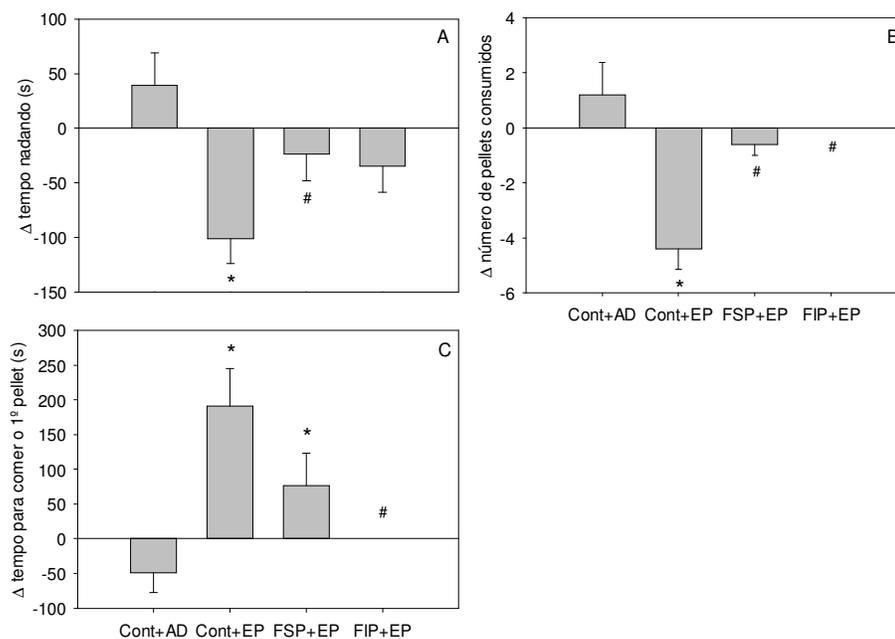


Figura 9. Resposta à substância de alarme em juvenis de tambaqui expostos por um dia a diferentes tratamentos. Mudança no tempo nadando (A), no número de pellets consumidos (B) e no tempo para comer o primeiro pellet (C). Cont+AD: controle+água destilada, Cont+EP: controle+extrato de pele, FSP+EP: fração solúvel do petróleo+extrato de pele, FIP+EP: fração insolúvel do petróleo+extrato de pele. *estatisticamente diferente do controle+água destilada. #estatisticamente diferente do controle+extrato de pele.

Os peixes expostos por um dia a FSP tiveram uma redução na resposta à substância de alarme. O tempo para comer o primeiro pellet foi maior do que o controle estimulado com água destilada, porém, o tempo nadando e o número de pellets consumidos foi estatisticamente igual. Além disso, o tempo nadando e o número de pellets consumidos foi significativamente maior quando comparado aos

peixes expostos ao controle e estimulados com extrato de pele (Fig. 9). A exposição à FIP também reduziu a resposta à substância de alarme. Juvenis de tambaqui expostos à FIP não diminuíram seu tempo nadando, o número de pellets consumidos ou o tempo para comer o primeiro pellet quando comparados aos peixes expostos ao controle e estimulados com água destilada. Além disso, o número de pellets consumidos foi significativamente maior e o tempo para comer o primeiro pellet significativamente menor do que nos peixes expostos ao controle e estimulados com extrato de pele (Fig. 9A, 9B e 9C, respectivamente).

A exposição por três dias à FSP não interferiu na resposta à substância de alarme. A mudança no tempo nadando e no número de pellets consumidos nos peixes expostos a FSP e estimulados com extrato de pele foi significativamente menor do que nos peixes controle e estimulados com água destilada. Também pôde ser observado um aumento no tempo para comer o primeiro pellet quando comparado ao controle estimulado com água destilada (Fig. 10A, 10B e 10C, respectivamente). Já peixes expostos à FIP não responderam à introdução do extrato de pele. A mudança no tempo nadando, no número de pellets consumidos e no tempo para comer o primeiro pellet foram estatisticamente iguais aos peixes expostos ao controle e estimulados com água destilada. Além disso, a mudança no tempo nadando e no número de pellets consumidos foi significativamente maior e o tempo para comer o primeiro pellet foi significativamente menor quando comparados aos peixes expostos ao controle e estimulados com extrato de pele (Fig. 10A, 10B e 10C, respectivamente). Com seis dias de exposição manteve-se o mesmo padrão: peixes expostos à fração solúvel do petróleo responderam apropriadamente e peixes expostos à fração insolúvel do

petróleo não responderam apropriadamente à introdução da substância de alarme (Fig. 11).

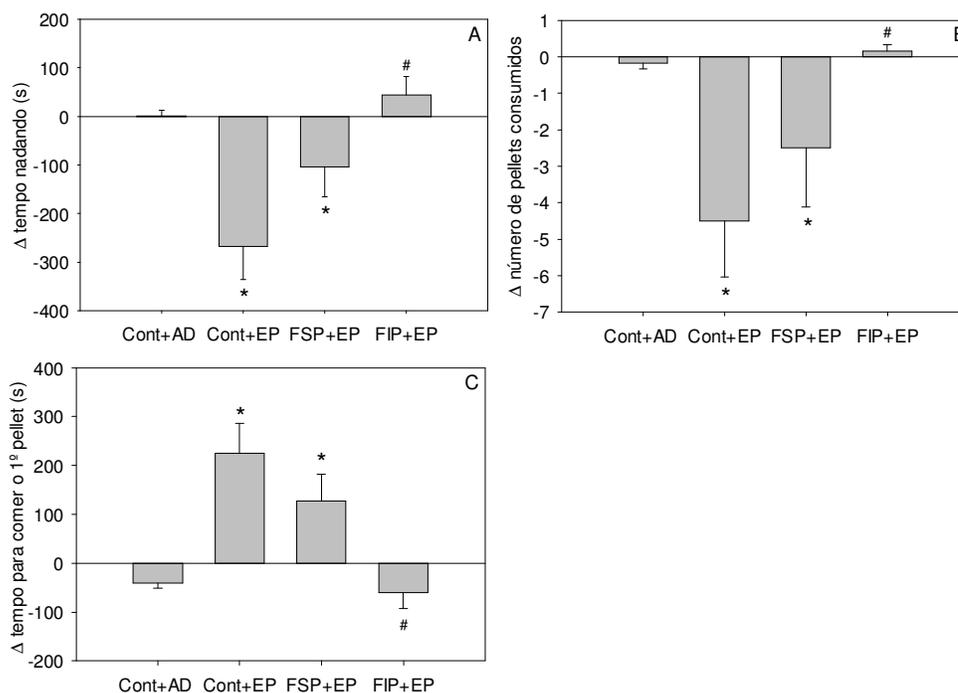


Figura 10. Resposta à substância de alarme em juvenis de tambaqui expostos por três dias a diferentes tratamentos. Mudança no tempo nadando (A), no número de pellets consumidos (B) e no tempo para comer o primeiro pellet (C). Cont+AD: controle+água destilada, Cont+EP: controle+extrato de pele, FSP+EP: fração solúvel do petróleo+extrato de pele, FIP+EP: fração insolúvel do petróleo+extrato de pele. *estatisticamente diferente do controle+água destilada. #estatisticamente diferente do controle+extrato de pele.

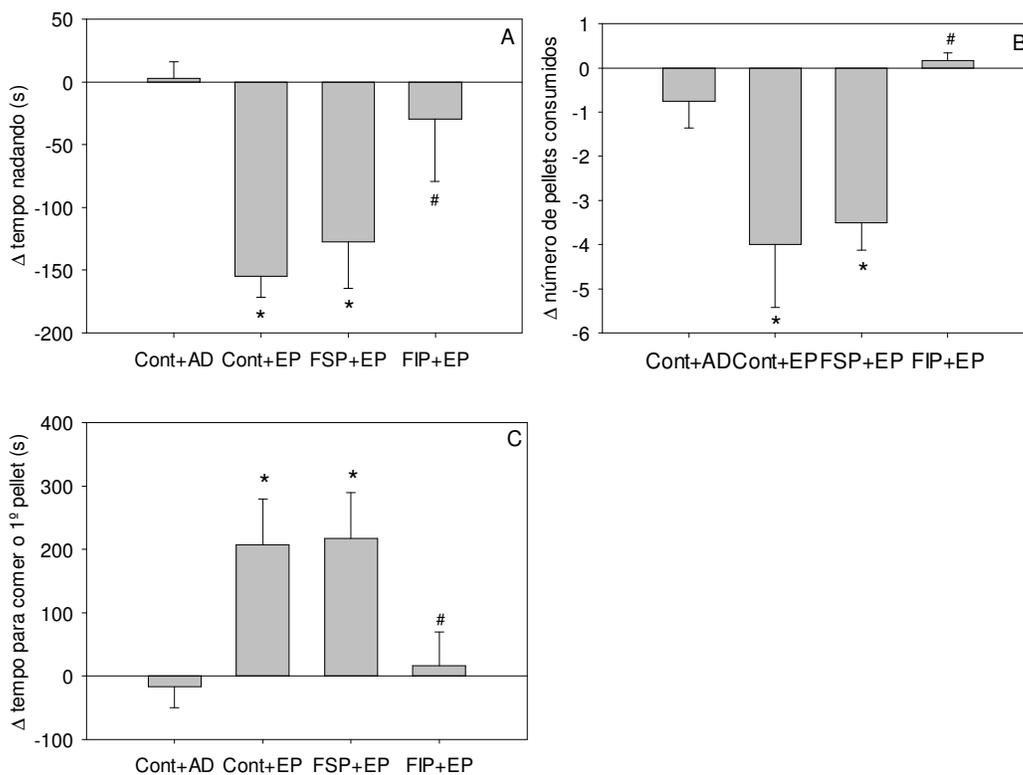


Figura 11. Resposta à substância de alarme em juvenis de tambaqui expostos por 6 dias a diferentes tratamentos. Mudança no tempo nadando (A), no número de pellets consumidos (B) e no tempo para comer o primeiro pellet (C). Cont+AD: controle+água destilada, Cont+EP: controle+extrato de pele, FSP+EP: fração solúvel do petróleo+extrato de pele, FIP+EP: fração insolúvel do petróleo+extrato de pele. *estatisticamente diferente do controle+água destilada. #estatisticamente diferente do controle+extrato de pele.

Atividade enzimática

Peixes expostos por um ou três dias a FSP ou a FIP não tiveram os níveis de FA alterados. Já peixes expostos por seis dias à FIP tiveram seus níveis de FA significativamente reduzidos quando comparados ao controle no mesmo período de exposição. A exposição por um dia a FSP reduziu significativamente a atividade da

Ache quando comparada ao controle no mesmo período de exposição. Juvenis de tambaqui expostos a FIP por três e seis dias tiveram a atividade da Ache reduzida quando comparados aos peixes submetidos ao controle no mesmo período de exposição (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA) em e acetilcolinesterase (Ache) em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos por 1, 3 ou 6 dias a diferentes tratamentos. Controle: água do poço, FSP: fração solúvel do petróleo, FIP: fração insolúvel do petróleo. * estatisticamente diferente do controle no mesmo período de exposição.

Tempo de exposição (dias)	FA (UI)			Ache (nmol.min ⁻¹ .mg protein ⁻¹)		
	1	3	6	1	3	6
Controle	12,3±0,9	12,3±1,7	7,7±0,4	93,7±5,1	104,5±9,4	77,7±6,8
FSP	13,4±1,1	11,9±6,2	6,5±0,3	78,8±3,2*	96,4±7,4	69,6±6,0
FIP	15,0±0,5	11,7±1,6	14,5±0,5*	106,8±4,7	71,3±8,1*	34,0±6,7*

Discussão

Exposição à concentração subletal

As mudanças nos parâmetros estudados na exposição subletal a diferentes frações do petróleo foram observadas apenas naqueles peixes expostos à fração insolúvel do petróleo, evidenciando assim um forte efeito mecânico da camada de óleo na superfície da água sobre o peixe. A fração solúvel do petróleo é considerada a mais agudamente tóxica aos organismos aquáticos (Heath, 1995). Porém, a maioria dos trabalhos se utiliza de altíssimas concentrações de fração solúvel para testar os efeitos desse componente do petróleo (Alkindi *et al.*, 1996; Brauner *et al.*, 1999; Stephens *et al.*, 1999; Shukla *et al.*, 2007; Eriyamremu *et al.*, 2008). O presente estudo testou o efeito da exposição a uma concentração subletal de fração solúvel do petróleo por diferentes períodos de tempo em juvenis de tambaqui e não encontrou mudanças em nenhum dos parâmetros estudados. Isso, provavelmente, se deve a baixa concentração de hidrocarbonetos a qual os peixes foram expostos, já que mais de 60% da concentração inicial de hidrocarbonetos foi perdida nas primeiras 24h de exposição. Ao longo desse período, a concentração de hidrocarbonetos continuou decrescendo chegando a cerca de 4µg/L ao final do período de exposição.

A exposição à fração insolúvel do petróleo causou mudanças em maior ou menor grau em todos os parâmetros estudados. A diminuição observada na atividade natatória já no primeiro dia de exposição e mantida ao longo de todo o período experimental pode causar profundas mudanças na estrutura da população já que a diminuição na atividade natatória está ligada a uma redução da taxa de ingestão de alimento e, conseqüentemente, do crescimento (Meager e Batty, 2007). Estando o crescimento relacionado ao *fitness*, uma diminuição no crescimento pode interferir com

a capacidade do organismo de se reproduzir com sucesso (Claireaux e Lefrançois, 2007). Embora a atividade da Ache esteja relacionada à atividade natatória (Solé *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008) essa relação não foi observada durante todo o período de estudo. A redução da atividade natatória que ocorreu em juvenis de tambaqui expostos à fração insolúvel do petróleo já no primeiro dia de exposição não foi acompanhada de uma redução significativa na atividade da Ache, sendo que uma redução significativa na atividade dessa enzima pôde ser observada apenas na exposição crônica, de 30 dias. Estudos relacionando a exposição a pesticidas e o comportamento natatório de peixes tem mostrado uma correlação positiva entre esses dois parâmetros (Brewer *et al.*, 2001; Sismeiro-Vivas *et al.*, 2007; Xuereb *et al.*, 2009). A falta de uma relação entre esses parâmetros no presente estudo deve-se ao fato de que PAHs não atuam de forma específica nessa enzima como é o caso dos pesticidas (Sturm *et al.*, 1999). Uma redução significativa na atividade natatória também pôde ser observada nos peixes expostos de forma crônica à fração insolúvel do óleo mineral. Até onde temos conhecimento esse foi o primeiro trabalho a testar os efeitos da exposição a um óleo mineral inerte, verificando assim os efeitos mecânicos de uma camada de óleo na superfície da água sobre o peixe. Essa redução na atividade natatória pode estar relacionada a uma diminuição na capacidade respiratória devido à oclusão das brânquias pelo óleo, já que este é degradado ao longo do tempo e passa para a coluna d'água (Blaxter e Hallers-Tjabbes, 1992). Essa diminuição na capacidade respiratória também ocorreu nos peixes expostos à fração insolúvel do petróleo. Porém, aliada à oclusão das brânquias percebe-se uma alteração fisiológica devido à exposição aos hidrocarbonetos do petróleo. Isso se deve à dificuldade de volatilização dos compostos presentes no petróleo devido à presença da camada de

óleo, fazendo com que o efeito nesses peixes ocorra de forma mais acentuada do que nos peixes expostos somente à fração insolúvel do óleo mineral. Em conjunto, esses resultados nos mostram que os efeitos da atividade natatória nos peixes expostos à fração insolúvel do petróleo estão mais relacionados a uma diminuição na captação de oxigênio (Plaut, 2001) do que a um efeito neurotóxico dos hidrocarbonetos, sendo que essa neurotoxicidade só pôde ser percebida na exposição crônica.

Os peixes e organismos aquáticos em geral recebem boa parte das informações sobre o ambiente em que estão através da olfação, sendo esse sentido utilizado para reprodução, localização de alimento, discriminação de parentesco, percepção de predadores e migração (Tierney *et al.*, 2009). Como revisado por esse mesmo autor, trabalhos relacionando exposição ao petróleo com modificações no comportamento relacionadas à olfação são escassos, sendo que ele relaciona apenas o trabalho de Brannon *et al.* (1986) que expôs salmão ao petróleo por uma hora e verificou sua capacidade de voltar ao local de desova. Juvenis de tambaqui submetidos a concentrações subletais de fração insolúvel do petróleo por um dia diminuíram sua resposta à substância de alarme. Com um período de exposição mais prolongado à fração insolúvel do petróleo, juvenis de tambaqui perderam completamente a resposta à substância de alarme. Esse sistema é utilizado como a fonte primária de informação por peixes para detectar os riscos de predação no ambiente em que ele se encontra (Brown *et al.*, 2004). Embora os efeitos da predação na população de presas sejam imprevisíveis devido a sua alta complexidade (Scott e Sloman, 2004), a dimensão com a qual os predadores impactam a população de presas depende, primariamente, da capacidade das presas em evitar a predação (Vamosi e Schluter, 2002). Assim, a perda dessa resposta pode levar ao desequilíbrio

das relações predador-presa. Essa perda na resposta à substância de alarme provavelmente se dá por meio de dois mecanismos: danos neuronais e oclusão mecânica da roseta olfatória pelo óleo. A contribuição do efeito mecânico na perda da resposta à substância de alarme é visível na medida em que com o aumento do tempo de exposição dos peixes da fração insolúvel do óleo mineral também causa perda de resposta à substância de alarme. A diminuição na capacidade olfativa pode interferir não apenas na detecção de predadores, mas também na captação de todas as outras informações do ambiente que são mediadas pela olfação.

Uma importante observação feita durante os testes comportamentais é que juvenis de tambaqui expostos à fração insolúvel do petróleo ou óleo mineral não diminuíram sua taxa de alimentação. Os pellets de ração oferecidos durante os testes comportamentais foram consumidos, algumas vezes, juntamente com o óleo já que essa ração não afundava prontamente ficando na superfície da água com o óleo, aumentando assim o contato do animal com o petróleo. Isso é importante no caso de um derramamento em ambiente natural, já que o tambaqui é um peixe frugívoro se alimentando, principalmente, de frutos e sementes que caem da floresta inundada e que ficam boiando na superfície da água (Ferreira *et al.*, 1998). Esse hábito alimentar e o fato desses peixes não terem deixado de se alimentar mesmo com a camada de óleo na superfície, torna-os mais suscetíveis aos efeitos do petróleo. Outra observação é que esses peixes sofreram a expansão do lábio inferior, sugerindo que estavam passando por uma situação de hipoxemia, mesmo com os níveis de oxigênio dissolvido normais.

A capacidade natatória é considerada característica determinante da sobrevivência em muitas espécies de peixes (Swanson, 1998). Juvenis de tambaqui expostos de forma subcrônica e crônica à concentração subletal da fração insolúvel do petróleo sofreram uma diminuição na sua capacidade natatória. A exposição de juvenis de tambaqui à fração insolúvel do óleo mineral de forma crônica também diminuiu sua capacidade natatória. Como revisado por Hammer (1995), a redução na U_{crit} é, usualmente, resultado da interferência na tomada de oxigênio nas brânquias ou redução na capacidade de transporte de oxigênio. Em nosso estudo esse é novamente o caso já que a exposição tanto à fração insolúvel do petróleo como do óleo mineral causou uma diminuição na U_{crit} pelo efeito mecânico de oclusão nas brânquias. O aumento nos níveis de fosfatase alcalina plasmática nos peixes expostos à fração insolúvel do petróleo mostra também que esses peixes estão experimentando algum dano hepático (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003). Sendo o fígado o responsável pela mobilização das reservas energéticas, a falta de suprimento energético pode ter contribuído para a diminuição na capacidade natatória observada naqueles peixes expostos à fração insolúvel do petróleo. Outra importante questão com relação à diminuição da U_{crit} é que ela está correlacionada com outra forma de natação: a natação de fuga. Reidy *et al.* (1999) observaram que apesar da U_{crit} ser considerada uma forma de natação aeróbica e a natação de fuga ser anaeróbica, existe uma correlação positiva entre as duas. Sendo assim, a diminuição na U_{crit} também pode representar uma diminuição na capacidade de natação anaeróbica, sendo esse tipo de natação o mais utilizado para evitar o ataque de predadores.

Juntos esses resultados mostram um importante efeito mecânico da camada de óleo na superfície da água sobre o peixe. A perda da resposta à substância de

alarme juntamente com a redução na atividade e capacidade natatória podem romper o equilíbrio das comunidades aquáticas uma vez que locomoção e capacidade de evitar a predação são consideradas os dois mais importantes componentes que afetam o crescimento e a sobrevivência. Dessa forma, redução no crescimento e na sobrevivência diminui a capacidade reprodutiva do indivíduo com efeitos imprevisíveis na população.

Exposição a altas concentrações

A concentração de hidrocarbonetos nas primeiras horas de exposição foi bastante alta, porém decaiu em cerca de 70% já após 24h de exposição e após 6 dias ela foi apenas 11,6% da concentração inicial ($23,8 \pm 11,4$ µg/L). Isso se refletiu nos efeitos observados durante o período de exposição, onde alterações nesse tratamento foram vistas apenas no primeiro dia de exposição. Já a concentração da fração insolúvel permanece estável já que em 6 dias não há tempo para uma maior degradação do óleo e conseqüente passagem deste para a coluna de água.

A exposição a altas concentrações de hidrocarbonetos levou a diferentes respostas no que diz respeito à atividade natatória de juvenis de tambaqui. A diminuição na atividade natatória nos peixes expostos à fração solúvel do petróleo está de acordo com resultados de outros estudos que mostram que os hidrocarbonetos dissolvidos na água causam um efeito de torpor nos peixes (Stephens *et al.*, 1999; Correia *et al.*, 2007; González-Doncel *et al.*, 2008). Essa diminuição na atividade natatória também é acompanhada por uma diminuição na atividade da enzima acetilcolinesterase, mostrando que a exposição aguda a altas concentrações de hidrocarbonetos dissolvidos na água interfere na neurotransmissão colinérgica, o que não havia ocorrido na exposição à fração solúvel do petróleo em baixas

concentrações, mesmo durante um longo tempo de exposição. Com o passar do tempo de exposição, a concentração de hidrocarbonetos na água diminuiu drasticamente e aos três dias de exposição, a atividade natatória e da enzima Ache já são indistintas estatisticamente do controle. Essa necessidade de altas concentrações para a inibição da Ache está relacionada com a falta de especificidade dos hidrocarbonetos por essa enzima. Resultados semelhantes foram encontrados em peixes expostos agudamente ao cádmio, onde apenas a exposição a altas concentrações causou inibição na atividade da Ache, enquanto a exposição a concentrações subletais não causou mudança de sua atividade (Beauvais *et al.*, 2001).

Em contraste, juvenis de tambaqui expostos por um dia à fração insolúvel do petróleo tiveram um aumento na sua atividade natatória. Esse aumento na atividade natatória não se deu por uma estimulação do sistema colinérgico já que os níveis de Ache se mantiveram iguais aos do controle. Uma importante observação realizada durante os testes comportamentais foi que esses peixes sofreram a expansão do lábio inferior, indicando possível hipoxemia, mesmo com os níveis normais de oxigênio dissolvido na água. Esse aumento da natação está, provavelmente, relacionado a uma tentativa de aumentar a ventilação das brânquias aumentando, assim, a captação de oxigênio. Porém, essa adaptação para tomada de ar na superfície acaba prejudicando os peixes, como sugerido por Val e Almeida-Val (1995): peixes expostos à fração insolúvel do petróleo acabavam engolindo óleo na tentativa de captar a água superficial. Esse óleo ou era expelido pela boca ou saía pelos opérculos, entrando, dessa forma, em contato direto com as brânquias e outros órgãos internos. Assim, uma adaptação que evoluiu ao longo de milhares de anos para facilitar a vida em

ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio, acaba sendo prejudicial no caso de um derramamento de petróleo. Outras espécies de peixes da Amazônia possuem essa mesma adaptação ou, então, adaptações para a respiração aérea e podem apresentar o mesmo comportamento, tornando-se assim suscetíveis aos efeitos do petróleo (Val e Almeida-Val, 1995). Esse aumento na atividade natatória manteve-se aos três dias de exposição apesar de uma diminuição na atividade da Ache, mostrando que essa diminuição nos níveis de Ache ainda não é crítica para a neurotransmissão colinérgica e os juvenis de tambaqui ainda conseguem manter um nível de atividade natatória elevada para tentar melhorar a captação de oxigênio.

A partir de quatro dias de exposição à fração insolúvel do petróleo mortalidades começam a ocorrer, sendo que essa mortalidade chega a 65% com seis dias de exposição. Um dos motivos dessa mortalidade pode ser a ruptura do sistema de neurotransmissão colinérgica já que a inibição na atividade da Ache chega a 56%. A acumulação de acetilcolina leva a exaustão do nervo e falha do sistema nervoso. Quando o sistema nervoso falha os músculos não recebem o estímulo elétrico por eles requerido para executar o movimento (Jee e Kang, 2004). No caso dos tambaquis expostos à fração insolúvel do petróleo, passando por uma situação de hipoxemia e necessitando de um aumento na ventilação branquial, essa falha no sistema colinérgico pode ter sido determinante para a sobrevivência.

Juvenis de tambaqui expostos por um dia à fração solúvel ou insolúvel do petróleo tiveram uma redução na resposta à substância de alarme. Essa redução desaparece na exposição dos juvenis a fração solúvel do petróleo por 3 e 6 dias. Essa rápida recuperação na resposta deve-se à alta capacidade neurogenerativa do epitélio

olfatório (Julliard *et al.*, 1995; Bettini *et al.*, 2006) à medida que a concentração de hidrocarbonetos na água diminuiu drasticamente já após 24h de exposição. Já nos peixes expostos à fração insolúvel do petróleo essa recuperação não ocorre já que a camada de óleo na superfície dificulta a volatilização dos hidrocarbonetos e causa um efeito mecânico de oclusão nas rosetas olfatórias já que esses peixes entravam continuamente em contato com o óleo na tentativa de captar oxigênio da superfície.

Uma diminuição nos níveis da enzima fosfatase alcalina foi observada ao longo do período experimental nos peixes-controle, já que esses não foram alimentados durante esse período. Essa diminuição ocorreu também nos peixes expostos à fração solúvel do petróleo, porém não ocorreu nos expostos à fração insolúvel do petróleo e aos seis dias ocorreu um aumento significativo da FA nesses peixes em relação aos peixes-controle. Isso sugere que o fígado desses peixes está passando por um processo de dano e morte celular (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003) interferindo, assim, nos processos de detoxificação e mobilização energética realizados por este órgão.

Algumas adaptações que evoluíram em peixes da Amazônia devido às condições hipóxicas do seu ambiente, como a tomada de ar na superfície da água, podem torná-los mais suscetíveis a um derramamento de petróleo. Os resultados do presente estudo mostram efeitos deletérios da exposição a concentrações subletais de petróleo em parâmetros ligados ao crescimento e sobrevivência de tambaquis que, por consequência, pode ter graves implicações para a manutenção das populações de peixes desta espécie. Por isso, recomenda-se a continuidade de estudos que enfoquem os efeitos do petróleo de Urucu em peixes amazônicos e que ações preventivas e de monitoramento sejam incentivadas na região.

Conclusões

- A exposição do tambaqui a concentrações subletais da fração insolúvel do petróleo causa alteração em parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais.
- Os efeitos sobre a atividade natatória e resposta à substância de alarme são visíveis já no primeiro dia de exposição enquanto na capacidade natatória aparecem apenas após 15 e 30 dias de exposição e nos níveis de fosfatase alcalina e atividade da acetilcolinesterase apenas aos 30 dias.
- A presença da camada de óleo na superfície da água causa um efeito mecânico. O efeito mecânico do óleo mineral inerte torna-se evidente nos parâmetros comportamentais após exposição subcrônica e na capacidade natatória após exposição crônica.
- A fração insolúvel do petróleo apresenta maior toxicidade do que a solúvel em baixas concentrações, já que a solúvel é rapidamente volatilizada.
- A fração solúvel tem efeitos importantes em exposições agudas e em altas concentrações de petróleo.
- Juvenis de tambaqui são suscetíveis à fração insolúvel do petróleo o que é evidenciado tanto pelos efeitos observados quanto pelo uso da camada superficial da coluna d'água na tentativa de uma melhor captação de oxigênio, tornado-o mais vulnerável aos efeitos do óleo na superfície.
- A relação entre acetilcolinesterase e atividade natatória e entre fosfatase alcalina e capacidade natatória pôde ser observada após exposição crônica ou então após exposição a altas concentrações.

- A exposição de juvenis de tambaqui ao petróleo na água, mesmo em concentrações subletais, interfere na capacidade de sobrevivência tendo, portanto, potencial para afetar a estrutura das populações.

Referências

- Aas, E.; Baussant, T.; Balk, L.; Liewenborg, B.; Andersen, O.K. 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*, 51: 241-258.
- Alkindi, A.Y.A.; Brown, J.A.; Waring, C.P.; Collins, J.E. 1996. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. *Journal of Fish Biology*, 49: 1291-1305.
- Anderson, J.M. 1975. Laboratory studies on the effects of oil on marine organisms: an overview. *American Petroleum Institute Publications*, 4249: 1-70.
- Araujo-Lima, C.Goulding, M. 1998. *Os frutos do tambaqui*. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé. 186pp.
- Arde, P.H.R.; Roubach, R.; Val, A.L. 2007. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research*, 38: 588-594.
- Arukwe, A.; Nordtug, T.; Kortner, T.M.; Mortensen, A.S.; Brakstad, O.G. 2008. Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environmental research*, 107: 362-370.
- Beauvais, S.L.; Jones, S.B.; Parris, J.T.; Brewer, S.K.; Little, E.E. 2001. Cholinergic and Behavioral Neurotoxicity of Carbaryl and Cadmium to Larval Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49: 84-90.
- Bebianno, M.J.; Barreira, L.A. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ria Formosa lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1849-1860.

- Bettini, S.; Ciani, F.; Franceschini, V. 2006. Recovery of the olfactory receptor neurons in the African Tilapia *mariae* following exposure to low copper level. *Aquatic Toxicology*, 76: 321-328.
- Blaxter, J.H.S.; Hallers-Tjabbes, C.C.T. 1992. The effect of pollutants on sensory systems and behaviour of aquatic animals. *Aquatic Ecology*, 26: 43-58.
- Brannon, E.L.; Quinn, T.P.; Whitman, R.P.; Nevissi, A.E.; Nakatani, E.; McAuliffe, C.D. 1986. Homing of Adult Chinook Salmon after Brief Exposure to Whole and Dispersed Crude Oil. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115: 823-827
- Brauner, C.J.; Ballantyne, C.L.; Vijayan, M.M.; Val, A.L. 1999. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 123: 127-134.
- Brett, J.R. 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 21: 1183-1226.
- Brewer, S.K.; Little, E.E.; DeLonay, A.J.; Beauvais, S.L.; Jones, S.B.; Ellersieck, M.R. 2001. Behavioral Dysfunctions Correlate to Altered Physiology in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Cholinesterase-Inhibiting Chemicals. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 40: 70-76.
- Brown, G.E.; Poirier, J.F.; Adrian Jr., J.C. 2004. Assessment of local predation risk: the role of subthreshold concentrations of chemical alarm cues. *Behavioral Ecology*, 15: 810-815.
- Brown, G.E.; Smith, R.J.F. 1998. Acquired predator recognition of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): conditioning hatchery reared fish to recognize chemical cues of a predator. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55: 611-617.

- Brust, S.M.A. 2006. *Efeitos do petróleo em juvenis de Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)*. Monografia de conclusão de curso. Centro Universitário do Norte. 45pp.
- Buet, A.; Banas, D.; Vollaire, Y.; Coulet, E.; Roche, H. 2006. Biomarker responses in European eel (*Anguilla anguilla*) exposed to persistent organic pollutants. A field study in the Vaccarès lagoon (Camargue, France). *Chemosphere*, 65: 1846-1858.
- Burks, R.L.; Lodge, D.M. 2002. Cued in: advances and opportunities in freshwater chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 28: 1901-1917.
- Cardoso, D. 2006. Petrobras intensifica ação na Amazônia. *Gazeta Mercantil*. (www.infoener.iee.usp.br/infoener/hemeroteca/imagens/93425.htm). Acesso: 24/06/2008.
- Castelões, L. 2003. Bacia sedimentar do Amazonas é a terceira em produção de petróleo. (www.comciencia.br/reportagens/petróleo). Acesso: 24/06/2008.
- CETESB, 2008. Vazamento de óleo. (www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento). Acesso: 24/06/2008.
- Chavez-Veintemilla, C.A. 2005. *Impactos do fenantreno sobre o tambaqui Colossoma macropomum Cuvier, 1818: CL50, crescimento e hematologia*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. 60pp.
- Chivers, D.P.Smith, R.J.F. 1993. The role of olfaction in chemosensory-based predator recognition in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 623-633.
- Claireaux, G.; Lefrançois, C. 2007. Linking environmental variability and fish performance: integration through the concept of scope for activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 362: 2031-2041.

- Cohen, A.; Gagnon, M.M.; Nugegoda, D. 2005. Alterations of metabolic enzymes in Australian Bass, *Macquaria novemaculeata*, after exposure to petroleum hydrocarbons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49: 200-205.
- Cohen, A.; Nugegoda, D.; Gagnon, M.M. 2001. Metabolic Responses of Fish Following Exposure to Two Different Oil Spill Remediation Techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48: 306-310.
- Correia, A.D.; Gonçalves, R.; Scholze, M.; Ferreira, M.; Henriques, M.A.R. 2007. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 347: 109-122.
- Couceiro, S.R.M.; Forsberg, B.R.; Hamada, N.; Ferreira, R.L.M. 2006. Effects of an oil spill and discharge of domestic sewage on the insect fauna of Cururu stream, Manaus, AM, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 66: 35-44.
- Damásio, J.B.; Barata, C.; Munné, A.; Ginebreda, A.; Guasch, H.; Sabater, S.; Caixach, J.; Porte, C. 2007. Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere*, 66: 1206-1216.
- Domenici, P.; Claireaux, G.; McKenzie, D.J. 2007. Environmental constraints upon locomotion and predator-prey interactions in aquatic organisms: an introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 362: 1929-1936.
- Drucker, E.G. 1996. The use of gait transition speed in comparative studies of fish locomotion. *American Zoologist*, 36: 555-566.
- Ellgaard, E.G.; Breaux, J.G.; Quina, D.B. 1979. Effects of south Louisiana crude oil on the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Proceedings of Los Angeles Academy of Sciences*, 42: 49-56.

- Ellman, G.L.; Courtney, D.; Andres Jr., V.; Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-96.
- Engelhardt, F.R.; Wong, M.P.; Duey, M.E. 1981. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water, as affected by petroleum exposure. *Aquatic Toxicology*, 1: 175-186.
- Eriyamremu, G.E.; Osagie, V.E.; Omoregie, S.E.; Omofoma, C.O. 2008. Alterations in glutathione reductase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to Bonny Light crude oil and its fractions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 284-290.
- Farr, A.J.; Chabot, C.C.; Taylor, D.H. 1995. Behavioral avoidance of fluoranthene by fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicology and Teratology*, 17: 265-271.
- Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J.A.S.; Santos, G.M. 1998. *Peixes comerciais do Amazonas: Região de Santarém, Pará*. IBAMA, Brasília. 211pp.
- Freedman, B. 1989. *Environmental ecology: The impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function*. Academic Press, San Diego. 424pp.
- Gagnon, M.M.; Holdway, D.A. 1999. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44: 92-99.
- Gesto, M.; Tintos, A.; Rodríguez-Illamola, A.; Soengas, J.L.; Míguez, J.M. 2009. Effects of naphthalene, [beta]-naphthoflavone and benzo(a)pyrene on the diurnal and nocturnal indoleamine metabolism and melatonin content in the pineal organ of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 92: 1-8.

González-Doncel, M.; González, L.; Fernández-Torija, C.; Navas, J.M.; Tarazona, J.V. 2008.

Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 87: 280-288.

Goulding, M. 1997. *História natural dos rios amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília. 208pp.

Grillitsch, B.; Vogl, C.; Wytek, R. 1999. Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part II. Variability of measurement parameters under toxicant-induced stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 2743-2750.

Hamdami, E.H.; Doving, K.B. 2007. The functional organization of the olfactory system. *Progress in Neurobiology*, 82: 80-86.

Hammer, C. 1995. Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 112: 1-20.

Hansson, T.; Schiedek, D.; Lehtonen, K.K.; Vuorinen, P.J.; Liewenborg, B.; Noaksson, E.; Tjärnlund, U.; Hanson, M.; Balk, L. 2006. Biochemical biomarkers in adult female perch (*Perca fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden). *Marine Pollution Bulletin*, 53: 451-468.

Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press, Boca Raton. 359pp.

Hodgeson, J.W.; Bashe, W.J.; Baker, T.V. 1990. *US Environmental Protection Agency, Method 550*. Environmental Protection Agency, Cincinnati. 22pp.

Honda, R.T.; Fernandes-de-Castilho, M.; Val, A.L. 2008. Cadmium-induced disruption of environmental exploration and chemical communication in matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Aquatic Toxicology*, 89: 204-206.

- Jee, J.; Kang, J. 2004. Effect of phenanthrene on haematological parameters in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminch et Schlegel). *Aquaculture Research*, 35: 1310-1317.
- Jiraungkoorskul, W.; Upatham, E.S.; Kruatrachue, M.; Sahaphong, S.; Vichasri-Grams, S.; Pokethitiyook, P. 2003. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, 18: 260-267.
- Julliard, A.K.; Saucier, D.; Astic, L. 1995. Metal X-ray microanalysis in the olfactory system of rainbow trout exposed to low level of copper. *Biology of the Cell*, 83: 77-86.
- Katsumiti, A.; Valdez-Domingos, F.X.; Azevedo, M.; da Silva, M.D.; Damian, R.C.; Almeida, M.I.M.; Silva de Assis, H.C.; Cestari, M.M.; Randi, M.A.F.; Oliveira-Ribeiro, C.A.; Freire, C.A. 2009. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environmental Monitoring Assessment*, 152: 209-222.
- Kennedy, C.J.; Farrell, A.P. 2005. Ion homeostasis and interrenal stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 323: 43-56.
- Kochhann, D.; Benaduce, A.P.S.; Copatti, C.E.; Lorenzatto, K.R.; Mesko, M.F.; Flores, E.M.M.; Dressler, V.L.; Baldisserotto, B. 2009. Protective Effect of High Alkalinity Against the Deleterious Effects of Chronic Waterborne Cadmium Exposure on the Detection of Alarm Cues by Juvenile Silver Catfish (*Rhamdia quelen*). *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 56.
- Kopecka-Pilarczyk, J.; Correia, A.D. 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1296-1302.

- Laurence, G.C. 1972. Comparative swimming abilities of fed and starved larval largemouth bass (*Micropterus salmoides*). . *Journal of Fish Biology*, 4: 73-78.
- Lee, R.F.; Anderson, J.W. 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 705-723.
- Little, E.E.; Archeski, R.D.; Flerov, B.A.; Kozlovskaya, V.I. 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. . *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 19: 380-385.
- Lockhart, W.L.; Duncan, D.A.; Billeck, B.N.; Danell, R.A.; Ryan, M.J. 1996. Chronic toxicity of the water-soluble fraction of Norman Wells crude oil to juvenile fish. . *Spill Science & Technology Bulletin*, 3: 259-262.
- Lüring, M.; Scheffer, M. 2007. Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 22.
- Maltby, L. 1999a. Studying stress: the importance of organism-level responses. *Ecological Applications*, 9: 431-440.
- Martin-Skilton, R.; Saborido-Rey, F.; Porte, C. 2008. Endocrine alteration and other biochemical responses in juvenile turbot exposed to the Prestige fuel oil. *Science of The Total Environment*, 404: 68-76.
- Martinez-Gomez, C.; Fernandez, B.; Valdes, J.; Campillo, J.A.; Benedicto, J.; Sanchez, F.; Vethaak, A.D. 2009. Evaluation of three-year monitoring with biomarkers in fish following the Prestige oil spill (N Spain). *Chemosphere*, 74: 613-620.
- Mathis, A.; Smith, R.J.F. 1993. Fathead minnows, *Pimephales promelas*, learn to recognize northern pike, *Esox lucius*, as predator on the basis of chemical stimuli from minnows in the pike's diet. . *Animal Behaviour*, 46: 645-656.

- Matsuo, A.Y.O.; Woodin, B.R.; Reddy, C.M.; Val, A.L.; Stegeman, J.J. 2006. Humic Substances and Crude Oil Induce Cytochrome P450 1A Expression in the Amazonian Fish Species *Colossoma macropomum* (Tambaqui). *Environmental Science and Technology*, 40: 2851-2858.
- Matz, C.J.; Patrick, H.K. 2007. Cell death, stress-responsive transgene activation, and deficits in the olfactory system of larval zebrafish following cadmium exposure. . *Environmental Science & Technology*, 41: 5143-5148.
- McKenzie, D.J.; Garofalo, E.; Winter, M.J.; Ceradini, S.; Verweij, F.; Day, N.; Hayes, R.; van der Oost, R.; Butler, P.J.; Chipman, J.K.; Taylor, E.W. 2007. Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 362: 2043-2059.
- Meager, J.J.; Batty, R.S. 2007. Effects of turbidity on the spontaneous and prey-searching activity of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 362: 2123-2130.
- Nahrgang, J.; Camus, L.; Gonzalez, P.; Jönsson, M.; Christiansen, J.S.; Hop, H. 2010. Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to dietary crude oil. *Aquatic Toxicology*, 96: 77-83.
- Neff, J.M. 1979. *Polycyclic aromatic hydrocarbon in the aquatic environment: sources, fates and biological effects*. Applied Science Publishers, London. 262pp.
- Oliveira-Ribeiro, C.A.; Fernandes, L.M.; Carvalho, C.S.; Cardoso, R.I.; Turcatti, N.M. 1999. Acute effects of mercuric chloride on the olfactory epithelium of *Trichomycterus brasiliensis*. . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31: 104-109.

- Olsen, G.H.; Sva, E.; Carroll, J.; Camus, L.; Coen, W.D.; Smolders, R.; Øveraas, H.; Hylland, K. 2007. Alterations in the energy budget of Arctic benthic species exposed to oil-related compounds. *Aquatic Toxicology*, 83: 85-92.
- Peakall, D.B. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*, 3: 157-160.
- Petrobras, 2006. Diretrizes de sustentabilidade para as atividades de exploração e produção da Petrobrás na Amazônia. (www.petrobras.com.br). Acesso: 24/06/2008.
- Petrobras, 2007. Relatório Anual 2007. (www.petrobras.com.br). Acesso: 24/06/2008.
- Petrobras, 2008. Província petrolífera de Urucu 20 anos - O desafio de produzir ouro negro na Amazônia. (<http://www2.petrobras.com.br/minisite/urucu/urucu.html>). Acesso: 24/06/2008.
- Plaut, I. 2001. Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 131: 41-50.
- Reidy, S.P.; Kerr, S.R.; Nelson, J.A. 1999. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual atlantic cod. *The Journal of Experimental Biology*, 203: 347-357.
- Rodríguez-Fuentes, G.; Gold-Bouchot, G. 2000. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research*, 50: 357-360.
- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J.A.S. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. IBAMA, Manaus. 144pp.
- Scott, G.R.; Sloman, K.A. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68: 369-392.

- Scott, G.R.; Sloman, K.A.; Rouleau, C.; Wood, C.M. 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*, 206: 1779-1790.
- Shukla, P.; Gopalani, M.; Ramteke, D.S.; Wate, S.R. 2007. Influence of Salinity on PAH Uptake from Water Soluble Fraction of Crude Oil in *Tilapia mossambica*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79: 601-605.
- Silva, A.Z.; Zanette, J.; Ferreira, J.F.; Guzenski, J.; Marques, M.R.F.; Bainy, A.C.D. 2005. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 376-382.
- Silva, C.A.; Oliveira Ribeiro, C.A.; Katsumiti, A.; Araújo, M.L.P.; Zandoná, E.M.; Costa Silva, G.P.; Maschio, J.; Roche, H.; Silva de Assis, H.C. 2009. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 400-409.
- Sismeiro-Vivas, J.; Abrantes, N.; J. L. Pereira; Castro, B.B.; Gonçalves, F. 2007. Short-Term Effects of Quirlan® (Chlorfenvinphos) on the Behavior and Acetylcholinesterase Activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental Toxicology*, 22: 194-202.
- Smith, R.J.F. 1992. Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2: 33-63.
- Smith, R.J.F. 1997. Does One Result Trump All others? A Response to Magurran, Irving and Henderson. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264: 445-450.
- Solé, M.; Lobera, G.; Aljinovic, B.; Ríos, J.; García de la Parra, L.M.; Maynou, F.; Cartes, J.E. 2008. Cholinesterases activities and lipid peroxidation levels in muscle from shelf and slope dwelling fish from the NW Mediterranean: Its potential use in pollution monitoring. *Science of the Total Environment*, 402: 306-317.

- Stephens, S.M.; Alkindi, A.Y.A.; Waring, C.P.; Brown, J.A. 1999. Corticosteroid and thyroid responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Journal of Fish Biology*, 50: 953-964.
- Sturm, A.; da Silva de Assis, H.C.; Hansen, P.-D. 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47: 389-398.
- Swanson, C. 1998. Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*). *The Journal of Experimental Biology*, 201: 3355-3366.
- Tavakoli, L.; Yamini, Y.; Ebrahimzadeh, H.; Shariati, S. 2008. Homogeneous liquid-liquid extraction for preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons using a water/methanol/chloroform ternary component system. *Journal of chromatography A*, 1196: 133-138.
- Tierney, K.B.; Baldwin, D.H.; Hara, T.J.; Ross, P.S.; Scholz, N.L.; Kennedy, C.J. 2009. Olfactory toxicity in fishes. *Aquatic Toxicology*, XXX: XXX-XXX.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1995. Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical features. Springer-Verlag, Berlin, p. 224.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1999. Volume overview: Biology of Tropical Fish. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), *Biology of Tropical Fish*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, pp. 1-4.
- Vamosi, S.M.; Schluter, D. 2002. Impacts of trout predation on fitness of sympatric sticklebacks and their hybrids. *Proceedings of the Royal Society B*, 269: 923-930.

- van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Vieira, L.R.; Sousa, A.; Frasco, M.F.; Lima, I.; Morgado, F.; Guilhermino, L. 2008. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Science of the Total Environment*, 395: 87-100.
- Vignier, V.; Vandermeulen, J.H.; Fraser, A.J. 1992. Growth and Food Conversion by Atlantic Salmon Parr during 40 Days' Exposure to Crude Oil. *Transactions of the American Fisheries Society*, 122: 322-332.
- Waser, W.; Bausheva, O.; Nikinmaa, M. 2009. The copper-induced reduction of critical swimming speed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is not caused by changes in gill structure. *Aquatic Toxicology*, 94: 77-79.
- Weis, J.S.; Smith, G.; Zhou, T.; Santiago-Bass, C.; Weis, P. 2001. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. *BioScience*, 51: 209-217.
- Weis, J.S.; Smith, G.M.; Santiago-Bass, C. 2000. Predator/prey interactions: a link between the individual level and both higher and lower level effects of toxicants in aquatic ecosystems. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 7: 145-153.
- Werner, E.E.; Anholt, B.R. 1993. Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality rates mediated by foraging activity. *The American Naturalist*, 142: 242-272.

- Xuereb, B.; Lefèvre, E.; Garric, J.; Geffard, O. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*, 94: 114-122.
- Zhou, T.; Scali, R.; Weis, S. 2001. Effects of methylmercury on ontogeny of prey capture ability and growth in three populations of larval *Fundulus heteroclitus*. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 41: 47-54.
- Zielinski, B.S.; Fredricks, K.; McDonald., R.; Zaidi, A.U. 2005. Morphological and electrophysiological examination of olfactory sensory neurons during the early developmental prolarval stage of the sea lamprey. *Journal of Neurocitology*, 34: 209-216.