

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**

**APTERONOTIDAE (PISCES: GYMNOTIFORMES)
COMO MODELO DE BIOMONITOR PARA
COMPOSTOS BTX**

GILBERTO SCHWERTNER FILHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical de Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

**MANAUS – AMAZONAS
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**

**APTERONOTIDAE (PISCES: GYMNOTIFORMES)
COMO MODELO DE BIOMONITOR PARA
COMPOSTOS BTX**

GILBERTO SCHWERTNER FILHO

Orientador: José Antônio Alves Gomes, Ph.D.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical de Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

**MANAUS – AMAZONAS
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

Schwertner, Gilberto F°

Apterotonidae (Pisces: Gymnotiformes) como modelo de biomonitor para compostos BTX. -- 2005.

xiii, 118 f..

Dissertação (mestrado)--INPA/UFAM, Manaus, 2005.

1. Peixes elétricos 2. Petróleo 3. Biomonitoramento 4. Processamento de Sinais 5. Apterotonidae 6. BTX

CDD 19. ed. 597.05

Sinopse:

Subsídios para desenvolvimento de sistema de biomonitoramento para petróleo em função dos compostos Benzeno, Tolueno e Xilenos (BTX) por meio das propriedades biofísicas das Descargas do Órgão Elétrico (D.O.Es) de peixes elétricos amazônicos da família Apterotonidae (Gymnotiformes). Capítulo 1, introdução geral; Capítulo 2 processo de seleção da espécie de Apterotonidae; Capítulo 3 compendio sobre métodos de análise e processamento de sinais para Apterotonidae; Capítulo 4 determinação do padrão “normal” das D.O.Es.; Capítulo 5 efeito dos compostos BTX sobre as D.O.Es.; nos Anexos, algoritmos utilizados para análise computacional, resumo e artigo desenvolvidos no decorrer deste estudo.

Palavras-chave: Gymnotiformes; *Apterotonotus hasemani*; Biomonitoramento; BTX.

Ao meu Filho.

In memoriam: ao meu Pai.

AGRADECIMENTOS

Em todas as “escalas temporais” agradeço à minha “baixinha” Aldi, minha “altíssima correlação!”; à minha família que de todas as formas contribuíram para pós realização; aos seres que tendem a desenvolver um vir a ser melhor; às atitudes de ação na inação!

Pelas oportunidades e “cirúrgica” orientação ao José Gomes; por mais do que aprender as diferenças entre Gymnotiformes, ao amigo David; aos colegas do LFC que entre os altos e baixos riscamos o tempo com nossos sinais. À Jaqueline pela força incondicional desde que Aldi e eu chegamos ao INPA, e aos colegas do LTBM.

Aos colegas de curso, minha “destemida” turma BADPI 2003, aos companheiros de pesca do CPBA e aos professores do PBTRN que tiveram paciência em ensinar a um Eng. Ambiental que “existem mais coisas entre um peixe frito e um peixe assado do que nem sequer imaginava em vã fisiologia”.

Ao pessoal da hora extra no Lab. 3, ou simplesmente “Bar do Carlão”!

Aos amigos do CENPRA sempre dispostos aos novos desafios, onde “o impossível só demora mais um pouco”! Muito obrigado Edgar e Sandra, Sr. Sebastião, Dr. Aristides e Prof. Roberto!

Aos meus “antigos” professores Claudemir, Rafael e TU pela importante troca de informações e incentivo.

Em especial à Dra. Ilse Walker pelos raros ensinamentos, à Dra. Elisiana P. de Oliveira por ter me apresentado o INPA e aos que construíram a história do INPA.

À FINEP, ao CNPq e à FAPEAM, pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço aos seres que de alguma forma viveram para ciência!

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.....	III
DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
ACRONÔMIOS.....	XIII
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 PETRÓLEO.....	3
1.1.1 Compostos BTX.....	5
1.2 PEIXES ELÉTRICOS	6
1.2.1 Gymnotiformes	8
1.3 PEIXES ELÉTRICOS COMO BIOMONITORES	10
1.4 OBJETIVOS	13
1.4.1 Objetivo Geral.....	13
1.4.2 Objetivos Específicos.....	13
CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO DA ESPÉCIE	14
2.1 INTRODUÇÃO	15
2.1.1 Apteronotidae.....	16
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.3 RESULTADOS.....	20
2.4 DISCUSSÃO	25

CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE SINAIS PARA APTERONOTIDAE	28
3.1 INTRODUÇÃO	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.3 RESULTADOS.....	34
3.4 DISCUSSÃO	40
CAPÍTULO 4 – DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES NORMAIS DAS DESCARGAS DOS ÓRGÃOS ELÉTRICOS (D.O.ES) DE <i>Apteronotus hasemani</i>	43
4.1 INTRODUÇÃO	44
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.3 RESULTADOS.....	48
4.4 DISCUSSÃO	54
CAPÍTULO 5 – EFEITO DOS COMPOSTOS BTX NAS D.O.ES. DE <i>Apteronotus hasemani</i>	56
5.1 INTRODUÇÃO	57
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
5.3 RESULTADOS.....	61
5.4 DISCUSSÃO	72
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO.....	78
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	96
ANEXO I.....	97
ANEXO II	106
ANEXO III.....	108

RESUMO

Apresentam-se subsídios para compor um sistema de biomonitoramento para hidrocarbonetos de petróleo por meio das propriedades biofísicas das descargas dos órgãos elétricos (D.O.Es.) de peixes elétricos da Amazônia (Gymnotiformes). Utilizando-se das propriedades de estabilidade das D.O.Es. do órgão elétrico neurogênico dos peixes da família Apterontidae, avaliou-se, entre espécies de maior captura nas proximidades de Manaus – AM, uma espécie de Apterontidae para estudos sobre biomonitoramento. Por meio de amplo estudo para o estabelecimento de critérios sobre processamento e de análise dos sinais das D.O.Es. de Apterontidae foram desenvolvidos algoritmos específicos para MatLab[®], utilizando-se os *toolboxes* *Wavelet* e *CRP* (NDG Univ. Potsdam). Além do tradicional espectro de densidade baseado na transformada de Fourier, foram utilizados a transformada de ondeletas (*Wavelet's*) e as análises de recorrência. A espécie de Apterontidae escolhida para o estudo foi *Apterontus hasemani*, para a qual foi estabelecido um padrão “normal”. A partir do padrão “normal” estipulou-se critério para avaliar a detecção de diferentes concentrações de BTX (2, 10, 20 e 100 mg/L) por espécimes de *A. hasemani*, considerando-se que da fração solúvel do petróleo, os compostos BTX (benzeno, tolueno e xilenos) são mais tóxicos e menos hidrofóbicos. Com a metodologia utilizada foi possível inferir sobre a detecção positiva de BTX por espécimes de *A. hasemani* a partir de 10 mg/L.

ABSTRACT

Herein, we presenting subsidies to build an oil hydro-carbon biomonitoring system based in the biofisic characteristics of the electric organ discharges (EODs) of the Amazonian electric knifefishes (Gymnotiformes). Using the EODs proprieties, one species of the Apterontidae family was selected to biomonitoring studies, among those more abundant species that inhabit rivers in the surrounding Manaus-AM. The study of apteronotids EODs allowed the confection of specifics algorithms to MatLab[®] (*toolboxe's Wavelet,s* and *CRP* - NDG Univ. Potsdam). Wavelet's and recurrence analyses were utilized, in addition to the traditional method of spectrum density based in the fast fourrier transformation (FFT). *Apterontus hasemani* was the species elected, and it waveform standard patterns were established. Using the waveform standard patterns a method was established to detect different concentrations of BTX (2, 10, 20 e 100 mg/L) for each specimen of *A. hasemani*. Considering that the water soluble fraction of the oil, the composites of BTX (benzene, toluene and xylenes) are more toxics and less hidrophobics. Using this methodology was possible to infer on the positive detection of BTX for specimens of *A. hasemani* with the minimal concentration of 10 mg/L.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 01 – Relação Família / Sinal / Eletrócito.....	11
TABELA 02 - Estabilidade das D.O.Es. das espécies estudadas.	22
TABELA 03 - Exemplo de valores de RQA para <i>A. hasemani</i>.....	41
TABELA 04 – Valores médios das D.O.Es.	51
TABELA 05 – CV das D.O.Es.	51
TABELA 06 – CV das D.O.Es.	51
TABELA 07 – CRQA para “NORMAL” de <i>A. hasemani</i>.	54
TABELA 08 – Média e DP da CRQA para “NORMAL” de <i>A. hasemani</i>.	55
TABELA 09 – Análise das frequências fundamentais das D.O.Es.....	63
TABELA 10 – Análise das frequências fundamentais das D.O.Es.....	63
TABELA 11 – CRQA para “NORMAL” (-9’ e -3’).	72
TABELA 12 – Valores do desvio padrão CRQA da “NORMAL”.....	72
TABELA 13 – CRQA para período pós-contaminação (0’ e 180’).	72
QUADRO 01 – Composição físico-químicos das águas do poço do INPA-I.....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Compostos BTX.....	5
Figura 02 – Distribuição de Peixes Elétricos.....	8
Figura 03 – Imagem orbital LANDSAT7/231.62/27/08/01	18
Figura 04 – Aquisição de sinal via Fluke Scopemeter.....	20
Figura 05 – Sinal de <i>A. clarkae</i>	20
Figura 06 – Sinal de <i>A. albifrons</i>	20
Figura 07 – Sinal de <i>A. bonapartii</i>	21
Figura 08 – Sinal de <i>A. hasemani</i>	21
Figura 09 – Sinal de <i>S. schotii</i>	21
Figura 10 – Sinal de <i>A. terminalis</i>	21
Figura 11 – Sinal de <i>A. porcinum</i>	21
Figura 12 – Gráfico das variações das D.O.Es. avaliadas por 15' para sete diferentes espécies.....	22
Figura 13 – Monitoramento de D.O.Es. em 24 horas para 4 espécies de apteronotídeo.....	22
Figura 14 – Monitoramento de D.O.Es. em 24 horas para <i>A. hasemani</i> e <i>A. bonapartii</i>	23
Figura 15 – <i>Apteronotus hasemani</i>	24
Figura 16 – Análise espectral transformada de Fourier e transformada <i>Wavelet</i> de dois sinais.....	31
Figura 17 – Gráficos de VRA para diferentes tipos de sinais.....	32
Figura 18 – Gráfico de CR entre diferentes sinais.....	32
Figura 19 – Exemplo de gráfico de autocorrelação, <i>software</i> Dataplore®.....	34
Figura 20 – A. Gráfico de AVR para sinal e B. gráfico de AVR para sinal filtrado.....	35
Figura 21 – Gráfico da avaliação MI – no valor 10 = mínima correlação.....	36
Figura 22 – Gráficos para determinação do valor de dimensão. A. <i>delay</i> = 1; B. <i>delay</i> = 10.....	36
Figura 23 – Gráfico de PSD concatenando para 13 sinais de um espécime de <i>A. hasemani</i>	37
Figura 24 – Gráfico do sinal “1” (A.) e PSD (B.) de <i>A. hasemani</i>	37
Figura 25 – Gráfico de CWT – db8 para sinal “1”.....	37
Figura 26 – AR para sinal “1”, <i>delay</i> = 1(A.) e AR para sinal “1”, <i>delay</i> = 10 (B.).....	38
Figura 27 – Gráfico do sinal “1” filtrado (A.) e PSD (B.).....	38
Figura 28 – Gráfico de CWT db8 para sinal “1” filtrado.....	39

Figura 29 – Gráfico de AVR para sinal “1” filtrado.....	39
Figura 30 – AVR de sinal filtrado <i>A. hasemani</i> em diferentes temperaturas (28, 26, 24 e 22 °C).	39
Figura 31 – <i>Wavelet's</i> de <i>A. hasemani</i> em diferentes temperaturas (28 e 22 °C inf.).....	40
Figura 32 – Esquema dos procedimentos de aquisição e processamento das D.O.Es.	47
Figura 33 – Gráfico da relação D.O.E./ Δ temperatura para <i>A. hasemani</i>	48
Figura 34 – Sinal a 27 °C (A.) e a 22 °C (B.) de <i>A. hasemani</i> fêmea.....	48
Figura 35 – Gráfico do espectro do sinal de <i>A. hasemani</i> fêmea tempo/ Δ temperatura.	49
Figura 36 – Gráfico das freqüências instantâneas das D.O.Es. para grupo I.	51
Figura 37 – Gráfico sinal inicial (A.), final (B.), PSD (C.) e CRP (D.) de <i>A. hasemani</i> 1 grupo I.....	51
Figura 38 – Gráfico sinal inicial (A.), final (B.), PSD (C.) e CRP (D.) de <i>A. hasemani</i> 2 grupo I.....	52
Figura 39 – Gráfico das freqüências instantâneas das D.O.Es. para grupo II.....	52
Figura 40 – Gráfico sinal inicial (A.), final (B.), PSD (C.) e CRP (D.) <i>A. hasemani</i> 1 grupo II.	53
Figura 41 – PSD peixe 2 10mg/L BTX... ..	63
Figura 42 – PSD peixe 1 20mg/L BTX.	63
Figura 43 – PSD peixe 5 100mg/L BTX.	63
Figura 45 – PSD peixe 4 100mg/L BTX/etanol.	64
Figura 46 – Sinal “normal” (aos 9’ pré-contaminação – A.) e aos 9’ pós-contaminação (B.).....	64
Figura 47 – PSD concatenado para sinais filtrados.	65
Figura 48 – AR 9’ pré-contaminação (A.) e AR 180’ pós-contaminação (B.) (delay = 1).....	65
Figura 49 – AR 9’ pré-contaminação (A.) e AR 180’ pós-contaminação (B.) (delay = 10).....	66
Figura 50 – <i>Wavelet</i> para sinal 9’ pré-contaminação.....	66
Figura 51 – <i>Wavelet</i> para sinal 9’ pós-contaminação.	67
Figura 52 – <i>Wavelet</i> para sinal 180’ pós-contaminação.	67
Figura 53 – Variações na freqüência	67
Figura 54 – PSD para o sinal (A.) e PSD para sinal filtrado (B.) (peixe 6 100 mg/L).	69
Figura 55 – AR 9’ pré-contaminação (A.) e AR 180’ pós-contaminação (B.).	69
Figura 56 – CRP “normal” (-9’ e -3’) (A.)	69
Figura 57 – CRP entre -9’ e 9’ (A.) e CRP entre -9’ e 66’ (B.).....	70

ACRONÔMIOS

BTX: Compostos Benzeno (C_6H_6), Tolueno ($C_6H_5CH_3$) e isômeros *o*-, *m*- e *p*-xileno (C_8H_{10}).

D.O.E.: Descarga do Órgão Elétrico.

FFT: Transformada rápida de Fourier, do inglês, *Fast Fourier Transform*.

PSD: Espectro de densidade, do inglês, *Power Spectrum Density*.

STFT: Transformada de Fourier de curto tempo, do inglês, *Short Time Fourier Transform*.

VRA: Análise visual de recorrência, do inglês, *Visual Recurrence Analises*.

AR: Análise de recorrência.

CRP: Gráficos de *cross*-recorrência (recorrência entre dois sinais), do inglês, *Cross Recurrence Plots*.

CRQA: Análise quantitativa de *cross*-recorrência, do inglês, *Cross Recurrence Quantitative Analises*.

DP: Desvio padrão.

CV: Coeficiente de variação (desvio padrão/média)

VCR: Do inglês, *video cassette record*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por hidrocarbonetos do petróleo é uma preocupação permanente. Com o acentuado incremento na utilização de combustíveis fósseis, a partir da segunda metade do Século XX, os riscos ambientais associados a toda cadeia produtiva do petróleo, desde a extração, o transporte, o beneficiamento até o consumo, aumentaram consideravelmente. E apesar dos riscos ambientais, a crescente demanda energética mundial força os países em desenvolvimento a maximizarem a exploração de seus recursos energéticos, como o petróleo, por razões econômicas, políticas e estratégicas.

Na Amazônia, grandes reservas de petróleo e gás natural começaram a serem exploradas nas últimas décadas. Na província de Urucu, cerca de 60.000 barris de petróleo são produzidos por dia, em mais de 50 poços de perfuração (Val & Almeida-Val, 1999; PETROBRAS, 2003). Os possíveis impactos ambientais negativos associados aos acidentes envolvendo petróleo na região amazônica são de grandes proporções sinérgicas, principalmente quanto ao ambiente aquático. Esta ação impactante é agravada pela dinâmica do ambiente amazônico, pela complexidade ecossistêmica, pelo endemismo de espécies biológicas e, também, pela negativa repercussão mundial.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2000) reconhece a insuficiência e ineficácia de resposta diante aos problemas ambientais com hidrocarbonetos e, em alguns casos, a dificuldade de implantar as ações necessárias para evitar possíveis problemas ambientais.

Diante da problemática do petróleo e derivados, o que versa neste trabalho oportuniza subsídios para uma nova alternativa ao monitoramento ambiental. No Capítulo 2 é apresentado o processo de escolha da espécie alvo para compor este

estudo. No Capítulo 3 foi desenvolvido um compêndio de técnicas que envolvem a análise dos sinais de peixes elétricos e, também, é apresentada duas novas técnicas de processamento de sinais que ainda não foram utilizadas para avaliar sinais de peixes elétricos. O Capítulo 4 contém os procedimentos para determinação de um padrão das descargas dos órgãos elétricos (D.O.Es.) para espécie de peixes elétricos estudada. E, no Capítulo 5 é apresentado o processo de estudo dos efeitos de BTX nas D.O.Es. dos peixes elétricos avaliados. No Anexo estão os algoritmos desenvolvidos para o processamento dos sinais (*m-files* para o MatLab[®]), resumo e artigo desenvolvidos no decorrer deste estudo. No corrente Capítulo há uma breve explanação sobre diferentes aspectos epistemológicos, no sentido de minimizar divergências dos temas de complexidade particular envolvidos nesta pesquisa: do petróleo aos peixes elétricos da Amazônia.

1.1 Petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos onde se encontram compostos com diferentes propriedades físico-químicas e com diferentes perfis ecotoxicológicos (CONCAWE, 1992; Manahan, 2000; Baird, 2002). Os hidrocarbonetos constituintes do petróleo são hidrofóbicos e conseqüentemente possuem baixa solubilidade em água. Porém, os de menor peso molecular, podem ser miscíveis em água e, assim, constituem a chamada fração solúvel em água (*WSF – water soluble fraction*) (CONCAWE, 2002).

O grupo de hidrocarboneto(s) mais abundante encontrado no petróleo geralmente é a série de alcanos, que podem ser genericamente designados pela fórmula C_nH_{2n+2} . Estas moléculas variam grandemente, incluindo desde o simples metano (C_2H_6) até moléculas constituídas por quase uma centena de carbonos (Baird,

2002). O petróleo também contém quantidades substanciais de cicloalcanos, principalmente com cinco ou seis carbonos por anel, como os sistemas C₆H₁₂ e vários hidrocarbonetos aromáticos, principalmente benzeno e seus derivados simples, ou nos quais, um ou mais átomos de hidrogênio foram substituídos por grupos metila ou etila (Manahan, 2000; Baird, 2002).

Além dos hidrocarbonetos, o petróleo contém certa quantidade de compostos de enxofre, sulfeto de hidrogênio gasoso (H₂S) e compostos orgânicos que são análogos a álcoois e ésteres, nos quais o átomo de enxofre substitui o oxigênio e pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo oxigênio ou nitrogênio (CONCAWE, 1988; Manahan, 2000; Baird, 2002).

Os compostos aromáticos benzeno, tolueno e isômeros *orto*, *meta* e *para*-xilenos, também conhecidos como compostos BTX, constituem a parcela mais tóxica do petróleo (Baird, 2002).

Levando-se em consideração que o petróleo proveniente da província de Urucu, no estado do Amazonas, contém cerca de 75% de compostos hidrocarbonetos e que, destes, 13,2% a 15% são compostos aromáticos (Brauner *et al.*, 1999), estudos relacionados com a detecção e prevenção das contaminações ambientais por estes compostos são extremamente necessários, e neste caso, especialmente os estudos voltados para ambientes amazônicos. E, se considerando que da fração solúvel em água, os compostos aromáticos são os mais tóxicos aos organismos aquáticos, principalmente aos peixes, a atividade petrolífera na Amazônia é um risco em potencial.

1.1.1 Compostos BTX

Os problemas de maior complexidade ambiental relacionados ao petróleo são atribuídos aos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno (C_6H_6), tolueno ($C_6H_5CH_3$) e xilenos (C_8H_{10}) – os compostos BTX (figura 01), que são, dos constituintes aromáticos do petróleo, os mais solúveis e com o maior potencial de mobilização na água (ASTDR, 1993; ASTDR, 1997; Corseuil & Fernandes, 1999; ASTDR, 2000).

Dentre os compostos BTX, o benzeno é considerado o mais tóxico e o mais solúvel em água (CONCAWE, 1992; ASTDR, 1997). E, além disto, a complexidade dos problemas ambientais associados aos compostos BTX é aumentada com a inclusão de compostos oxigenados em combustíveis derivados de petróleo, como por exemplo, o etanol e o MTBE (metil terc-butil éter), que aumentam o fator de co-solvência destes contaminantes orgânicos hidrofóbicos (Corseuil & Fernandes, 1999; CONCAWE, 2002).

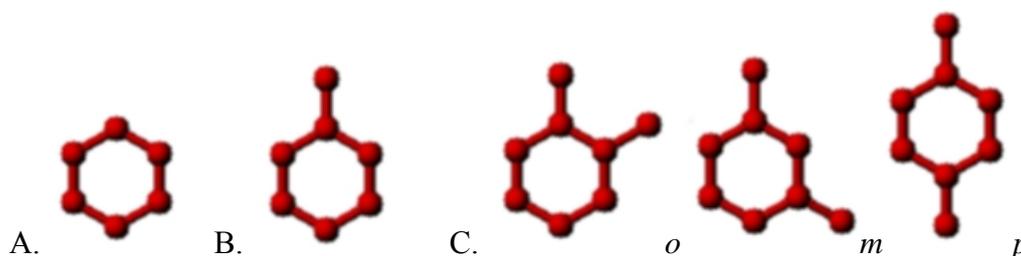


Figura 01 – Compostos BTX.

A. benzeno (C_6H_6); B. tolueno ($C_6H_5CH_3$); C. isômeros *o*-, *m*- e *p*-xileno (C_8H_{10}) (figura produzida por meio do *software* ACDLabs 5.0).

Particularmente, os compostos de baixo peso molecular como os benzenos, toluenos e xilenos, podem afetar o sistema nervoso central em vertebrados. Se a exposição a estes compostos for suficientemente alta, pode acarretar em morte. Há registros de que o benzeno causa câncer (leucemia) (ATSDR, 1999), sendo classificado no Grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer, como cancerígeno para humanos. Outros compostos oriundos de produtos de petróleo, como

por exemplo, o benzo[*a*]pireno e a gasolina, são considerados como prováveis e possíveis carcinogênicos para humanos (Grupos 2A e 2B, respectivamente) (IARC, 2003).

Considerando-se a pluma de dispersão do petróleo em matrizes ambientais aquáticas, para desenvolver um sistema que alerte sobre possíveis contaminações por petróleo, estudou-se os elementos da fração solúvel do petróleo que possuem maior potencial de dispersão (que “chegam primeiro”), e, o interessante, é que estes compostos também são os mais tóxicos do petróleo: os compostos BTX.

1.2 Peixes Elétricos

Muitos animais aquáticos têm a habilidade de sentir pequenos campos elétricos. Esta sensibilidade elétrica é encontrada em diversas espécies de peixes marinhos e de águas doce. Por exemplo, os peixes Siluriformes são capazes de detectar campos elétricos com gradientes menores que 1 microVolt por centímetro; os tubarões e as arraias marinhos são sensíveis a gradientes elétricos menores que 5 nanoVolts por centímetro (Bastian 1994). Órgãos especializados na detecção de campos elétricos na água (eletroreceptores) estão presentes em uma grande diversidade de organismos aquáticos. Em vertebrados, a capacidade de detecção de campos elétricos está presente nos peixes agnatas (lampreias e peixe-bruxa), em todos elasmobrânquios (quimeras, raias e tubarões) nos sarcopterígeos (Lepidosireniformes e Coelacanthiformes), actinopiterígeos (nos condrósteos e alguns teleósteos) e em pelo menos uma linhagem dos anfíbios (Bullock *et al.*, 1979; Bullock & Heiligenberg, 1986; Heiligenberg, 1993; Moller, 1995; Alves-Gomes, 1999; Alves-Gomes, 2001; Rose, 2004).

Dentre os peixes eletrosensitivos, alguns grupos desenvolveram órgãos eletrogênicos, órgãos especializados em produzir descargas elétricas: nos elasmobrânquios as arraias das famílias Rajidae e Torpedinae, os teleósteos marinhos da família Astroscopidae, os teleósteos africanos de água doce das famílias Malapteruridae, Mormyridae e Gymnarchidae, e, os teleósteos Neotropicais da Ordem Gymnotiformes (Bullock *et al.*, 1979; Heiligenberg, 1993; Moller, 1995; Alves-Gomes, 1999; Alves-Gomes, 2001). Estas descargas do órgão elétrico (D.O.E.) ocorrem de diferentes maneiras nos diferentes peixes elétricos (figura 2): existem os peixes elétricos com D.O.Es. de alta voltagem (fortes) e intermitentes, como por exemplo, as arraias marinhas *Torpedo* (220 V), os bagres do Nilo *Malapterurus* (350 V) e a enguia elétrica (ou o famoso puraquê, da Amazônia) *Electrophorus* (+ 600 V); e, há também os peixes elétricos de baixa voltagem com descargas intermitentes (em forma de pulso) ou contínua (em forma de onda), como por exemplo, as arraias marinhas do gênero *Raja* (mV – pulso), os peixes elétricos africanos das famílias Mormyridae (mV – pulso) e Gymnarchidae (mV – onda) e os peixes elétricos da América do Sul e Central (excetuando-se o puraquê) também conhecidos popularmente como sarapós e ituíis que descarregam em forma de pulso e onda (Moller, 1995; ver tabela 01).

A partir da década de 1950 com a descoberta das descargas elétricas fracas produzidas por alguns peixes elétricos, os estudos sobre eletrorrecepção e eletrogênese prosperaram rapidamente (Moller, 1995; Hopkins, 1995; Zakon & Unguez, 1999; Bullock, 1999). Existem muitos trabalhos e pesquisas em andamento sobre as mais variadas áreas do conhecimento envolvendo peixes elétricos, incluindo ecologia, neurofisiologia e robótica. Fontes adicionais sobre pesquisas com peixes

elétricos podem ser encontradas em Moller (1995), Bullock (1999), Bullock & Heiligenberg (1986), Moller (2002) e Bleckmann *et al.* (2004).

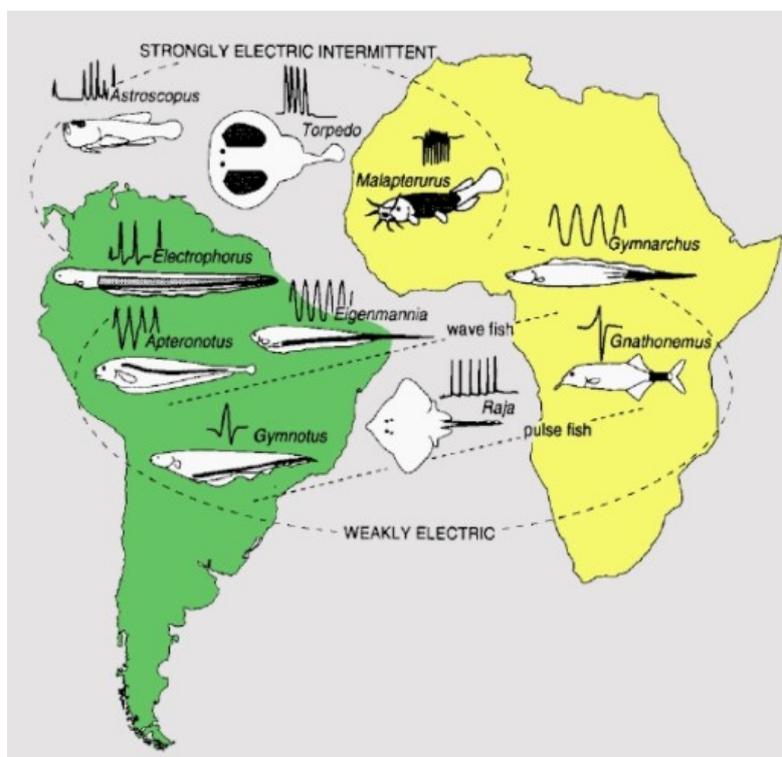


Figura 02 – Distribuição de Peixes Elétricos (Moller, 1995).

1.2.1 Gymnotiformes

A Ordem dos peixes Gymnotiformes tem uma distribuição Neotropical e compreende cerca de 140 espécies (Mago-Leccia, 1994; Albert, 2003; de Santana, 2003; de Santana *et al.*, 2004; de Santana & Maldonado-Ocampo, 2004), divididas em sete famílias (Alves-Gomes *et al.*, 1995; Alves-Gomes 1997; Alves-Gomes, 1998).

Os Gymnotiformes representam uma fração considerável da ictiofauna bentônica dos rios Neotropicais (Barlettta, 1995; Cox-Fernandes, 1995; Crampton, 1996; Cox-Fernandes *et al.*, 2004), representando, por exemplo, cerca de 86 % da biomassa em alguns pontos na calha do rio Orinoco (Marrero & Taphorn, 1991) e 27 a 80 % em regiões do médio rio Negro (Garcia, 1995), embora, compreendam

aproximadamente 4% da diversidade total de peixes Neotropicais de Água Doce (Val & Val, 1995).

Os Gymnotiformes são popularmente conhecidos como “peixes elétricos” pela capacidade de produzirem corrente elétrica alternada (Chagas & Carvalho, 1961; Bennett, 1971). As características biofísicas (forma de onda, amplitude, taxa de repetição e frequência espectral) das D.O.Es., além de serem espécie-específicas (Hopkins & Heiligenberg, 1978; Heiligenberg & Bastian, 1980), podem variar intra-especificamente, entre os sexos, especialmente durante o período reprodutivo (Hopkins & Heiligenberg, 1978). As D.O.Es. também podem ser relacionadas com a composição físico-química da água onde o peixe se encontra (Pimentel-Souza, 1988; Pimentel-Souza & Siqueira, 1992; Thomas *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998; Schwertner & Alves-Gomes, 2003). Os sinais eletromagnéticos gerados podem ser gravados e acompanhados através de equipamentos eletrônicos apropriados. Como consequência, a descarga do órgão elétrico (D.O.E.) também é utilizada como ferramenta na determinação de estados fisiológicos e bioquímicos destes peixes (Hagedorn & Heiligenberg, 1985; Bullock & Heiligenberg, 1986; Franchina, 1997; Stodard, 1999), o que a torna um excelente modelo experimental.

A presença de elementos tóxicos na água pode causar alteração nas D.O.Es. tanto pela mudança da condutividade da água (Lei de Ohm), quanto pela ação indireta do poluente no metabolismo do peixe. Em outras palavras, pelo fato da D.O.E. refletir estados comportamentais e fisiológicos do peixe, espécies da ordem Gymnotiformes são apropriadas para serem utilizadas como biomonitores.

De acordo com o padrão temporal das D.O.Es. os Gymnotiformes podem ser subdivididos em dois grandes grupos: peixes pulsadores e peixes onduladores (Kirschbaum, 1995; Alves-Gomes, 1997). Do ponto de vista embriológico e

evolutivo, há dois tipos de órgão elétrico: nos órgãos miogênicos os eletrócitos (unidade celular do órgão elétrico) são de origem muscular, enquanto nos órgãos neurogênicos os próprios neurônios funcionam como eletrócitos (tabela 01).

O órgão elétrico dos Gymnotiformes é derivado de células musculares que perderam a capacidade de contração, mas que ainda disparam potenciais de ação da ordem de 100-120 milésimos de Volt (Chagas & Carvalho 1961). Segundo Crampton (1998a), pela observação da diversidade dos sinais, os peixes elétricos com sinais tipo onda podem ter uma demanda energética total menos flexível, tornando-se mais sensíveis às mudanças ambientais.

Tabela 01 – Relação família / sinal / eletrócito.

FAMÍLIA	TIPO DE SINAL	ELETRÓCITO
APTERONOTIDAE	Onda	Neurogênico
EIGENMANNIIDAE	Onda	Miogênico
STERNOPYGIDAE	Onda	Miogênico
RHAMPHICHTHYIDAE	Pulso	Miogênico
HYPOPOMIDAE	Pulso	Miogênico
GYMNOTIDAE	Pulso	Miogênico
ELECTROPHORIDAE	Pulso	Miogênico

1.3 Peixes Elétricos como Biomonitorios

A idéia da utilização de peixes elétricos para detecção de substâncias químicas na água não é nova. Grove & Moller (1979) estudaram as variações nas D.O.Es. de *Brienomyrus niger* (Mormyriiformes) pelo efeito de dois inseticidas comerciais: Dieldrin e Malathion. Geller (1984) estudou alterações causadas por mercúrio, cobre, cianeto e arsênico nas D.O.Es. do peixe elétrico africano *Gnathonemus petersi* (Mormyriiformes). Estes autores foram os primeiros a mostrar

que era possível usar peixes elétricos como indicador biológico em sistemas aquáticos.

Subseqüentemente, outros autores estudaram a influência de vários outros fatores físico-químicos também no comportamento elétrico de *Gnathonemus*. Kunze e Wezstein (1987) testaram as drogas dopaminérgicas apomorfina e haloperidol, Lewis & Kay (1991) estudaram o efeito da temperatura e Lewis *et al.* (1992a) o efeito do pH. Seguiram-se estudos com cianeto (Lewis *et al.* 1992b), com os pesticidas Atrazina e Lindane (Lewis *et al.* 1993), com níveis de poluição da água (Kai & Lewis, 1993), com os metais pesados cádmio, cromo e cobre (Lewis *et al.* 1994), e com óxido de tributiltina, amônia, nitrato, e fosfato (Lewis *et al.* 1995). Estes trabalhos mostraram que *Gnathonemus* muda a sua D.O.E. perante a presença de doses baixas de poluentes, mas a interpretação dos resultados encontrados por estes trabalhos é problemática pela inadequação da descarga de *Gnathonemus*.

Ao contrário dos apteronotídeos, *Gnathonemus* e a maioria dos peixes elétricos africanos (que evolutivamente são bastante distantes dos peixes elétricos neotropicais, Alves-Gomes, 2001) descarregam seus órgãos elétricos de uma forma muito irregular. Sob condições normais e com água de boa qualidade, *Gnathonemus* pode variar sua descarga entre 20 e 200 vezes por segundo. A frequência da D.O.E. varia demasiadamente devido aos fatores exógenos, como por exemplo, presença de alimentos, distúrbios visuais e estresse devido aos ruídos do ambiente (Kai & Lewis, 1993). A variabilidade natural da frequência da D.O.E. em Mormyriiformes representa um problema para sistemas de biomonitoramento. Assim, sempre houve uma dificuldade de se estabelecer os ritmos basais do peixe, e determinar a partir de que ponto a mudança no ritmo de descarga era devido aos poluentes testados.

Thomas *et al.* (1996a; 1996b) percebendo esta inadequação da descarga de *Gnathonemus* para o propósito de biomonitoramento, testaram a influência de cianeto de potássio nas D.O.Es. de *Apteronotus albifrons* (Gymnotiformes, Apterontidae). Pimentel-Souza & Siqueira (1992) e Thomas *et al.* (1997; 1998), propuseram a utilização de *Apteronotus albifrons* para compor um possível sistema de biomonitoramento em tempo real por meio de análise das frequências das D.O.Es..

Thomas (2000) apresenta um sistema integrado de acompanhamento da qualidade de água em tempo real com sensores analíticos para parâmetros físico-químicos associados a um sistema de análise computadorizado com *Apteronotus albifrons*.

O desenvolvimento de sistemas de biomonitoramento com Gymnotiformes necessita de mais estudos e investigações. Principalmente estudos relacionados à família Apterontidae, simplesmente pelo fato de existirem mais de 40 espécies de apteronotídeos na Amazônia (Alves-Gomes, 1997), aumentando as probabilidades, que dentre estas, existam espécies com características particulares para compor estudos novos e específicos sobre a detecção de poluentes na água. E também, ainda não foram conduzidos estudos com apteronotídeos como biomonitores para hidrocarbonetos de petróleo, indo de encontro das mais recentes diretrizes de proteção ambiental no Amazonas, reforçando a idéia de se utilizar “tecnologia amazônica” para proteger a Amazônia.

O presente trabalho foi conduzido para contribuir no desenvolvimento de um sistema de biomonitoramento ou de alerta ambiental para proteção de matrizes ambientais aquáticas por meio das propriedades biofísicas das D.O.Es de peixes elétricos da Amazônia Brasileira. Enfatizando o monitoramento de contaminações por

petróleo nos ambientes aquáticos em função da detecção de compostos BTX por peixes da família Apterontidae.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é contribuir para o desenvolvimento de um sistema de biomonitoramento determinando, pela análise das D.O.E.s, a capacidade dos apteronotídeos em detectar a presença de compostos BTX na água, e qual o efeito de diferentes concentrações nas D.O.E.s destes peixes.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Selecionar uma espécie de apteronotídeo em função da estabilidade das descargas elétricas e adaptabilidade ao cativeiro;
- Contribuir para a elaboração de um modelo computacional para qualificar apteronotídeos como biomonitores;
- Determinar o padrão “normal” de descarga da espécie selecionada em água padronizada (branco);
- Determinar as alterações nas D.O.E.s da espécie selecionada em função da variação da concentração de compostos BTX na água.

CAPÍTULO 2

SELEÇÃO DA ESPÉCIE

2.1 Introdução

Para compor estudos que fomentem desenvolver um sistema de biomonitoramento com peixes elétricos da Amazônia (Gymnotiformes), procurou-se utilizar peixes com maior estabilidade das D.O.Es., com sensibilidade às variações ambientais e com possibilidade de serem capturados nas proximidades de Manaus – AM. Dentre as sete famílias de Gymnotiformes, a família alvo foi a Apterontidae.

Fez-se necessária a seleção de apenas uma espécie de apteronotídeo para o presente estudo. Os principais requisitos avaliados para esta seleção foram: a estabilidade das descargas elétricas, a adaptabilidade ao cativeiro e a frequência de captura.

Dentre as espécies de apteronotídeos existentes, é conhecida a resistência em ambientes artificiais de *A. albifrons*, espécie de apteronotídeo explorada para aquarifilia e, em função destas condicionantes é a espécie de apteronotídeo da Amazônia mais estudada [veja, por exemplo, os trabalhos de Bastian (1981a; 1981b); Pimentel-Souza (1988); Pimentel-Souza & Siqueira (1992); Thomas *et al.* (1996a; 1996b); Thomas *et al.* (1997; 1998); Mortgat *et al.* (1998); Nelson & MacIver (1999); Assad *et al.* (1999); Thomas (2000); MacIver & Nelson (2000; 2001); MacIver (2001); Nelson *et al.* (2002); e MacIver *et al.* (2004)]. Porém, esta espécie não ocorre comumente nos habitats próximos à Manaus e sua captura é restrita às épocas de seca. Utilizou-se *A. albifrons* como um referencial para este estudo. E também, dentre as possibilidades de estudos em função da diversidade de espécies de Apterontidae existentes na Amazônia, buscou-se conhecer um pouco mais sobre outras espécies.

2.1.1 Apteronotidae

A família Apteronotidae é a mais diversa e numerosa na ordem Gymnotiformes com 47 espécies descritas e inúmeras a serem descritas (Mago-Leccia, 1994; Alves-Gomes, 1997; de Santana, 2002; Albert, 2003; de Santana, 2003; de Santana *et al.*, 2004; de Santana & Maldonado-Ocampo, 2004). A característica fundamental que difere esta família dos outros Gymnotiformes é a presença da nadadeira caudal (Mago-Leccia, 1994; Cox-Fernandes, 1995; Albert, 2003).

Os apteronotídeos utilizam as D.O.Es. para interagir com o ambiente, seja para localização (eletrolocalização) (Bullock *et al.*, 1979; Rasnow *et al.*, 1993; Bastian 1994; Rasnow, 1996; Rasnow & Bower, 1996; Nelson & MacIver, 1999; Assad *et al.*, 1999; MacIver & Nelson, 2000; 2001; MacIver, 2001; Nelson *et al.*, 2002) ou para comunicação (eletrocomunicação) (Knudsen, 1974; 1975; Bullock *et al.*, 1979; Hagedorn & Heiligenberg, 1985; Bastian, 1994).

Família Apteronotidae tem a peculiaridade de ser a única que possui órgãos elétricos neurogênicos. Estes órgãos são os resultados de uma novidade evolutiva a partir de órgãos miogênicos, uma vez que há uma degeneração da parte miogênica do órgão já nos primeiros estágios após eclosão do ovo, com a conseqüente especialização dos neurônios que inicialmente o enervaram, que se tornam o próprio órgão elétrico (Kirschbaum, 1983). Os órgãos neurogênicos possuem frequências de descarga bem mais altas do que os órgãos miogênicos, porque todas as sinapses envolvidas na D.O.E. de um órgão neurogênico são elétricas (Bullock *et al.*, 1979).

Em função do órgão neurogênico, esta família contém as únicas espécies que produzem D.O.Es. em frequências altas, podendo chegar além de 2000 Hz (Alves-Gomes, 1997), com coeficientes de variação (Desvio Padrão/Média) da ordem de 0,0002 segundos ($2 \cdot 10^{-4}$ s) (Mortgat *et al.*, 2000). Até o momento, *Orthosternarchus*

tamandua (Boulenger) apresenta a frequência das D.O.Es. mais baixa já registrada para esta família com seus 421 Hz, enquanto *Magosternarchus raptor* Lundberg, Cox-Fernandes & Albert e *Sternarchella schotti* (Steindachner) tem as mais altas frequências das D.O.Es. já registradas, de 1969 Hz e de 2179 Hz, respectivamente (Crampton & Albert, *in press*).

Os peixes da família Apterontidae são os osciladores biológicos mais estáveis que se conhece (Alves-Gomes, 2001), o que lhes confere uma vantagem adicional para estudos de biomonitoramento (Schwertner & Alves-Gomes, 2003).

2.2 Material e Métodos

Os peixes avaliados foram capturados em excursões de campo, utilizando-se rede de cerco com malha de 0,5 cm entre nós e rapichés. A detecção das espécies alvo no campo ocorreu por meio de equipamento de detecção de D.O.Es., que consiste em um amplificador/conversor portátil, com eletrodo acoplado em uma haste de madeira, o qual converte as D.O.Es. em som. Pela ocorrência e diferença de sons, de acordo com as frequências das D.O.Es., pode-se localizar os indivíduos no ambiente natural e a captura se torna mais objetiva e seletiva.

As excursões de campo foram baseadas no Flutuante do INPA Harald Sioli, situado no complexo de Lagos do Catalão na Ilha Xiborena, Iranduba – AM. As capturas ocorreram em diversos ambientes (água branca e água preta) próximos de Manaus – AM: os locais de captura mais frequentes foram a Ilha Marchantaria, o Paraná da Xiborena e a Costa da Terra Nova (figura 03).

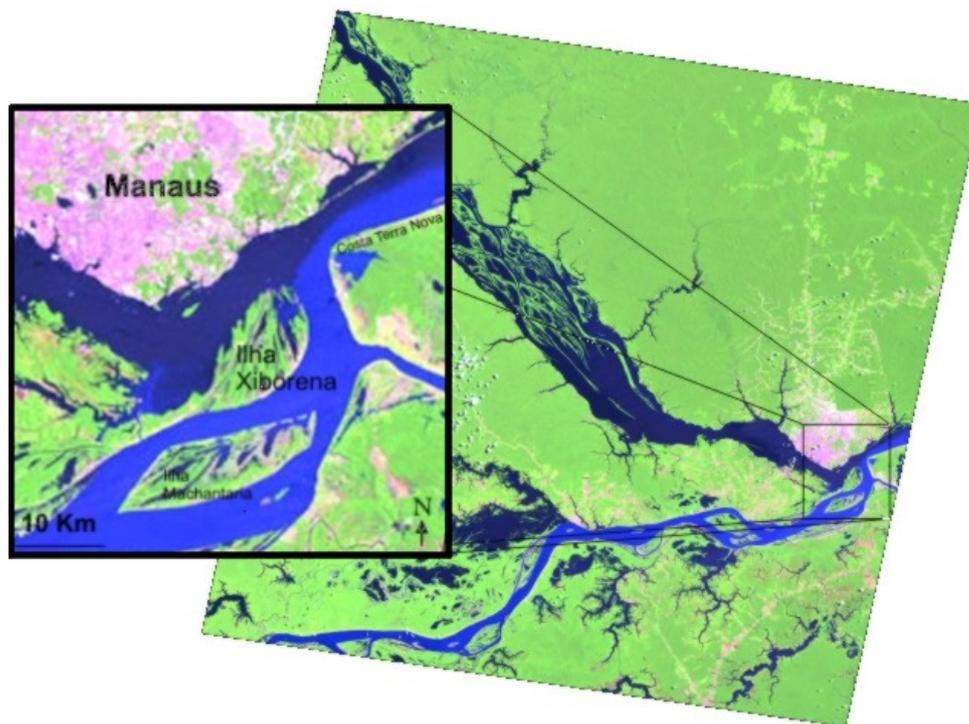


Figura 03 – Imagem orbital LANDSAT7/231.62/27/08/01

(fonte: www.inpa.gov.br/siglab. Detalhe: região de coleta entre as coordenadas geográficas: 059°56'45" W / 059°48'55" W e 03°04'55" S / 03°14'55" S).

Os animais capturados foram levados para o Laboratório de Fisiologia Comportamental – LFC/INPA, mantidos em tanques de 40 L (aquários individuais) e 200 L (aquários coletivos), em água estabilizada em tanques de 1000 litros com filtro biológico, a partir de água de poço artesiano (composição físico-química da água vide quadro 01). Todos os tanques continham um sistema de filtro biológico e aerador e, diariamente foi monitorada a temperatura, pH e condutividade (CE). A temperatura dos tanques de manutenção variou de 25 a 28 °C, o pH entre 6.3 e 7.0 e a CE de 50 a 150 μ S/cm.

Quadro 01 – Composição físico-químicos das águas do poço do INPA-I.

pH	4,8	Ferro dissolvido (mg/L)	<0,005
CE (uS/cm)	19,5	Ferro Total (mg/L)	<0,005
Nitrogênio de nitrato (mg/L)	0,45	Cálcio (mg/L)	0,35
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	<0,1	Sódio (mg/L)	0,9
Magnésio (mg/L)	<0,020	Potássio (mg/L)	1,1
Cloratos (mg/L)	1,77	Dureza (mg de CaCO ₃ /L)	1,02

Os peixes foram alimentados com: larvas de peixes, pequenos peixes, *Artemia salina* e minhocas, de acordo com a necessidade específica.

Dentre as espécies de apteronotídeos de maior frequência de captura, testou-se a estabilidade das D.O.Es. com o registro da frequência instantânea a cada 10 s durante 15 min. para um representante de cada espécie. Os peixes foram previamente aclimatados por 2 horas em tanques experimentais de 10 L com água estabilizada (pH em torno de 6,9, CE aproximadamente de 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$), aeração e temperatura constante a 27 °C. As D.O.Es. foram captadas por eletrodos de prata, amplificadas por meio de amplificador diferencial AC/DC A-M System (utilizando-se ganho de 50x) e frequência instantânea registrada por meio do frequencímetro Fluke Scopemeter 196 e *software* FlukeView 4.1 (esquema vide figura 04).

A avaliação da adaptabilidade em cativeiro partiu de observações diárias, tempo de vida em cativeiro e aceitação de alimento possível de ser produzido em condições laboratoriais.

A espécie de apteronotídeo selecionada foi a que apresentou a melhor performance em função de sua adaptabilidade ao cativeiro, frequência de captura e estabilidade das D.O.Es.. Também foi avaliada a resistência ao manuseio experimental submetendo espécimes a condições de trabalho extremo (24h no tanque experimental de 10 L, D.O.Es. captadas, amplificadas e frequência instantânea registrada a cada 10 s durante as 24h por meio do Fluke Scopemeter 196 e *software* FlukeView 4.1 – esquema vide figura 04).

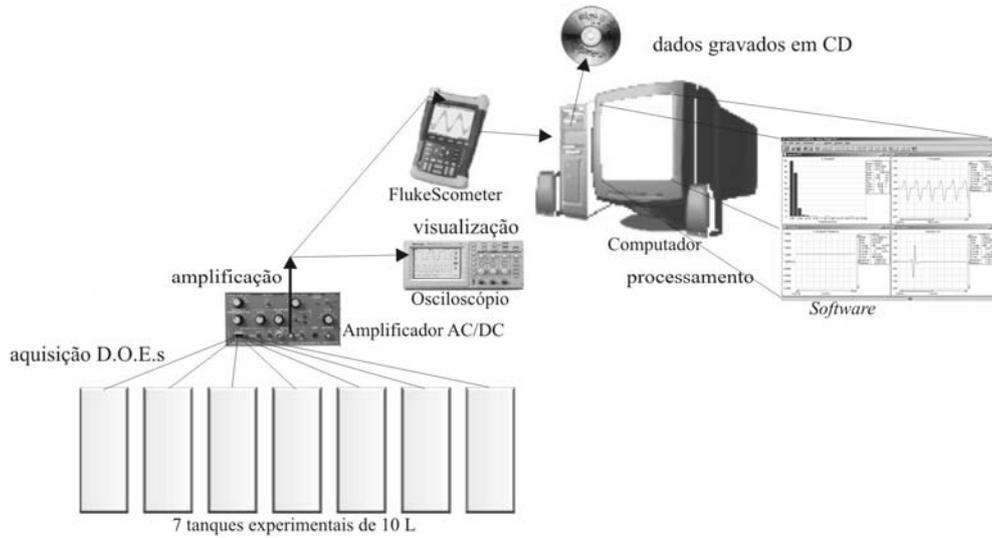


Figura 04 – Aquisição de sinal via Fluke Scopemeter.

2.3 Resultados

Para cada minuto (seis medidas) foram calculados a média, o desvio padrão, e o coeficiente de variação (Desvio Padrão/Média) da frequência de descarga de cada indivíduo. Foram testados as seguintes espécies de apteronotídeos: *Adontosternarchus clarkae* Mago-Leccia, Lundberg & Baskin, *Apteronotus albifrons* Linnaeus, *Apteronotus bonapartii* Castelnau, *Apteronotus hasemani* (Ellis), *Sternarchella terminalis* Eigenmann & Allen, *Sternarchella schotti* Steindachner, *Sternarchogiton porcinum* Eigenmann & Allen (sinal ou forma da onda vide figuras 05 a 11, respectivamente).

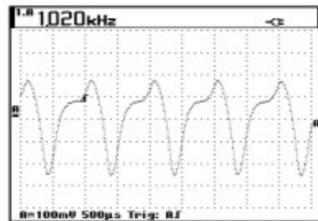


Figura 05 – Sinal de *A. clarkae*.

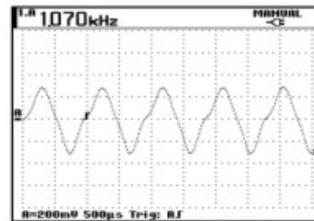


Figura 06 – Sinal de *A. albifrons*.

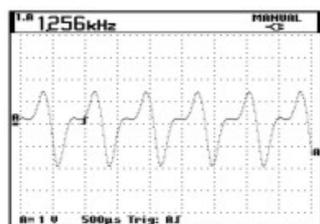


Figura 07 – Sinal de *A. bonapartii*.

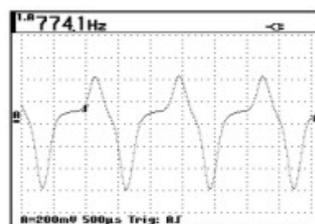


Figura 08 – Sinal de *A. hasemani*.

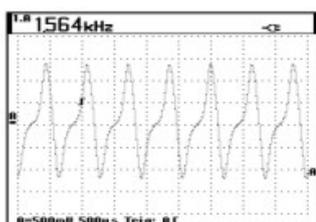


Figura 09 – Sinal de *S. schottii*.

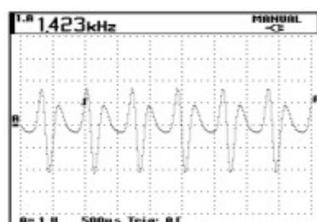


Figura 10 – Sinal de *S. terminalis*.

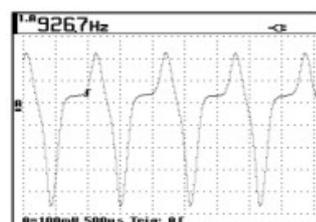


Figura 11 – Sinal de *S. porcinum*.

Tabela 02 - Estabilidade das D.O.Es. das espécies estudadas.

Esp.	<i>S. porcinum</i>	<i>S. terminalis</i>	<i>S. schotti</i>	<i>A. clarkae</i>	<i>A. bonapartii</i>	<i>A. hasemani</i>	<i>A. albifrons</i>
Média	954	1425	1577	1039	1335	759	1104
DP	1,023	2,781	5,162	1,016	1,597	2,649	2,159
CV	$1,0 \times 10^{-03}$	$1,9 \times 10^{-03}$	$3,2 \times 10^{-03}$	$9,7 \times 10^{-04}$	$1,2 \times 10^{-03}$	$3,4 \times 10^{-03}$	$1,9 \times 10^{-03}$

Média em Hz (nº de ciclos/descargas por segundo). DP = Desvio padrão. CV= Coeficiente de Variação.

Os dados da tabela 03 demonstram os valores médios (em Hz), o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) das frequências para os sete diferentes espécimes das sete diferentes espécies, cujo gráfico dos sinais está representado na figura 12.

Fazendo-se referência ao representante da espécie *A. albifrons* pode-se observar a semelhança da frequência fundamental com *A. clarkae*. E reforçando a importância de estudos com diferentes espécies de Apterontidae, *A. clarkae* apresentou o menor coeficiente de variação.

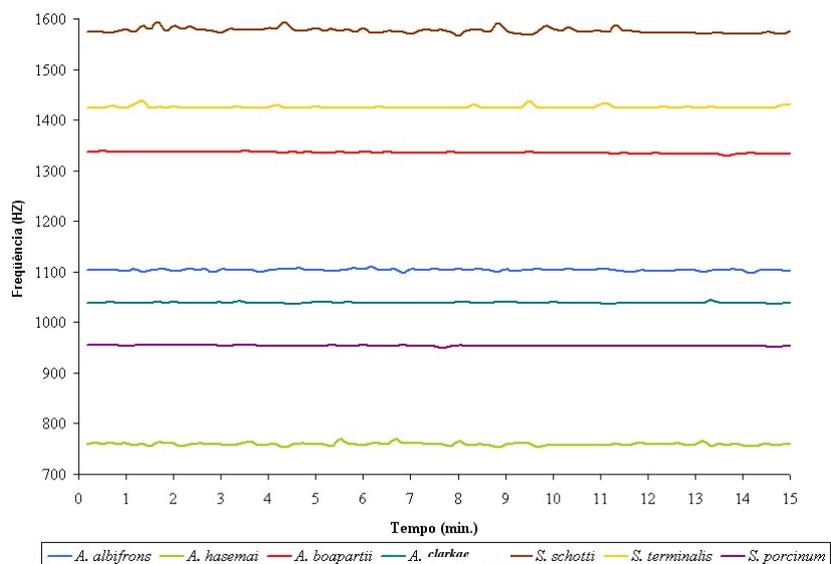


Figura 12 – Gráfico das variações das D.O.Es. avaliadas por 15' para sete diferentes espécies.

Dentre as espécies descritas acima, *Apteronotus albifrons*, *A. bonapartii*, *A. hasemani* e *Sternarchella terminalis* foram selecionadas para um monitoramento intensivo de 24 horas visando-se avaliar a resistência sob condições experimentais extremas (gráficos das frequências na figura 13). Estas espécies foram selecionadas levando-se em consideração a resistência ao cativeiro apresentado durante 20 dias de observação.

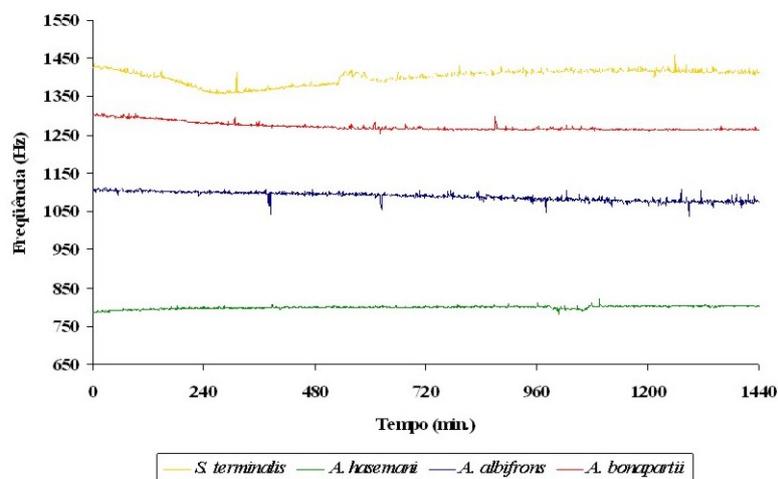


Figura 13 – Monitoramento de D.O.Es. em 24 horas para 4 espécies de apteronotídeo.

Pelo número de picos graficados pode-se notar na figura 13 uma maior estabilidade nas frequências de *Apteronotus bonapartii* e *A. hasemani*. E, a partir destas inferências, foi elaborado mais um experimento de 24 horas em regime de trabalho (tanques experimentais de 10 L, água estabilizada, aeração constante, pH em torno de 6,9, CE aproximadamente 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$, temperatura constante a 27 °C) com dois espécimes de *A. hasemani* e dois espécimes de *A. bonapartii*, para confirmar os testes de resistência às condições experimentais. Porém, com mais dois fatores adicionais, os peixes permaneceram acondicionados em tubos de PVC tampados com uma tela e com iluminação constante. A figura 14 representa o gráfico com a frequência instantânea das D.O.Es. para os peixes contidos nos tubos e sob constante iluminação, por 24 horas.

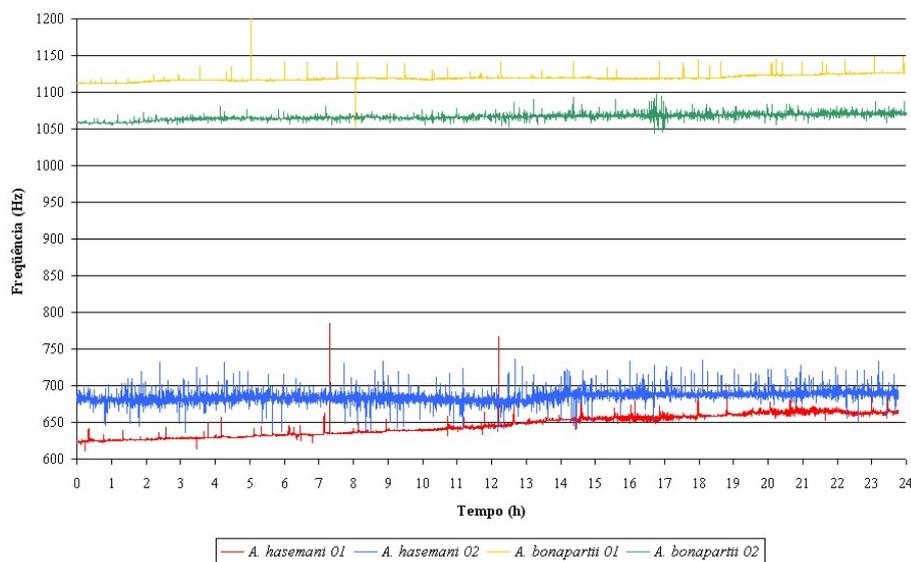


Figura 14 – Monitoramento de D.O.Es. em 24 horas para *A. hasemani* e *A. bonapartii*.

Para a espécie *A. hasemani*, a média da frequência fundamental do peixe 01 foi 665 Hz, o desvio padrão (DP) foi 0,896 e o coeficiente de variação (CV) $1,348 \times 10^{-03}$; para o peixe 02 a média foi 689 Hz, o DP = 4,99 e CV = $7,244 \times 10^{-03}$. E, para a espécie *A. bonapartii*, do peixe 01 a média da frequência foi 1127 Hz, o DP = 1,702 e

o CV = $1,511 \times 10^{-03}$; para o peixe 02 a média foi 1072 Hz, o DP = 2,319 e CV = $2,164 \times 10^{-03}$.

Os espécimes de *A. hasemani* apresentaram o maior e o menor CV, ambas as espécies (*A. bonapartii* e *A. hasemani*) apresentaram estabilidade nas D.O.Es. e semelhante desempenho às condições de cativeiro e regime de trabalho. Porém, dentre as espécies *A. bonapartii* e *A. hasemani*, a última apresentou um outro relevante fator: foi a espécie com maior frequência de captura na área de coleta próxima à Manaus.

Portanto, considerando abundância destas espécies nas coletas de campo, adaptabilidade à alimentação em laboratório e a análise das frequências das D.O.Es., associados à facilidade de manutenção ao cativeiro e resistência às condições de trabalho, *Apteronotus hasemani* (figura 15) foi a espécie selecionada para os estudos de biomonitoramento.



Figura 15 – *Apteronotus hasemani*.

2.4 Discussão

Segundo as características de *A. hasemani*, observadas por Petry *et al.* (2003), a maior parte de seu tempo de vida é associada às macrófitas aquáticas, e isto reflete-se na maior frequência de captura desta espécie com a metodologia de captura executada neste trabalho. Outra forma de captura foi testada, sem obtenção de sucesso, que foi a utilização de rede fundo na tentativa de captura de espécies que habitam as calhas dos rios e igarapés. Os peixes capturados por meio da rede de fundo ficavam muito feridos, dificultando a reabilitação e a manutenção destes peixes no cativeiro.

A realidade é que pouco se conhece sobre a área de vida, reprodução, alimentação e etologia dos Gymnotiformes (Bullock *et al.*, 1979, Alves-Gomes, 1997). Observações de de Santana (2002) sugerem que algumas espécies de apteronotídeos migrem lateralmente na época de cheia para desovar.

Pouco se conhece sobre os hábitos alimentares em relação às diferentes espécies de Apterontidae. Thomas *et al.* (1998) relatam a utilização de Tubifex para alimentação de *A. albifrons* em cativeiro, com sucesso. No Laboratório de Fisiologia Comportamental – LFC/INPA está se iniciando o cultivo de várias alternativas para alimentação de peixes elétricos. Além dos alimentos vivos citados na metodologia, está se iniciando o cultivo de duas espécies diferentes de Tenébrios (*Alphitobius sp.* e *Tribolium sp.*), de Enquitréia (*Enchytraeus albidus*) e de microvermes. Pretende-se, ainda, cultivar cladóceras (*Moina*, *Daphnia*), como alternativa aos náuplios de *Artemia salina*. Entende-se que com a diversificação de alimentos produzidos possa haver melhorias nas condições de adaptação ao cativeiro de outras espécies de Apterontidae. Chegando-se ao ponto de promover condições de reprodução destes

peixes em cativeiro. Hagedorn & Heiligenberg (1985) conseguiram a desova em cativeiro de *A. leptorhynchus*.

Os peixes estudados apresentaram excelentes condições de estabilidade da D.O.Es., sendo que as condições de escolha atribuídas a espécie *A. hasemani* se limitaram ao encontro das características da espécie com condições atuais de infraestrutura e logística do LFC. É obvio que se aumentando as condicionantes laboratoriais, aumentam-se as possibilidades de estudos com diferentes espécies.

Além do mais, as diferentes D.O.Es., que são espécie específicas, fomentam estudos especializados, principalmente relacionados a espécies de mais altas freqüências das D.O.Es. como *Magosternarchus raptor* Lundberg, Cox-Fernandes & Albert e *Sternarchella schotti* (Steindachner) (Crampton & Albert, *in press*), pois é provável que em freqüências mais altas exista maior possibilidade de transmissão de informações. Por outro lado, espécies com D.O.Es. semelhantes, com as observadas neste trabalho (*A. albifrons* e *A. clarkae*) possibilitam análises comparativas como a de *A. hasemani* (750 - 800 Hz; Amazônia brasileira) deste trabalho com trabalhos futuros com *A. eschmeyeri* (800 - 840 Hz, Colômbia) e entre *S. terminalis* (1425 Hz, Amazônia brasileira) com *A. mariae* (1440 Hz, Colômbia).

Enfim, com o desenvolvimento de novas técnicas de captura de apteronotídeos somados ao aprimoramento dos métodos de manutenção destes peixes ao cativeiro, surgiriam novas demandas de estudos com apteronotídeos na Amazônia. Conhecendo-se mais sobre a ecologia dos peixes elétricos da Amazônia poder-se-ia inferir sobre diferentes possibilidades de sistemas de biomonitoramento nos mais diversos ambientes com peixes especificamente adaptados. *Apteronotus hasemani* em função de sua maior freqüência de captura nas proximidades de Manaus tende a ser o peixe

modelo para estudos em biomonitoramento com peixes elétricos para a região central da Amazônia brasileira.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE DE SINAIS PARA APTERONOTIDAE

3.1 Introdução

Em estudos sobre sinais de peixes elétricos, geralmente os sinais das D.O.Es. são avaliados em função do espectro de frequência por meio das transformadas de Fourier. Criou-se um padrão em função do grande uso do espectro de densidade (*Power Spectrum Density* – PSD), muitas vezes, sem critérios técnicos, especialmente em casos de sinais de pulso, que normalmente possuem uma baixa autocorrelação.

O PSD é baseado nos algoritmos da FFT (a *Fast Fourier Transform* foi desenvolvida a partir das séries de Fourier, por Joseph Fourier no século 19), que atualmente é a técnica mais freqüentemente utilizada para análise espectral das D.O.E.s dos Gymnotiformes (Thomas *et al.*, 1996a, 1996b; Thomas *et al.*, 1997, 1998; Crampton, 1998b; Assad *et al.*, 1999; Kramer, 1999a; Kramer, 1999b; Thomas, 2000; Cox-Fernandes & Podos, 2004). Este método representa muito bem sinais com alta autocorrelação, como os sinais dos peixes elétricos onduladores (Apteronotidae, Eigenmanniidae, Sternopygidae). Porém, a FFT não representa variações dos sinais em função do tempo. Na transformação do sinal do domínio do tempo para o domínio da frequência (transformada de Fourier), perde-se totalmente a informação sobre a localização temporal (ou espacial) (Protázio, 2002). A FFT integra os valores temporais do sinal avaliado.

Para se avaliar um sinal por meio da FFT em função do tempo foi desenvolvida a STFT (*Short Time Fourier Transform*, desenvolvida por Dennis Gabor em 1946; Misiti *et al.*, 1996). Porém, a STFT não demonstra bem a intensidade das frequências, além de necessitar de maior poder de processamento computacional para o cálculo de sinais de tamanhos maiores ou mais complexos. Não foi encontrado registro da utilização da STFT para avaliação de sinais de peixes elétricos.

Outras técnicas de processamento de sinais estão sendo atualmente empregadas no estudo de peixes elétricos, como por exemplo, a autocorrelação ou autocorrelação parcial (Capurro & Malta, 2004) e conseqüentes relações espaço-fase.

Para se representar um sinal em função do tempo (sistemas dinâmicos – “tempo real”), sendo também possível avaliar cada frequência em diferentes escalonamentos, além da STFT, existem outras técnicas de processamento de sinais, e entre estas, a chamada transformada *Wavelet's* tem sido muito utilizada atualmente (Torrence & Compo, 1998). As transformadas de “ondeletas”, como também são conhecidas as *Wavelet's*, foram desenvolvidas a partir da necessidade da análise de sinais baseada em tempo-escala (análise de sinais não-estacionários) e não em tempo-frequência (análise de sinais de amplitude fixa) como ocorre na análise de Fourier (FFT) (Misiti *et al.*, 1996; Torrence & Compo, 1998; Amorim Jr. *et al.*, 1999).

A transformada *Wavelet* é capaz de revelar aspectos em um sinal que não são possíveis de serem obtidas através de outras técnicas de processamento, aspectos estes como: tendências, pontos de descontinuidade, descontinuidades em derivadas superiores e autosimilaridade (Protázio, 2002). Em contraste com a transformada de Fourier, a transformada *wavelet* é bem localizada tanto no tempo quanto na frequência (figura 16).

Para um referencial histórico: Em 1909, Alfred Haar fez menção ao termo *Wavelet* em sua tese. Em meados do século 20, Jean Morlet fundamentou os conceitos utilizados hoje com relação às ondeletas (Misiti *et al.*, 1996).

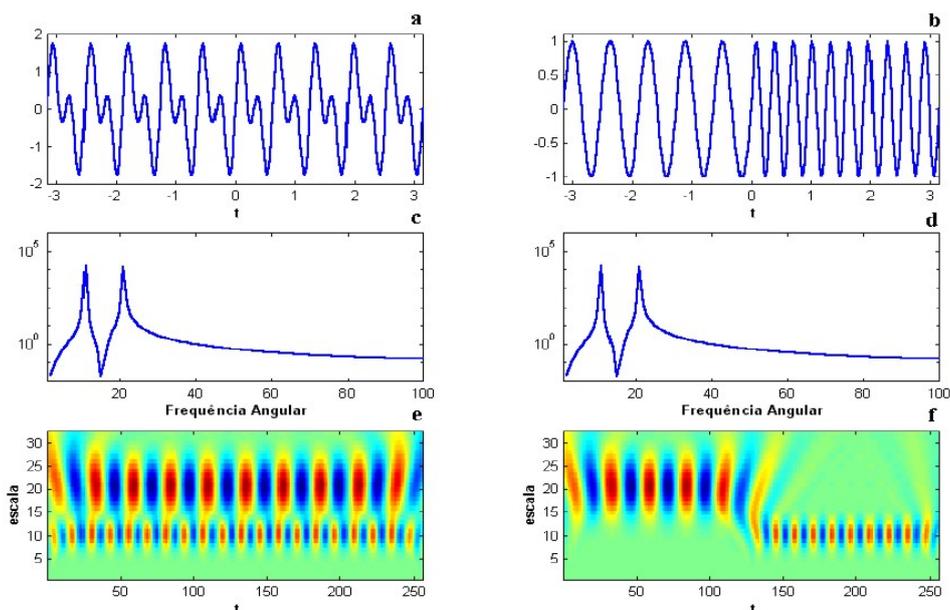


Figura 16 – Análise espectral por meio da transformada de Fourier e por meio da transformada *Wavelet* de dois sinais. O primeiro sinal (a) consiste da superposição de duas freqüências ($\sin 10t$ e $\sin 20t$), e o segundo (b) consiste das mesmas freqüências aplicadas a cada uma das metades da duração do sinal. Em (c) e (d) os espectros idênticos dos dois sinais obtidos através da Transformada de Fourier, e em (e) e (f) avaliações por meio da transformada *Wavelet* de (a) e (b) respectivamente. (Protásio, 2002).

Além da *Wavelet*, existe uma outra ferramenta para processamento de sinais, bastante poderosa, para análise de sistemas não-lineares, recentemente introduzida por Eckmann *et al.* (1987). Esta ferramenta, chamada análise visual de recorrência (VRA), possibilita visualizar estados de recorrência no espaço-fase, multidimensional no tempo, como representação bi-dimensional desta recorrência (Marwan, 2003).

Com o advento da VRA foi possível analisar sinais de alta complexidade dinâmica, não-estacionários, não-lineares e com múltiplas escalas temporais, como por exemplo, os sinais de sistemas fisiológicos, por meio de representações gráficas (Webber & Zbilut, 1994; Casdagli, 1997), vide exemplos na figura 17.

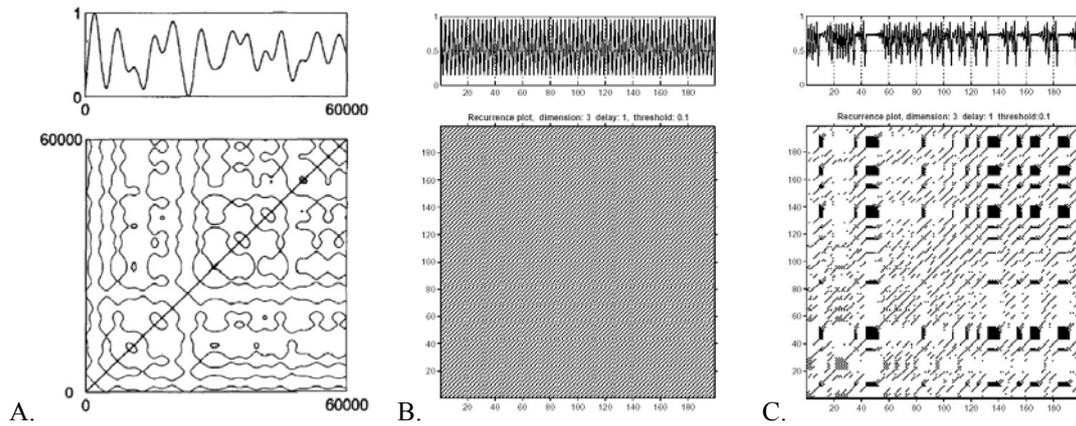


Figura 17 – Gráficos de VRA para diferentes tipos de sinais.
(modificados de Casdagli, 1997 – A.; Marwan, 2003 – B. e C.).

Marwan (2004) desenvolveu um *toolbox* para o software MatLab[®] que possibilita realizar análises de recorrência de acordo com as características particulares dos sinais. Inclusive com possibilidade de se produzirem gráficos e análise quantitativas de *cross*-recorrência (CRP e CRQA; entre dois sinais diferentes – figura 18).

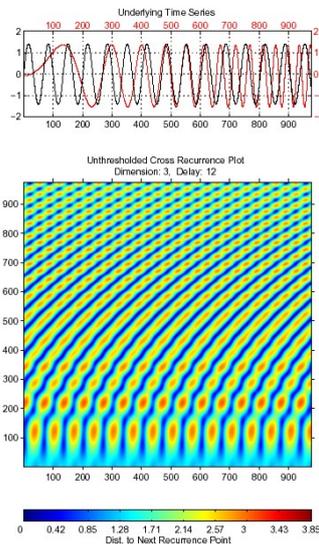


Figura 18 – Gráfico de CRP entre diferentes sinais (Marwan, 2004).

As vantagens de utilização das técnicas de recorrência para análise de sinais aumentaram com o desenvolvimento da análise quantitativa baseada em gráficos de recorrência. A Análise Quantitativa de Recorrência (RQA), introduzida por Zbilut &

Webber Jr. (1992), foi desenvolvida para ser especialmente aplicada na avaliação de dados fisiológicos (Marwan, 2003).

Os gráficos de recorrência são caracterizados por sua organização a partir dos seguimentos da linha diagonal. As análises quantitativas de recorrência (RQA) se dão em relação das características da linha diagonal e dos pontos de recorrência na matriz dos gráficos (Faure & Korn, 1998). A RQA tem excelente desempenho em processamento sinais de séries temporais, sinais não-estacionários e dados caóticos (Zbilut *et al.*, 1998). Outro fator importante da RQA é que a quantificação dos sinais não depende de transformações matemáticas, como por exemplo, as transformadas de Fourier. A RQA não se limita a sistemas lineares, pode comportar múltiplas dimensões com a representação simples das recorrências por meio de distâncias métricas (Zbilut *et al.*, 2000).

A RQA define as seguintes medidas de complexidade usando a densidade de pontos de recorrência e as estruturas diagonais dos gráficos de recorrência: a **taxa de recorrência** (ou porcentagem de recorrência), o **determinismo** (ou porcentagem de determinismo), a **divergência** (o inverso do tamanho máximo das estruturas diagonais), a **entropia** (baseada na entropia de Shannon das frequências de distribuição do tamanho das linhas diagonais) e, as **tendências** (ou derivações, que representa a distância temporal entre as diagonais ou informações da não-estacionaridade). Informações mais detalhadas sobre metodologias e aplicações de análises de recorrência podem ser encontradas em Marwan (2003).

3.2 Material e Métodos

Diversas técnicas de processamento de sinais (VRA, FFT, PSD, STFT, CRP, CRQA e *Wavelet's*) foram testadas para se buscar um formato de análise computacional eficiente para o tipo de sinal gerado por peixes elétricos da família Apterontidae. Foram utilizados três diferentes *software's*: Dataplore[®], VRA 4.7 e MatLab[®] – *toolboxe's*: *Signal Processing*, *Cross Recurrence Plot* (Marwan, 2004) e *Wavelet's* (Misiti *et al.*, 1996).

A partir dos resultados obtidos com análises preliminares dos sinais foram desenvolvidos algoritmos específicos para as avaliações pertinentes a esta dissertação por meio do *software* MatLab[®] (*m-files* Anexo I).

3.3 Resultados

Utilizando o programa Dataplore[®], foi avaliada a autocorrelação dos sinais de peixes da espécie *A. hasemani* (Apterontidae). Para definição das técnicas a serem utilizadas no processamento do sinal foi feita a análise de autocorrelação. Os resultados de análises de autocorrelação dos sinais de *A. hasemani* (exemplo na figura 19) predizem sinais de alta autocorrelação, portanto a avaliação por meio de transformada de Fourier apresenta-se eficiente na determinação das frequências.

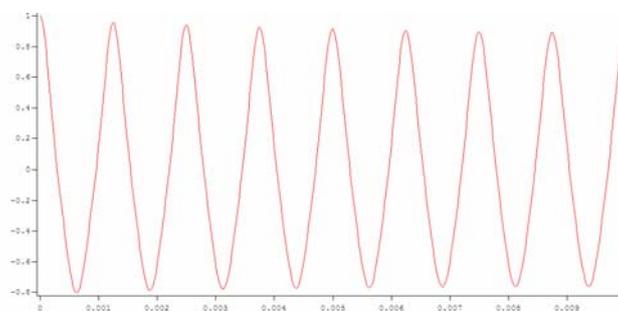


Figura 19 – Exemplo de gráfico de autocorrelação, executado por meio do *software* Dataplore[®].

Os sinais avaliados de peixes da família Apterontidae demonstraram a predominância da frequência fundamental, fato que mascara ou oculta variações em outras frequências que compõem o sinal. Foi testada a utilização de filtros digitais para suprimir a frequência fundamental e, assim, avaliar as frequências maiores, capazes de conter mais informações e/ou serem mais sensíveis e representativas às variações fisiológicas dos peixes. Foram utilizados filtros digitais passa alta no domínio das frequências (que filtra as frequências abaixo de determinado valor de frequência), deixando “passar” os valores das frequências além da frequência fundamental.

Utilizou-se o programa computacional VRA 4.7 (Visual Recurrence Analises 4.7) para se fundamentar a análise de recorrência (AR) (figura 20).

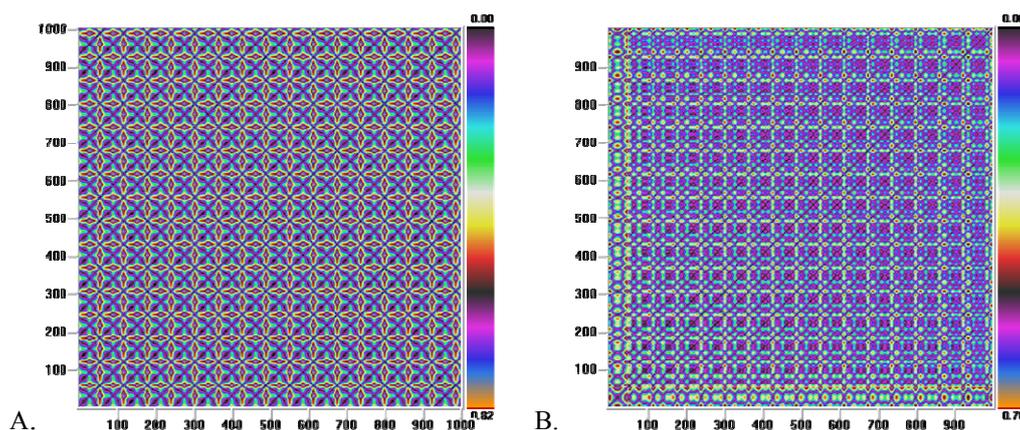


Figura 20 – A) Gráfico de AVR para um sinal e B) gráfico de AVR para sinal filtrado.

Na AR por meio do *software* VRA, existem fatores dimensionais e atraso (*delay*) que podem ser ajustados. Por meio da *Mutual Information* (MI), função usada para determinar o ótimo valor de atraso para reconstrução do espaço de recorrência (Fraser & Swinney, 1986) investigou-se um valor genérico para ser utilizado neste trabalho em todos os sinais avaliados. Optou-se em utilizar *delay* 1 e/ou 10. No gráfico 21 está um exemplo da avaliação de MI para um sinal típico de *A. hasemani*.

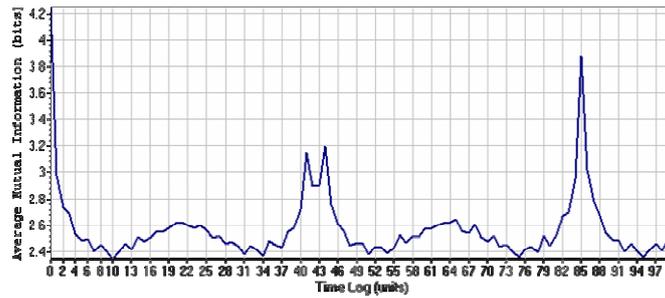


Figura 21 – Gráfico da avaliação MI – no valor 10 = mínima correlação.

Foi necessário determinar um valor da dimensão do sinal para se calcular a recorrência. O gráfico A. da figura 22 representa os valores estimados a partir da correlação, como exemplo de um sinal característico de *A. hasemani*, com tempo de atraso (*time delay*) igual a 1; no gráfico B. os valores para o tempo de atraso igual a 10. Em função dos valores resultantes da análise de diferentes sinais para *A. hasemani*, foi definido dimensão igual a 3 para os cálculos de recorrência.

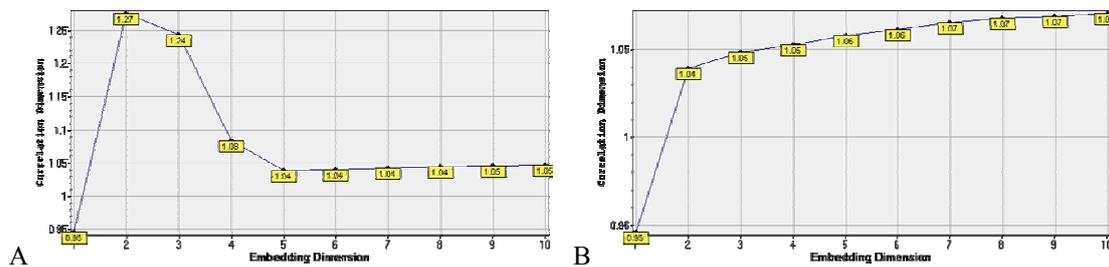


Figura 22 – Gráficos para determinação do valor de dimensão. A. *delay* = 1; B. *delay* = 10.

Compreendendo o significado físico dos sinais representados pelas diferentes técnicas de processamento de sinais estudadas com a utilização de pacotes computacionais específicos (Dataplore® e VRA), passou-se a utilizar um programa computacional com maior liberdade para poder adequar algoritmos específicos para análise dos sinais de Apterontidae. Neste caso, o *software* MatLab®, com seus *toolboxes*, que, entre outras vantagens, não exigem do usuário conhecimento aprofundado em programação. Além disso, os *toolboxes* *Wavelet's* (Misiti *et al.*, 1996) e CRP (Marwan, 2004), foram especialmente desenvolvidos para este programa computacional.

Seguem exemplos de gráficos criados a partir de algoritmos (*m-files* Anexo I) especialmente desenvolvidos para se analisar sinais de Apterontidae (figuras de 23 a 31).

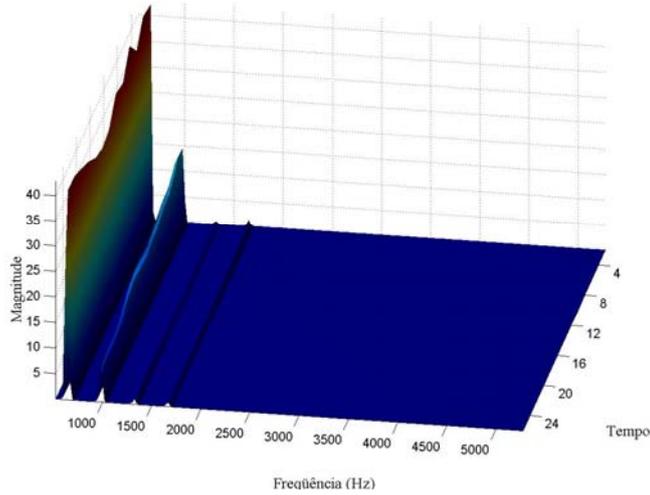


Figura 23 – Gráfico de PSD, neste caso, concatenando para 13 sinais de um espécime de *A. hasemani*. Este gráfico demonstra as possibilidades de representar variações discretas no tempo com a concatenação de matrizes de dados que representam os valores das freqüências (PSD).

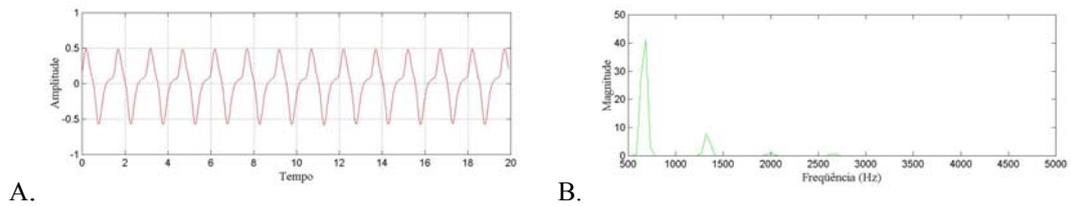


Figura 24 – Gráfico do sinal “1” (A.) e PSD (B.) de *A. hasemani*.

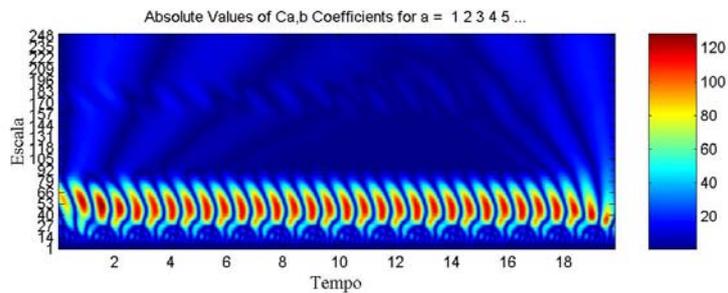


Figura 25 – Gráfico de CWT – db8 para sinal “1”.

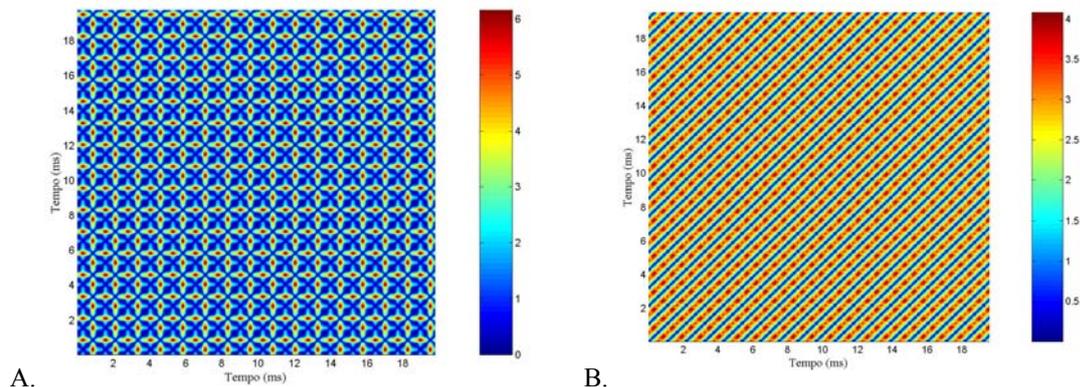


Figura 26 – A.) AR para sinal “1”, delay = 1 e B.) AR para sinal “1”, delay = 10

Observando-se a figura 26, é notória a diferença de sensibilidade do método AR com relação ao tempo de atraso. Possibilidades de variar os valores do tempo de atraso, com critérios estabelecidos podem ressaltar diferentes níveis de interpretações, o que pode resultar em condições positivas para o processamento de sinais de Apterontidae.

Foram utilizados filtros digitais *Butterworth* passa alta, com filtragem a partir da frequência fundamental mais 80% (figuras 27 a 29). Importante acrescentar que para efeito de comparação de sinais por meio da AR, é necessário a remoção do nível DC do sinal. Para os sinais filtrados, o filtro digital remove o DC por extensão.

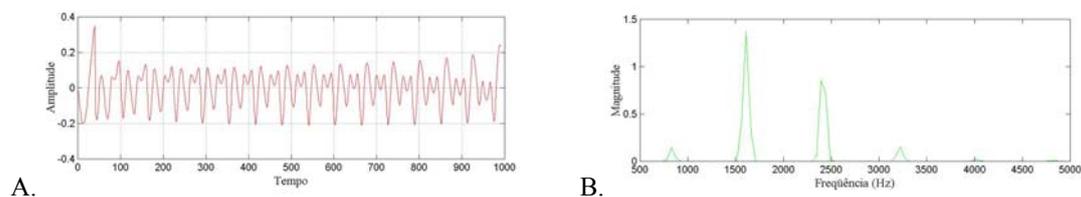


Figura 27 – Gráfico do sinal “1” filtrado (A.) e PSD (B.).

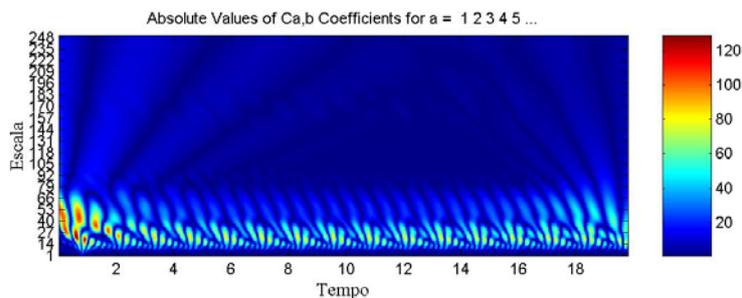


Figura 28 – Gráfico de CWT db8 para sinal “1” filtrado.

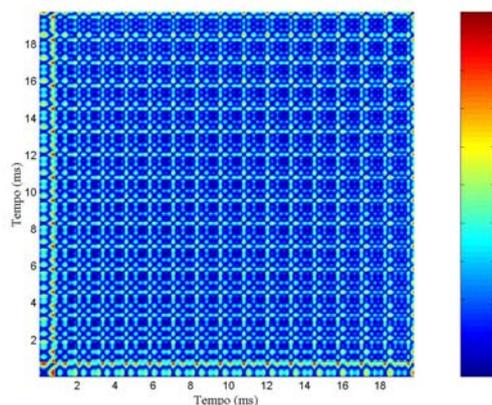


Figura 29 – Gráfico de AVR para sinal “1” filtrado.

Para otimizar as análises visuais de recorrência e *Wavelet's* formatou-se um algoritmo que realiza de forma automatizada a produção de gráficos de contraste (preto e branco), fornecendo subsídios para análises preliminares de todos os sinais sem demandar muito recurso computacional. Assim, pode-se encontrar de forma mais rápida e eficiente entre todos os sinais avaliados, aqueles cuja avaliação necessita ser mais aprimorada, executando-se para estes, análises gráficas com maiores recursos visuais. Nas figuras 30 e 31 encontram-se exemplos destes gráficos simplificados de contraste, AVR e *Wavelet's*, respectivamente.

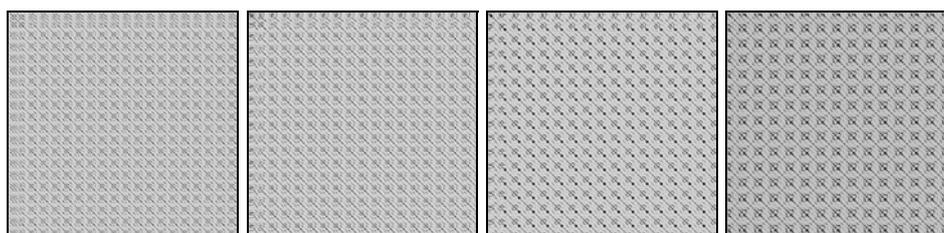


Figura 30 – AVR de sinal filtrado de um *A. hasemani* em diferentes temperaturas (28, 26, 24 e 22 °C).

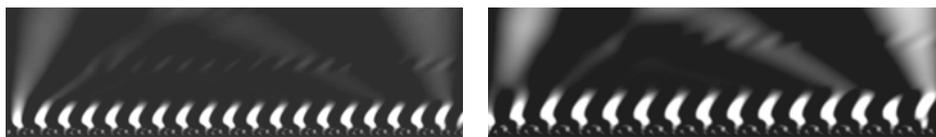


Figura 31 – Wavelet's de *A. hasemani* em diferentes temperaturas (28 e 22 °C inf.).

A análise de recorrência tem uma poderosa ferramenta para avaliação de sinais de alta complexidade, que é a análise quantitativa de recorrência, que também pode ser, análise quantitativa de *cross*-recorrência (CRQA). Para este estudo, avaliaram-se apenas os seguintes parâmetros para diferentes sinais por meio da CRQA, que são: a **recorrência**, o **determinismo**, a **divergência** e a **entropia**. Segue na tabela 03, exemplos com dados reais, da análise quantitativa de recorrência de um peixe *A. hasemani* em temperatura ambiente e em água padrão. Nota-se a maior sensibilidade dos valores de divergência e de entropia na quantificação das diferenças entre sinais. Outros dados correlatos poderão ser avaliados nos capítulos subseqüentes.

Tabela 03- Exemplo de valores de RQA para *A. hasemani* em temperatura ambiente e água padrão.

Sinal	Recorrência	Determinismo	Divergência	Entropia
1	0,02964	0,87328	0,00462	0,19963
2	0,02931	0,88122	0,00141	0,00743
3	0,02987	0,87828	0,00709	0,43854
4	0,03161	0,86851	0,00359	0,1615
5	0,03115	0,85633	0,00649	0,34145
Média	0,02995	0,87460	0,00491	0,27115

3.4 Discussão

Desenvolver novas formas de se ver os sinais de peixes elétricos não é apenas uma mera aplicação de técnicas. Muitas vezes, a complexidade dos sistemas biológicos somados à complexidade dos sistemas computacionais dificultam o encontro de uma solução “ideal”. Geralmente, para promover a busca de novas alternativas é necessário o aparecimento de situações sem solução evidente pelos caminhos comumente empregados.

Foi por meio da manifestação de uma lacuna do conhecimento que se buscou desenvolver evidências fundamentadas em metodologias de ponta para a análise de sinais, para responder a seguinte pergunta: É possível detectar, por meio de métodos computacionais, variações dos sinais das D.O.Es. de peixes elétricos (apteronotídeos) causadas pela alteração da composição da água onde o peixe se encontra?

Esta pergunta poderia ser respondida por meio da avaliação das frequências ou espectro das frequências (analisando-se as principais harmônicas com relações lineares), como propuseram Thomas *et al.* (1996a; 1996b). As respostas no universo das frequências, como as transformadas de Fourier e suas derivadas, não são capazes de representar variações sutis nos sinais. Perdem-se informações com relação a variações em função do tempo e em bandas de frequências ou harmônicas de menor intensidade. Qual a diferença entre 700 Hz e 701 Hz? Se o sinal fosse uma senóide pura dir-se-ia 1Hz. Porém, o sinal de um peixe elétrico é uma composição de senóides, com muitas harmônicas, portanto, um “sistema” não-linear. Acrescenta-se a este sinal o fator tempo, que compromete a condição estacionária das representações no universo das frequências.

Resposta às variações dos sinais em função do tempo buscou-se por meio da aplicação da transformada de ondeletas (*Wavelet's*). E o estudo das D.O.Es. de Apterontidae, demonstrou que muitas considerações relevantes estão em aberto quanto a máxima eficiência da aplicação desta metodologia de processamento de sinais, como por exemplo, quando aplicada aos sinais sísmicos e sinais meteorológicos.

Utilizou-se filtragem dos sinais e variações empíricas nos valores das escalas para execução das transformadas de ondeletas, o que demonstra certa peculiaridade da estabilidade dos sinais de Apterontidae e a necessidade do estabelecimento de

diretrizes específicas para maior eficácia no tratamento destes sinais por meio das transformadas de ondeletas. E também, não existe uma “ondeleta mãe” específica ou mais adequada (segundo algum critério ou fundamento referenciável) para ser utilizada em sinais de Apterontidae. Fato que demanda novos estudos para o estabelecimento de específicas diretrizes metodológicas.

Quanto às análises de recorrência, a representação gráfica e a quantificação matemática apresentaram ser um poderoso referencial para mensuração de mínimas variações do sinal. A partir deste estudo pode-se acrescentar mais um potencial de aplicação das análises de recorrência aos numerosos trabalhos levantados por Marwan (2003): peixes elétricos!

Para finalizar, com relevância à sensibilidade das análises de recorrência, sugere-se a utilização desta metodologia de processamento de sinais, também, para a caracterização sistemática dos peixes elétricos por meio das D.O.Es.. Método que já está sendo desenvolvido por muitos sistemas (principalmente para Gymnotiformes; Kirschbaum, 1995b; Crampton, 1998b), porém, com as formas de onda convertidas em espectro de frequência baseados na FFT. Acredita-se que a análise de recorrência aplicada aos peixes elétricos venha a ser uma ferramenta complementar aos métodos tradicionais de análise das D.O.Es..

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES NORMAIS DAS D.O.Es. DE

Apteronotus hasemani

4.1 Introdução

Para se obter parâmetros que qualifiquem limites das oscilações das D.O.Es. de *Apteronotus hasemani* foi realizado uma bateria de experimentos com os peixes em condições de trabalho e em água sem contaminação. A determinação destes padrões além de elucidar o comportamento dos espécimes estudados às condições laboratoriais, fundamentou o pré-requisito para o estabelecimento de um padrão normal da espécie em questão.

Algumas características com relação às condições ambientais e Gymnotiformes devem ser levadas em consideração quando se tratar da avaliação da estabilidade das D.O.Es. destes peixes. A contar, as variações físicas básicas como a temperatura, a condutividade elétrica (CE) e o pH.

Em vários estudos é relatada a sensibilidade dos Gymnotiformes diante de variações da temperatura (Ferreira, 1953; Enger & Szabo, 1968; Pimentel-Souza *et al.*, 1976; Pimentel-Souza & Fernandes-Souza, 1985; Pimentel-Souza, 1988; Thomas *et al.*, 1998; Ardanaz *et al.*, 2001). Thomas *et al.* (1998), observaram que alguns indivíduos da espécie *Apteronotus albifrons* apresentaram, com relação à temperatura, o fenômeno chamado “histeresis”, o que também já foi observado por Enger & Szabo (1968) e Ardanaz *et al.* (2001) para outros Gymnotiformes. A histeresis é a diferenciação dos valores da frequência das D.O.Es. para valores iguais de temperatura em função da forma da variação da temperatura, ou seja, se crescente ou decrescente. Além disso, a variação da temperatura altera consideravelmente, de forma linear, as frequências das D.O.Es (Enger & Szabo, 1968; Pimentel-Souza & Fernandes-Souza, 1985; Thomas *et al.*, 1998; Ardanaz *et al.*, 2001).

As variações dos outros fatores como o pH e CE são elucidadas por uma relação menos direta com as D.O.Es.. Os dados apresentados por Thomas *et al.* (1997), que fizeram observações quanto as variações das frequências das D.O.Es. de *Apteronotus albifrons* com relação a variação da CE e do pH, demonstram a difusividade das variações da CE; quanto as variações do pH estimaram uma relação polinomial.

Pimentel-Souza (1988) e Pimentel-Souza & Siqueira (1992) relataram variações significativas das D.O.Es. de *A. albifrons* em função das variações do pH por meio de variações das concentrações de dióxido de carbono, o que co-relaciona fatores de hipóxia.

Portanto, a temperatura é o fator ambiental que deve ser mais controlado para avaliações das D.O.Es..

4.2 Material e Métodos

Para a determinação dos padrões normais das D.O.Es. foram utilizados dois grupos de 6 peixes da espécie *A. hasemani*. A determinação dos padrões normais de descarga foi conduzida em experimentos com duração de 24 horas. Os espécimes passaram por um período de aclimação de 12 horas ao tanque experimental.

Os sinais das D.O.Es. de cada peixe avaliado, foram monitorados durante todo o período de 24 horas do experimento, sendo que, a cada 2 horas, por 5 minutos, as D.O.Es. foram gravadas em fita magnética (gravação de segurança) e foram adquiridos por meio do *software* AxonScope[©] 1500 *sweeps* com resolução de 100 KHz e com cada *sweep* de 20 ms (equivalente a 1 minuto e 15 segundos). Ao final dos experimentos os dados foram gravados em CD's. Por cada período de 24 horas foram

avaliados dois peixes utilizando-se dois amplificadores similares (um para cada peixe) e o sinal amplificado adquirido e gravado por meio de dois canais; sendo os peixes gravados no canal 1 considerados do grupo I e os peixes gravados no canal 2 considerados do grupo II.

Na padronização das D.O.Es., a água do tanque experimental foi mantida a 25 °C por meio de um aparato de “banho-maria” (sistema de aquecimento e resfriamento d’água associado a uma serpentina em uma caixa de Faraday horizontal, desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Comportamental do INPA). Os peixes permaneceram contidos em tubos de PVC fechados por uma tela, sob iluminação e aeração constante. Foram utilizados 10 L de água estabilizada por tanque experimental. No início dos experimentos a condutividade elétrica (CE) foi de aproximadamente 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e o pH mantido por volta de $6,5 \pm 0,16$. Estes os valores de CE e pH foram estabelecidos em função da água comumente utilizada nos tanque de manutenção dos peixes em cativeiro no laboratório.

Para aquisição das D.O.Es., a descarga de cada peixe foi captada por eletrodos de prata, com eletrodo positivo (+) na cabeça e eletrodo negativo (-) na cauda do peixe. O sinal das D.O.Es. foi amplificado por meio de amplificador diferencial (AC/DC A-M System) com ganho variável entre 10 e 500 vezes (utilizando-se ganho de 50x). O sinal amplificado foi monitorado com um contador de frequência (Fluke 196 Scopemeter) e visualizado na tela de um osciloscópio (Tektronix TDS 220). Ao mesmo tempo, os sinais foram digitalizados com conversores analógico/digital (Digidata 1322A e Vetter Digital 3000A) e em seguida gravados com sistemas de gravação de dados (AxonScope[®] e VCR). Foram feitas análises mais detalhadas sobre as D.O.Es. por meio de *software's* específicos (FlukeView[®], Dataplore[®], VRA, MatLab[®]). Esquema do sistema de aquisição e análise de dados vide figura 32.

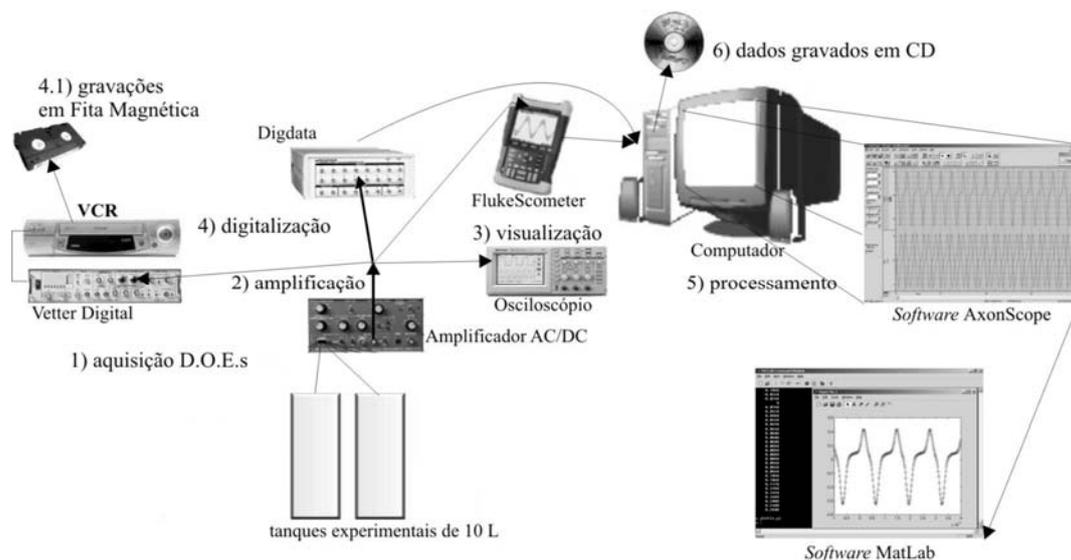


Figura 32 – Esquema dos procedimentos de aquisição e processamento das D.O.E.s..

Para o processamento dos sinais das D.O.E.s., os sinais foram convertidos em arquivos ASCII a partir dos dados adquiridos por meio do *software* AxonScope[®]. Desenvolveu-se algoritmos (*m-files*, Anexo I), executados por meio do *software* MatLab[®]. Foram analisados as variações dos valores das frequências (média, desvio padrão – DP e coeficiente de variação – CV) e o PSD, a CRP e a CRQA para uma amostra aleatória de 20 ms do sinal obtido a cada duas horas (PSD com base de cálculo: transformada de Fourier com 2048 pontos, janelamento *Hanning* e frequência de amostragem de 100 KHz; *Wavelet* mãe db8; CRP e CRQA com dimensão 3 e tempo de atraso 10).

Ao final de cada experimento os peixes utilizados foram sacrificados, etiquetados e conservados em álcool 70%. Foi realizada a biometria (comprimento total) e sexagem de cada peixe avaliado, os machos que apresentaram dimorfismo sexual secundário (Cox-Fernandes, 1998) foram excluídos previamente. A classificação se deu por sexagem primária considerando-se fêmeas quando da presença de oócitos e indefinidos para peixes sem diferenciação evidentes ou machos imaturos. Procurou-se utilizar peixes com tamanho por volta de 160 mm \pm 20 mm.

4.3 Resultados

Considerando o fator ambiental temperatura como o mais influente nas variações das D.O.Es. em Gymnotiformes, de acordo com as publicações referenciadas, testou-se com dois espécimes de *A. hasemani* submetidos a variação de temperatura de 1,3 °C por hora, com a temperatura inicial de 27 °C e temperatura final de 22 °C, a relação de linearidade correspondente das D.O.Es./Δ temperatura para esta espécie (figura 33).

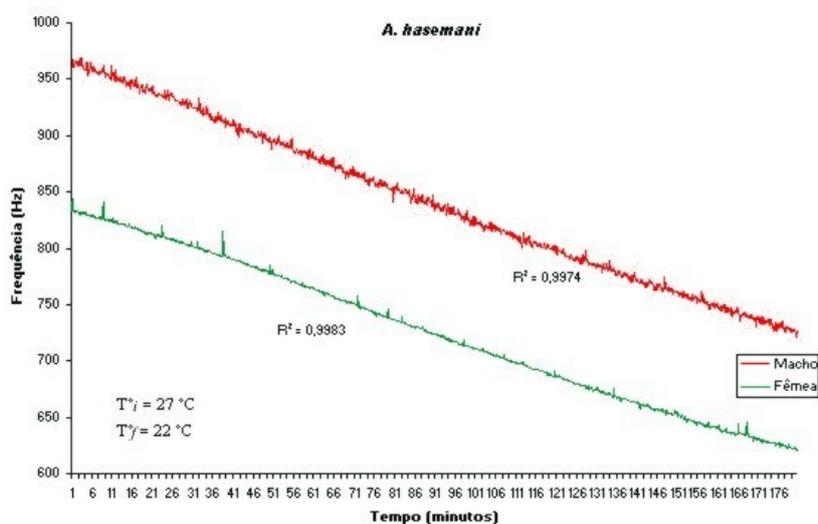


Figura 33 – Gráfico da relação D.O.E./Δ temperatura para *A. hasemani*.

As formas das ondas das D.O.Es. da fêmea de *A. hasemani* avaliada nas temperaturas inicial e final são apresentadas na figura 34.

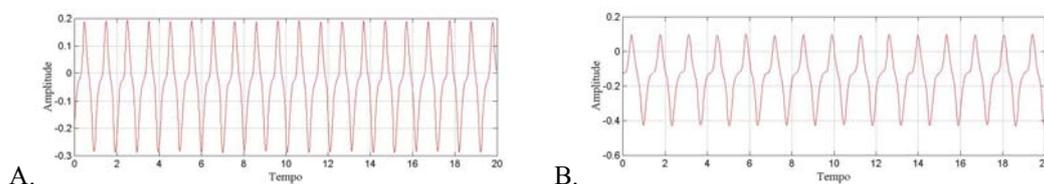


Figura 34 – Sinal a 27 °C (A.) e a 22 °C (B.) de *A. hasemani* fêmea.

Na figura 35 está o gráfico que concatena dados do espectro de densidade (PSD) de sinais captados a cada 3 minutos, com 15 minutos anteriores à variação da temperatura até 180 minutos; observa-se que as variações em função da temperatura

se estendem além da frequência fundamental nas harmônicas que compõem o sinal. Este padrão de gráfico do PSD foi escolhido para se avaliar a estabilidade das D.O.Es. de *A. hasemani*.

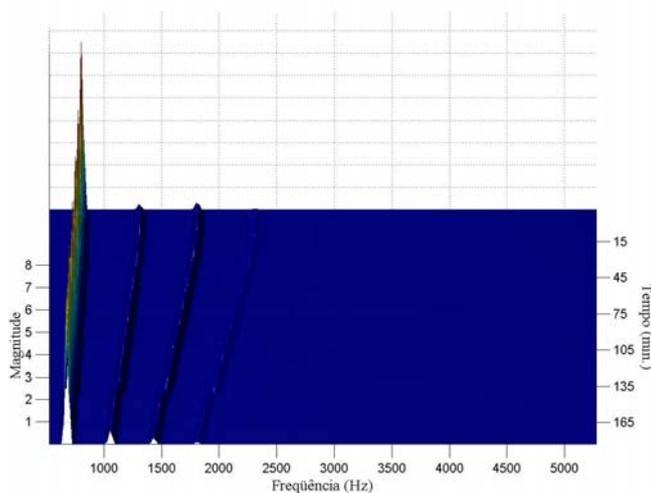


Figura 35 – Gráfico do espectro do sinal de *A. hasemani* fêmea ao longo do tempo sob Δ temperatura.

A média frequência fundamental das D.O.Es. da fêmea de *A. hasemani* submetida à variação da temperatura da água foi de 737 Hz, o desvio padrão (DP) foi 64,218 e o coeficiente de variação (CV) foi de $8,718 \times 10^{-2}$; para o macho de *A. hasemani* a média da frequência foi de 853 Hz, o DP foi de 71,282 e o CV foi de $8,352 \times 10^{-2}$.

Para os experimentos de determinação dos padrões normais das D.O.Es. de *A. hasemani* também calculou-se a média das frequências fundamentais das D.O.Es., o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV). Foram obtidos dados de minuto a minuto, de 30 em 30 minutos, de hora em hora e das 24 horas do monitoramento. Na tabela 04 são apresentados os valores calculados para as 24 horas, para os grupos I e II. Nas tabelas 05 e 06 estão os valores do menor e do maior CV calculados a cada 30 minutos durante as 24 horas para cada peixe dos grupos I e II, respectivamente.

Tabela 04 – Valores médios das D.O.Es.

GRUPO I						
Peixe N°	1	2	3	4	5	6
Média	765,40	760,43	848,22	810,58	740,03	726,25
DP	6,214	4,159	5,766	5,627	9,348	7,834
CV	8,118x10 ⁻⁰³	5,470 x10 ⁻⁰³	6,798 x10 ⁻⁰³	6,941 x10 ⁻⁰³	1,263 x10 ⁻⁰²	1,079 x10 ⁻⁰²
GRUPO II						
Peixe N°	1	2	3	4	5	6
Média	662,56	745,82	843,71	790,08	713,66	762,04
DP	13,307	14,942	8,662	8,266	10,765	8,685
CV	2,008 x10 ⁻⁰²	2,003 x10 ⁻⁰²	1,027 x10 ⁻⁰²	1,046 x10 ⁻⁰²	1,508 x10 ⁻⁰²	1,140 x10 ⁻⁰²

Média em Hz (n° de ciclos/descargas por segundo). DP = Desvio padrão. CV= Coeficiente de Variação.

Tabela 05 – CV das D.O.Es.

GRUPO I						
Peixe N°	1	2	3	4	5	6
Menor CV	2,951x10 ⁻⁰³	1,349x10 ⁻⁰³	2,129x10 ⁻⁰³	1,276x10 ⁻⁰³	1,109x10 ⁻⁰³	8,617x10 ⁻⁰⁴
Maior CV	2,436x10 ⁻⁰²	2,326x10 ⁻⁰²	5,972x10 ⁻⁰³	5,440x10 ⁻⁰³	5,014x10 ⁻⁰³	1,019x10 ⁻⁰²
CV Médio	5,283x10 ⁻⁰³	3,840x10 ⁻⁰³	3,002x10 ⁻⁰³	2,398x10 ⁻⁰³	2,608x10 ⁻⁰³	2,622x10 ⁻⁰³

CV= Coeficiente de Variação.

Tabela 06 – CV das D.O.Es.

GRUPO II						
Peixe N°	1	2	3	4	5	6
Menor CV	1,500x10 ⁻⁰²	3,755 x10 ⁻⁰³	1,722 x10 ⁻⁰³	1,832 x10 ⁻⁰³	7,927 x10 ⁻⁰⁴	2,041 x10 ⁻⁰³
Maior CV	2,515 x10 ⁻⁰²	4,971 x10 ⁻⁰²	1,776 x10 ⁻⁰²	3,693 x10 ⁻⁰²	6,204 x10 ⁻⁰³	1,605 x10 ⁻⁰²
CV Médio	1,975 x10 ⁻⁰²	1,801 x10 ⁻⁰²	3,433 x10 ⁻⁰³	4,438 x10 ⁻⁰³	2,568 x10 ⁻⁰³	3,086 x10 ⁻⁰³

CV= Coeficiente de Variação.

Segue, na figura 36 o gráfico das frequências instantâneas registradas a cada 10s durante 24 horas para os peixes de 1 a 6 do grupo I. Nas figuras 37 e 38 os gráficos da forma de onda no início do experimento e após as 24 horas de experimento; os gráficos do PSD concatenado e os gráficos da CRP entre o sinal inicial e final das 24 horas de monitoramento para os peixes de 1 a 2 do grupo I. Por meio da simples análise visual dos gráficos de PSD pode-se inferir sobre a estabilidade das D.O.Es. destes espécimes de *A. hasemani*. Lembrando que os gráficos foram compostos por dados de PSD concatenados, calculados de sinais de 20

ms registrados a cada duas horas durante 24 horas para cada indivíduo. Nota-se a sensibilidade da análise de recorrência com a diferenciação gráfica considerável entre os peixes de 1 a 2 do grupo I (figuras 37 e 38: D).

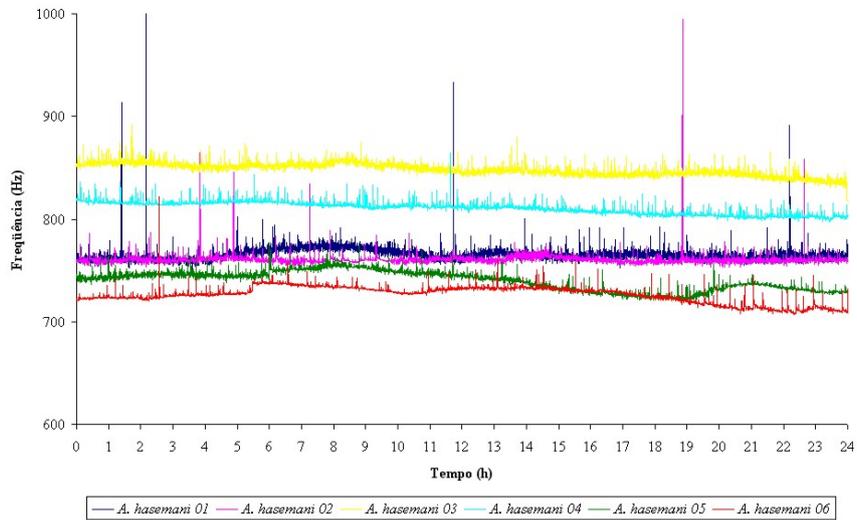


Figura 36 – Gráfico das frequências instantâneas das D.O.Es. para grupo I.

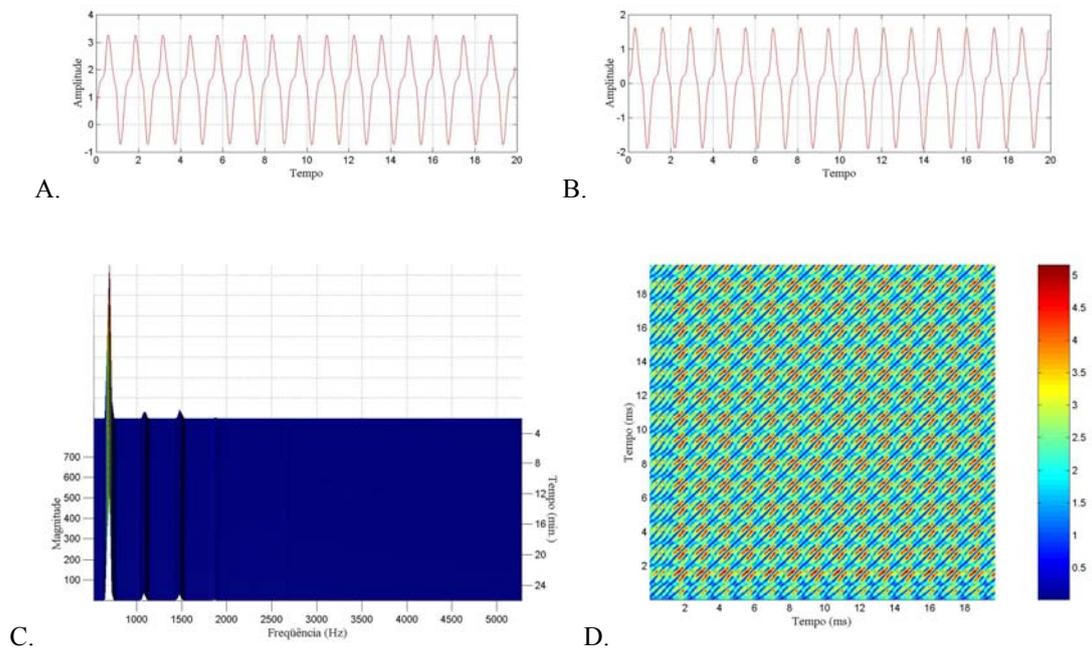


Figura 37 – Gráfico sinal inicial (A.), final (B.), PSD (C.) e CRP (D.) para *A. hasemani* 1 grupo I.

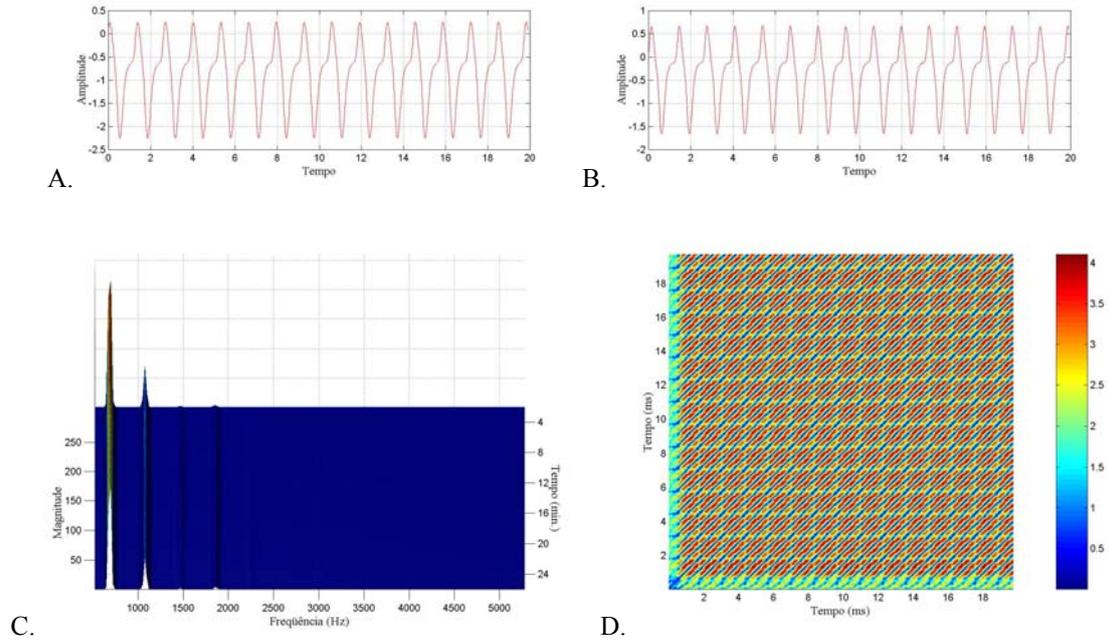


Figura 38 – Gráfico sinal inicial (A.), final (B.), PSD (C.) e CRP (D.) para *A. hasemani* 2 grupo I.

Na figura 39 está o gráfico das freqüências instantâneas registradas a cada 10s durante 24 horas para os peixes de 1 a 6 do grupo II. E finalmente, e na figuras 40 estão os gráficos da forma de onda no início do experimento; os gráficos da forma de onda após as 24 horas de experimento; os gráficos do PSD concatenado, e; os gráficos da CRP entre o sinal inicial e final das 24 horas de monitoramento para o peixes 1 do grupo II, o qual apresentou maior diferença por meio da análise CRP.

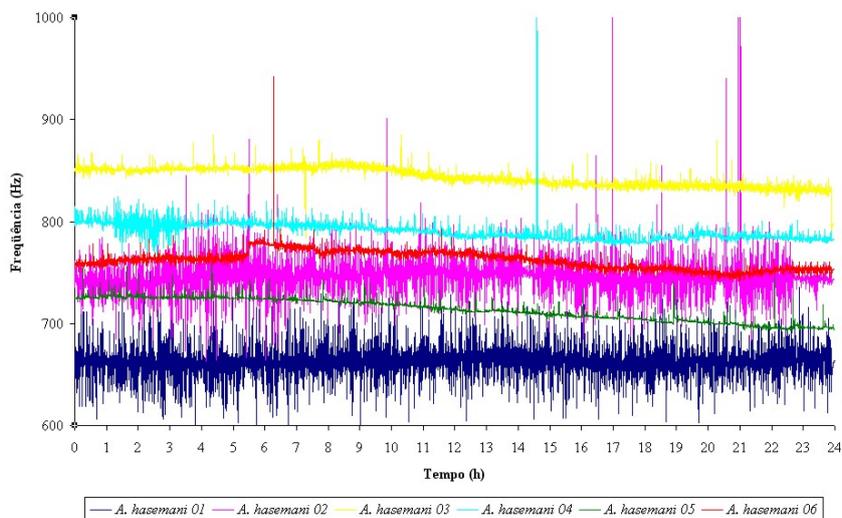


Figura 39 – Gráfico das freqüências instantâneas das D.O.Es. para grupo II.

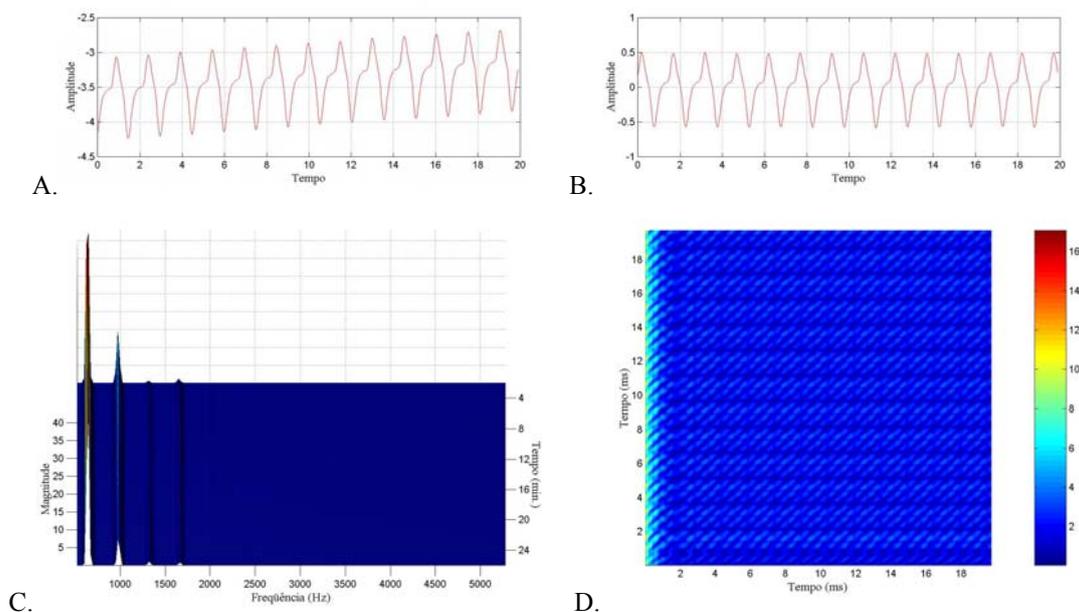


Figura 40 – Gráfico sinal inicial (A.), final (B.), PSD (C.) e CRP (D.) para *A. hasemani* 1 grupo II.

Tabela 07 – CRQA para “normal” de *A. hasemani*.

GRUPO I					
Peixe N°		Recorrência	Determinismo	Divergência	Entropia
1	Sinal	0.01581	0.99117	0.00690	2.57260
	Sinal + filtro	0.00191	0.90959	0.02778	2.24710
2	Sinal	0.01322	0.97583	0.02632	2.77600
	Sinal + filtro	0.00292	0.86781	0.01493	1.61860
3	Sinal	0.01481	0.98837	0.00800	2.25760
	Sinal + filtro	0.00266	0.87321	0.02500	2.36000
4	Sinal	0.01511	0.95085	0.01471	2.36120
	Sinal + filtro	0.00175	0.50413	0.02381	1.46750
5	Sinal	0.01507	0.95911	0.00690	1.97780
	Sinal + filtro	0.00196	0.60874	0.02000	1.63970
6	Sinal	0.01903	0.97477	0.00781	1.82840
	Sinal + filtro	0.00234	0.66282	0.01515	1.35220

GRUPO II					
Peixe N°		Recorrência	Determinismo	Divergência	Entropia
1	Sinal	0.00380	0.98203	0.00962	1.66850
	Sinal + filtro	0.00003	0.55200	0.25000	0.57464
2	Sinal	0.01746	0.99518	0.00333	1.25330
	Sinal + filtro	0.00309	0.92881	0.02000	2.61810
3	Sinal	0.01115	0.99448	0.00826	1.97490
	Sinal + filtro	0.00137	0.94055	0.03226	2.48340
4	Sinal	0.01121	0.99674	0.00926	2.38660
	Sinal + filtro	0.00343	0.97941	0.01667	2.33660
5	Sinal	0.00872	0.97626	0.03846	2.98450
	Sinal + filtro	0.00112	0.76062	0.03846	2.84350
6	Sinal	0.02096	0.96399	0.00383	0.89605
	Sinal + filtro	0.00414	0.74490	0.00926	0.97975

Tabela 08 – Média e DP da CRQA para “normal” de *A. hasemani*.

Peixe N°		Recorrência	Determinismo	Divergência	Entropia
Média	Sinal	0.01386	0.97907	0.01195	2.07812
	Sinal + filtro	0.00223	0.77772	0.04111	1.87676
DP	Sinal	0.00327	0.01319	0.01024	0.54199
	Sinal + filtro	0.00082	0.12339	0.01148	0.51090

DP = Desvio padrão.

Com base nos valores do CV de cada peixe (tabelas 04 a 06), calculou-se o CV médio = $1,151 \times 10^{-02}$ e, adotou-se como referencial para cálculo dos limites aceitáveis de variação das D.O.Es. ou a faixa do padrão normal das D.O.Es., o índice ideal de 1,15% da média ou valor de referência da frequência fundamental.

Definiram-se em função dos valores médios da recorrência, do determinismo, da divergência e da entropia (tabela 08) os valores (em porcentagem) de 23,58%, 1,35%, 85,67% e 26,08% para sinal e; 36,65%, 15,87%, 27,92% e 27,22% para sinal filtrado, respectivamente. Os valores da CRQA entre os sinais das D.O.Es. inicial e final de cada peixe, estão na tabela 07.

4.4 Discussão

Estipular um padrão de comportamento com uma simples representação numérica ou gráfica não passa de uma forma sutil e abstrata de criar um ponto de partida para subseqüentes inferências.

Embora a demonstração gráfica por meio do PSD e CRP contemplem maior quantidade de informações, a subjetividade da análise visual é consequência irrefutável. Com o desenvolvimento do encontro destas poderosas técnicas de processamento de sinais com as características específicas, espécie-específicas ou até espécime-específicas dos sinais destes fantásticos peixes elétricos, poder-se-ia

desenvolver processos associados às tecnologias computacionais, mais representativos com relação aos padrões de comportamento. E se considerando peixes elétricos, quaisquer inferências neste sentido são inéditas.

O índice de 1,15% da média ou valor de referência da frequência fundamental para *A. hasemai*, obtido em condições laboratoriais controladas, com a temperatura constante e sob iluminação artificial, foi coerente com as observações de Cox-Fernandes & Podos (2004), que em um período de 48 horas de gravações obtiveram um valor médio de $0,73\% \pm 0,6\%$ da frequência fundamental para *A. hasemani*. Também registraram o valor máximo de variação da frequência fundamental de um peixe de 14 Hz (ou 1,8%), enquanto que valor médio máximo apresentado neste trabalho foi de 2,008% para o peixe 1 do grupo II. Em contra partida, puderam-se observar valores de CV bem maiores com os dados levantados no experimento de variação de temperatura, o que associando-se a representação gráfica, corrobora com a análise visual da estabilidade das D.O.Es. nos experimentos do padrão normal, também representados em gráficos.

A CRQA, como um padrão normal, foi testada pela primeira vez para avaliar as variações das D.O.Es. em Apterontidae.

CAPÍTULO 5

EFEITO DOS COMPOSTOS BTX NAS D.O.Es. *Apteronotus hasemani*

5.1 Introdução

Para o desenvolvimento de um sistema de biomonitoramento de hidrocarbonetos de petróleo por meio das propriedades biofísicas das descargas dos órgãos elétricos (D.O.Es.) de peixes elétricos da Amazônia, avaliou-se os efeitos causados por diferentes concentrações de compostos BTX nas D.O.Es. de *Apteronotus hasemani* (Apteronotidae – Gymnotiformes).

A utilização dos compostos BTX como representante dos hidrocarbonetos de petróleo se deu pelas características de toxicidade, reatividade, persistência no ambiente e capacidade de mobilização em matrizes ambientais aquáticas. A escolha da espécie *A. hasemani* que compõem este estudo, ocorreu de acordo com resultados discutidos no Capítulo 2. As diretrizes para o processamento dos sinais de *A. hasemani* foram discutidas no Capítulo 3. E, os fundamentos para qualificar padrões das variações das D.O.Es. de *A. hasemani* foram avaliados no Capítulo 4.

5.2 Material e Métodos

Nos experimentos com BTX a temperatura foi mantida em 25 °C, a CE inicial em 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$, o pH inicial em torno de $6,5 \pm 0,11$, a iluminação e a aeração foram constantes. Em todos os experimentos com BTX foram utilizados tanques experimentais de 10 L revestidos com sacos plásticos inertes, que foram conectados a um sistema de exaustão. Para minimizar a produção de resíduos, foram utilizados 5 L de água estabilizada por tanque experimental.

O processo de aquisição e gravação das D.O.Es. ocorreu conforme metodologia descrita no Capítulo 4, com apenas uma diferenciação: a taxa de

amostragem foi de 50 KHz (a base do tamanho do sinal para o cálculo da FFT foi, então, 1024 pontos).

As gravações das D.O.Es. ocorreram a partir de 15 minutos anteriores à introdução dos contaminantes no aquário, estes 15 minutos foram avaliados como um padrão normal para cada indivíduo. Todos os peixes ($n = 6$ por experimento) passaram por um período de aclimatização aos tanques experimentais de 2 horas.

Os contaminantes foram introduzidos por meio de um difusor nos tanques experimentais de 10 L. Cada peixe foi submetido ao contaminante até o limite máximo de 3 horas. Foram amostrados 20 ms das D.O.Es. a cada 3 minutos por meio do software AxonScope[®] e, por questões de segurança, foram gravados em fitas magnéticas (VHS em VCR) 1 minuto por peixe a cada 15 minutos. Os dados obtidos por meio do Fluke Scopemeter 196 e FlukeView[®] 4.1 foram utilizados apenas para análise preliminar das D.O.Es., utilizando-se como referência os valores da frequência fundamental (Hz).

O limite de 3 horas para detecção de determinada concentração do contaminante foi estabelecido sob dois critérios principais: I) O tempo médio de 5 horas para volatilização dos compostos BTX no ambiente (CONCAWE, 1988). II) O fato de monitorar matrizes aquáticas em “tempo real”, prediz 3 horas como limite temporal máximo para detecção do contaminante. Pois, os sistemas tradicionais ou normatizados para detecção de compostos aromáticos, como por exemplo, análise de absorbância direta por meio de espectrofotometria UV, ou com reações de alquilação por meio de espectrofotometria VIS, ou fluorometria, ou espectrometria (massa ou absorção atômica), e ainda, as cromatografias (MPLC, HPLC e CG), exigem um tempo para coleta, processamento das amostras, medição e análise/interpretação dos resultados. Portanto, não produzem resultados em “tempo real” e permanentemente,

mas em muitos casos, com um tempo igual ou superior a 3 horas pode-se utilizar qualquer um destes métodos de análise para o monitoramento de quaisquer ambientes. Sendo assim, não faria sentido avaliar um sistema de alerta em “tempo real” com detecção positiva do contaminante em um tempo superior a 3 horas. Thomas *et al.* (1996a e 1996b) utilizaram o tempo máximo de 2 horas como limite de detecção (em “tempo real”) de cianeto para *A. albifrons*.

O critério para amostragem do sinal a cada 3 minutos foi estipulado em função de experimento piloto submetendo espécimes de *A. hasemani* à contaminação aguda de BTX (~10.000 mg/L), no qual, pela avaliação das frequências fundamentais Schwertner *et al.* (2004) relacionaram um tempo significativo de 4 minutos para a evidente detecção desta concentração de BTX.

Devido as condicionantes laboratoriais de segurança e descarte disponíveis, que inviabilizaram a utilização dos compostos benzeno e tolueno para compor os testes dos efeitos dos compostos BTX, foi utilizado o Xilol comercial como representante elementar dos compostos BTX avaliados. O Xilol comercial (denominado neste trabalho simplesmente por BTX) é uma mistura dos isômeros *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, sendo seu maior constituinte o isômero *m*-xileno com 60 a 85% e pequenas quantidades de benzeno e de tolueno; segundo o Ministério da Fazenda (2002) em função das características para comercialização do produto, “considera-se Xilol os produtos com conteúdo superior a 50% em peso de xilenos”, cujo peso molecular em média da mistura é de 106,16 (peso molecular do *m*-xileno: 106,17; do *o*-xileno: 106,16; do *p*-xileno: 106,17; tolueno: 92,14 e benzeno: 78,11 - ATSDR, 1993; 1997; 2000).

Foram feitos experimentos com o composto veiculado diretamente na água, propiciando a solubilização dos hidrocarbonetos aromáticos menos hidrofóbicos

(benzeno e tolueno) e, também, com o composto diluído em etanol. Tal procedimento é justificado porque na presença de etanol (a partir de concentrações de 10%) os compostos BTX têm a sua solubilidade aumentada, sendo que o efeito maior é registrado para os xilenos (composto mais hidrofóbico), seguido do tolueno e benzeno (Corseuil & Fernandes, 1999). Foram também observados os padrões legais máximos de contaminação permitida para consumo humano de água (Classe 1 – CONAMA, 1986). As análises para determinação das concentrações mínimas detectáveis iniciaram com menos da metade da concentração legal dos compostos BTX permitidos para consumo humano: Benzeno 0,005 mg/L e 0,01 mg/L (EPA, 2003 e CONAMA, 1986, respectivamente), Tolueno 1 mg/L (EPA, 2003) e Xilenos 10 mg/L (EPA, 2003).

Foram realizados experimentos com 2 mg/L de BTX, 10 mg/L de BTX, 20 mg/L de BTX e 100 mg/L de BTX. Em função destas avaliações com os compostos BTX veiculados diretamente aos tanques experimentais, optou-se em avaliar com a diluição do composto em 30% de etanol (álcool etílico) apenas a concentração de 100 mg/L de BTX. A diluição de BTX em 30% de etanol foi em consideração à proximidade dos valores de concentração de etanol adicionados na gasolina brasileira (Baird, 2002).

Para as análises dos sinais foram utilizados algoritmos (*m-files* para MatLab[®]) especificamente desenvolvidos para este trabalho (Anexo I), os parâmetros para estas análises foram descritos no Capítulo 3. A constar, foram utilizados: análises dos valores das frequências fundamentais, análise por meio do espectro de densidade (PSD – *Signal Processing Toolbox*), análise por meio de ondeletas (*Wavelet's – Wavelet's Toolbox*), análise visual de recorrência (VRA), análise visual de *cross*-recorrência (CRP – *Cross Recurrence Plots Toolbox* NDG Univ. Potsdam) e análise

quantitativa de *cross*-recorrência (CRQA – *Cross Recurrence Plots Toolbox* NDG Univ. Potsdam).

Foram utilizados os mesmos procedimentos descritos no Capítulo 4 quanto ao tamanho, a sexagem e o destino final dos peixes.

5.3 Resultados

Com o estabelecimento de um critério para determinação da faixa de variação que caracterize o padrão normal das D.O.Es. de *A. hasemani*, realizou-se uma avaliação preliminar por meio das médias das frequências fundamentais das D.O.Es no período anterior à contaminação e período pós-contaminação.

Os resultados foram expressos nas tabelas 09 e 10. A tabela 09 contém os resultados mais concisos, relacionando três peixes de cada concentração a partir da “evidente” detecção dos compostos BTX na concentração de 10 mg/L. Foi adotado como referência para o padrão normal a porcentagem ou do valor de referência da frequência fundamental de 2% (como uma grande margem de segurança), pois foi considerado o valor máximo de variação avaliado no experimento de determinação do padrão normal e não o valor médio (1,15%). Na tabela 10 estão os valores de referência da frequência fundamental dos outros peixes estudados.

Com esta avaliação preliminar em função dos valores das frequências fundamentais, buscou-se caracterizar (grosso modo) o comportamento das D.O.Es. de *A. hasemani* sob contaminação em diferentes concentrações dos compostos BTX. Foi observado que na maioria dos peixes estudados a média dos valores das frequências fundamentais do período sob contaminação (*f*) foi menor do que a média sem contaminação (*i*).

Tabela 09 – Análise das frequências fundamentais das D.O.Es..

Peixe N°	10 mg/L			20 mg/L		
	1	2	3	1	2	3
Média (i)	809,24	772,91	789,81	615,94	604,07	665,03
Média (f)	793,52	744,55	792,58	605,65	598,68	657,31
Média (i) - DP (n)	793,06	757,45	774,01	603,62	591,99	651,73
Média (i) - DP (i)	806,59	767,29	788,55	609,98	603,70	664,00
DP (i)	2,65	5,62	1,26	5,95	0,37	1,03
DP (f)	4,49	11,54	6,01	4,40	2,92	3,49
DP (n) [2%]	16,18	15,46	15,80	12,32	12,08	13,30

Peixe N°	100 mg/L			100 mg/L + etanol		
	3	5	6	3	4	5
Média (i)	789,31	840,16	975,96	767,88	742,48	924,22
Média (f)	778,13	829,57	941,77	747,74	718,01	916,36
Média (i) - DP (n)	778,98	830,37	944,36	749,27	719,86	916,96
Média (i) - DP (i)	787,32	838,85	974,82	766,24	739,66	923,17
DP (i)	1,99	1,31	1,14	1,64	2,82	1,04
DP (f)	10,50	8,67	12,17	6,90	9,46	4,04
DP (n) [2%]	15,79	16,80	19,52	15,36	14,85	18,48

Média em Hz (n° de ciclos/descargas por segundo). DP = Desvio padrão. (i) = inicial. (f) = final. (n) = “normal”.

Tabela 10 – Análise das frequências fundamentais das D.O.Es..

Peixe N°	2 mg/L					
	1	2	3	4	5	6
Média (i)	717,19	609,38	610,37	685,94	656,25	656,50
Média (f)	725,03	622,82	630,51	685,75	664,32	666,24
Média (i) + DP (n)	731,53	621,56	622,58	699,66	669,38	669,63
Média (i) - DP (n)	702,84	597,19	598,16	672,22	643,13	643,37
DP (n) [2%]	14,34	12,19	12,21	13,72	13,13	13,13

Peixe N°	10 mg/L			20 mg/L		
	4	5	6	4	5	6
Média (i)	638,59	770,88	766,46	834,89	611,25	798,12
Média (f)	626,57	781,25	753,16	820,41	613,77	791,14
Média (i) + DP (n)	651,36	786,30	781,79	851,59	623,48	814,08
Média (i) - DP (n)	625,82	755,46	751,13	818,19	599,03	782,16
DP (n) [2%]	12,77	15,42	15,33	16,70	12,23	15,96

Peixe N°	100 mg/L			100 mg/L + etanol		
	1	2	4	1	2	6
Média (i)	855,13	847,65	732,42	863,12	644,53	803,62
Média (f)	837,05	842,81	712,00	862,51	640,37	801,31
Média (i) + DP (n)	872,23	864,60	747,07	880,38	657,42	819,70
Média (i) - DP (n)	838,03	830,70	717,77	845,86	631,64	787,55
DP (n) [2%]	17,10	16,95	14,65	17,26	12,89	16,07

Média em Hz (n° de ciclos/descargas por segundo). DP = Desvio padrão. (i) = inicial. (f) = final. (n) = “normal”.

De acordo com análise preliminar por meio das médias das frequências fundamentais das D.O.Es., as análises demonstradas subsequentemente serão de alguns peixes que por ventura apresentaram características específicas para demonstração da metodologia de análises dos sinais para *A. hasemani*.

Nas figuras de 41 a 45 estão os gráficos de PSD para experimentos com diferentes concentrações dos compostos BTX. Nota-se que os dois primeiros gráficos se assemelham muito com o padrão de PSD resultante dos experimentos da determinação do padrão “normal” das D.O.Es. (Capítulo 4).

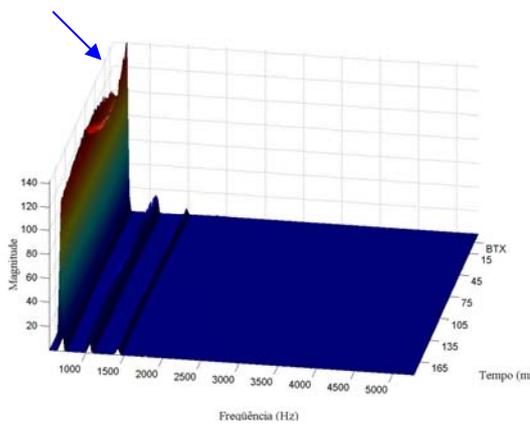


Figura 41 – PSD peixe 2 10mg/L BTX.

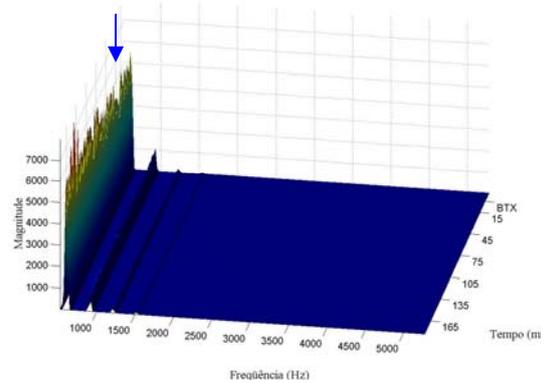


Figura 42 – PSD peixe 1 20mg/L BTX.

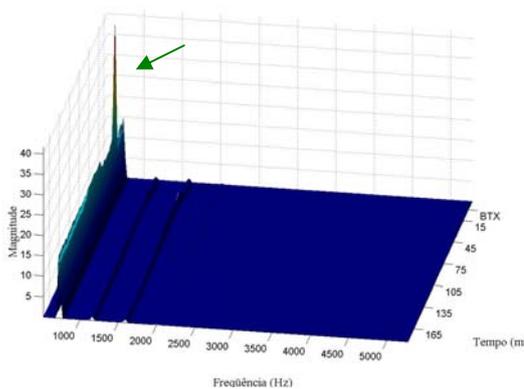


Figura 43 – PSD peixe 5 100mg/L BTX.

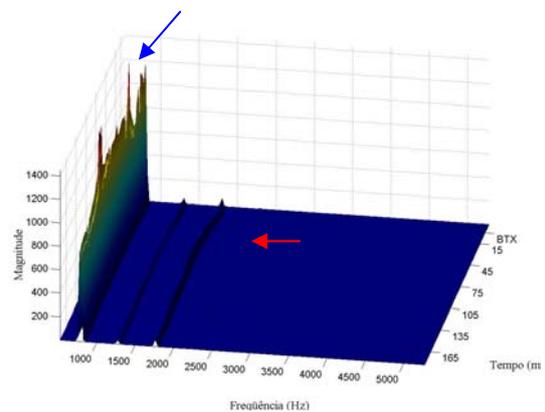


Figura 44 – PSD peixe 6 100mg/L BTX.

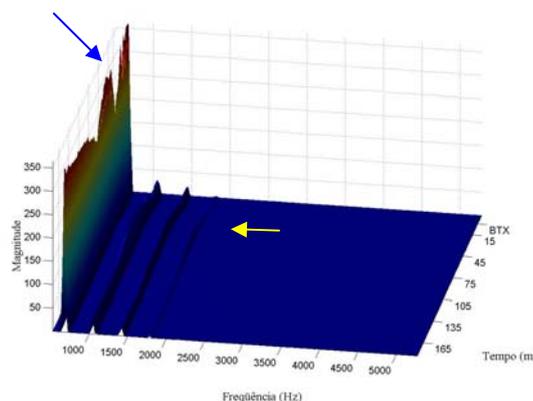


Figura 45 – PSD peixe 4 100mg/L BTX/etanol.

Na figura 43, apontado pela seta de cor verde, ocorre uma elevação brusca na intensidade do sinal pós-contaminação, fato contrário ocorreu na maioria dos outros peixes submetidos a diferentes concentrações de BTX (exemplo, indicação seta azul, figuras 41, 42, 44 e 45). Na figura 44 nota-se uma forte variação negativa nos valores das freqüências após a difusão do contaminante (apontado pela seta vermelha); e de forma similar, isto também ocorre com os valores das freqüências do peixe 4 da concentração de 100 mg/L de BTX + etanol (apontado pela seta amarela – figura 45).

Segue na figura 46 os sinais (forma da onda) dos tempos -9 minutos (sem contaminação) e 9 minutos (pós-contaminação – que representa o pico maior do gráfico PSD, apontado pela seta verde figura 43) do peixe 5 100 mg/L de BTX. Na figura 47 está o gráfico de PSD concatenado do sinal filtrado (sem os valores da freqüência fundamental) para este peixe, demonstrando a extensão do pico de magnitude do sinal nos outros níveis de freqüência (vide seta verde – figura 47).

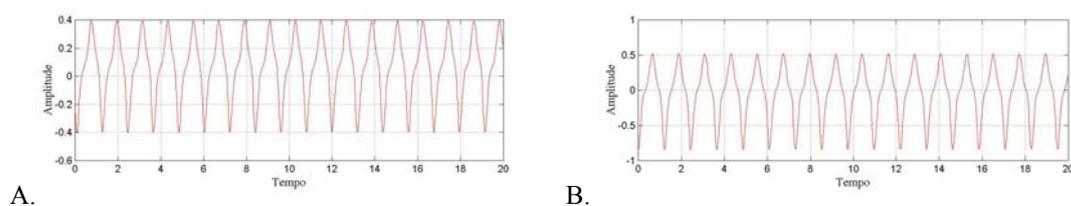


Figura 46 – Sinal “normal” (aos 9’ pré-contaminação – A.) e aos 9’ pós-contaminação (B.).

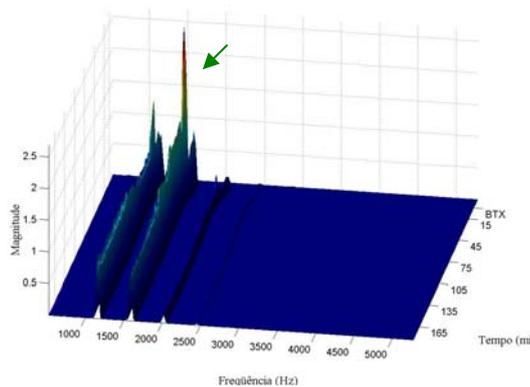


Figura 47 – PSD concatenado para sinais filtrados.

Utilizando-se o sinal filtrado do peixe 5 100 mg/L de BTX, por meio da análise visual de recorrência (VRA), produziu-se gráficos para avaliar (e demonstrar) o comportamento desta metodologia diante das variações na amplitude dos sinais, com dois diferentes valores de tempo de atraso (*delay* 1 – figura 48 e *delay* 10 – figuras 49). As diferenças são evidentes, entre os gráficos de auto-recorrência do sinal normal e do sinal do pico pós-contaminação, nitidamente perceptível em função da tonalidade das cores que bem representam a intensidade dos sinais. Nota-se que com a utilização de um valor do tempo de atraso maior há um ganho na sensibilidade às variações dos sinais.

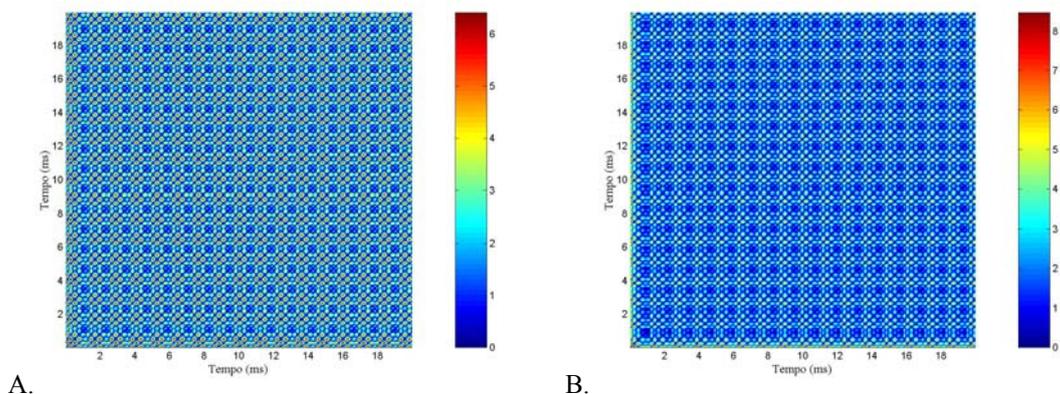


Figura 48 – AR 9' pré-contaminação (A.) e AR 180' pós-contaminação (B.) (*delay* = 1).

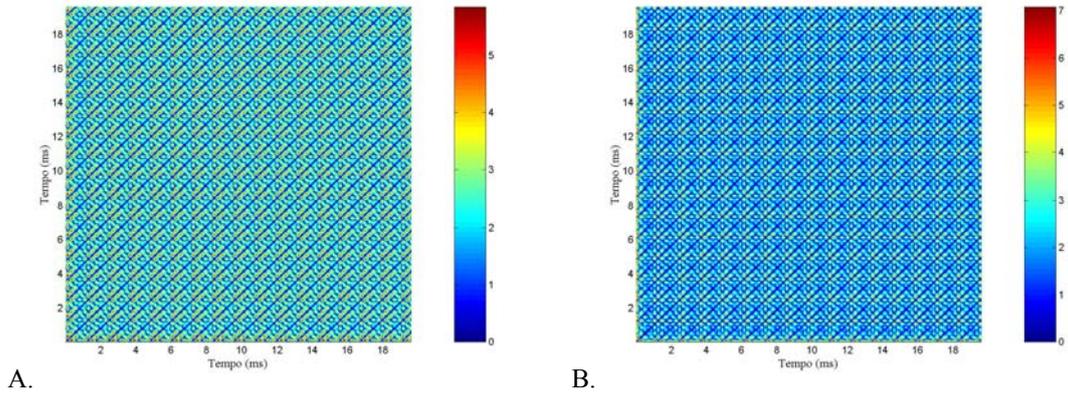


Figura 49 – AR 9' pré-contaminação (A.) e AR 180' pós-contaminação (B.) (delay = 10).

Como referência é apresentada também, a análise por meio da transformada de ondeletas dos sinais filtrados deste peixe *A. hasemai* (5 100 mg/L de BTX), utilizando-se os sinais (20 ms) do tempo aos 9 minutos anteriores à contaminação (figura 50), do tempo 9 minutos após contaminação (figura 51) e do tempo final de exposição ao contaminante (180 minutos após contaminação – figura 52).

Podem-se observar poucas diferenças evidentes nos sinais das figuras 50 e 52, porém na figura 51 que representa o tempo de 9 minutos pós-contaminação (pico), há uma modificação no padrão do gráfico com relação às escalas mais baixas, que representam os valores de freqüências mais altos (indicação pela seta cor preta).

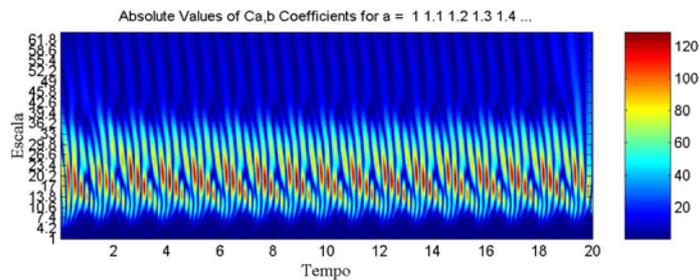


Figura 50 – Wavelet para sinal 9' pré-contaminação.

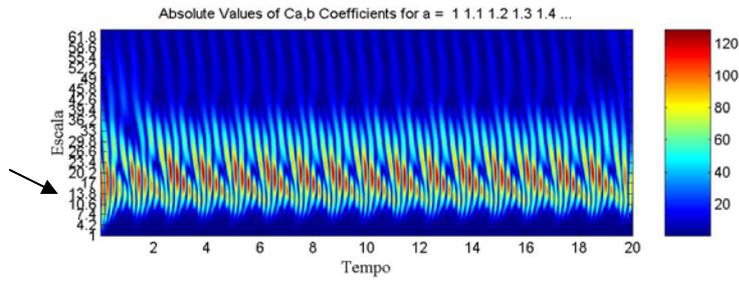


Figura 51 – Wavelet para sinal 9’ pós-contaminação.

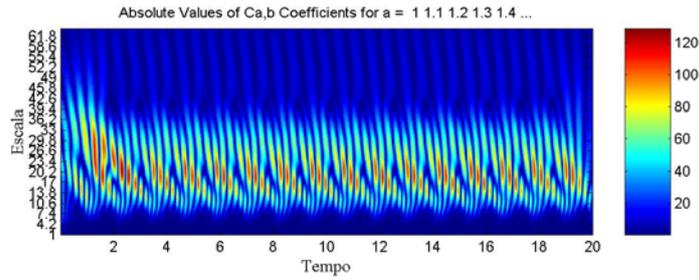


Figura 52 – Wavelet para sinal 180’ pós-contaminação.

Na figura 53 estão representadas as variações das frequências fundamentais captadas por meio do Fluke Scopemeter 196. Em vermelho os valores das frequências instantâneas do peixe 6 sob concentração de 100 mg/L BTX; em amarelo do peixe 4 sob concentração de 100 mg/L BTX + etanol, em verde do peixe 1 sob concentração de 10 mg/L BTX e em azul do peixe 1 do Grupo I do experimento da “normal” (como referência).

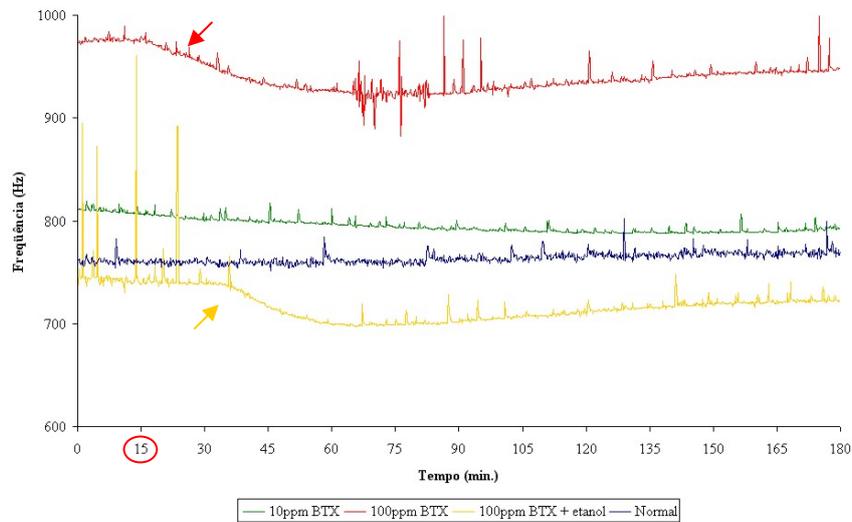


Figura 53 – Variações na frequência – no círculo vermelho (15’) contaminação (exceto Normal).

Nota-se no gráfico da figura 53, a evidente queda dos valores das frequências fundamentais dos peixes submetidos ao contaminante, principalmente dos peixes submetidos à concentração de 100 mg/L de BTX (seta vermelha e seta amarela). E mesmo com a variação sutil das frequências fundamentais do peixe submetido à concentração de 10 mg/L (traço de cor verde), é notória esta variação com relação ao comportamento de outro peixe (traço de cor azul) sem a presença do contaminante (em água boa, situação “normal”).

Utilizando-se como um exemplo da aplicação dos métodos de CRP o peixe 6 do experimento com concentração de 100 mg/L de BTX (*A. hasemani* de mais alta frequência registrado para este estudo – macho imaturo 152 mm, peixe com resposta mais evidente e rápida, entre os peixes testados), seguem abaixo os gráficos: na figura 54 A. o PSD para o sinal; na figura 54 B. o PSD para o sinal filtrado; na figura 55 a auto-recorrência do sinal filtrado aos 9 minutos pré-contaminação e a auto-recorrência do sinal filtrado aos 180 minutos pós-contaminação; a *cross*-recorrência entre os sinais filtrados “normais” (9 e 3 minutos pré-contaminação) na figura 56 e a *cross*-recorrência entre 9 minutos pré-contaminação e 180 minutos pós-contaminação; na figura 57 a *cross*-recorrência entre 9 minutos pré-contaminação e 9 minutos pós-contaminação (início da queda brusca dos valores das frequências) e a *cross*-recorrência entre 9 minutos pré-contaminação e 66 minutos pós-contaminação (sinais com alta oscilação).

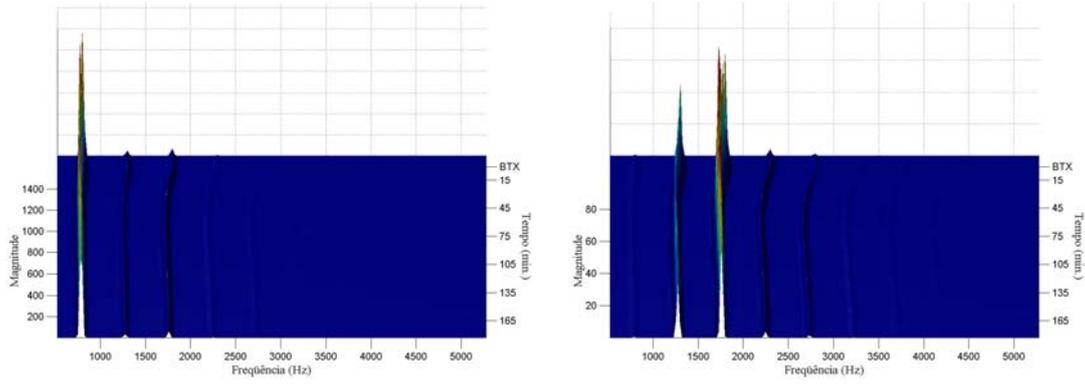


Figura 54 – PSD para o sinal (A.) e PSD para sinal filtrado (B.) (peixe 6 100 mg/L).

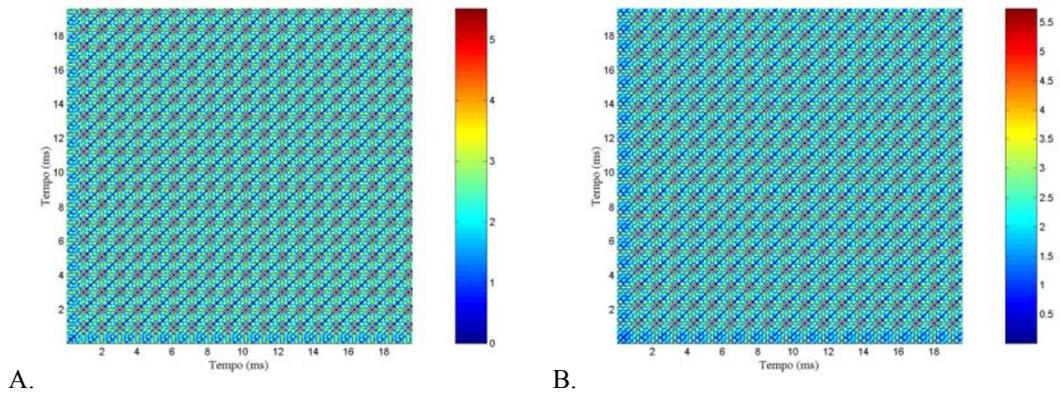


Figura 55 – AR 9' pré-contaminação (A.) e AR 180' pós-contaminação (B.).

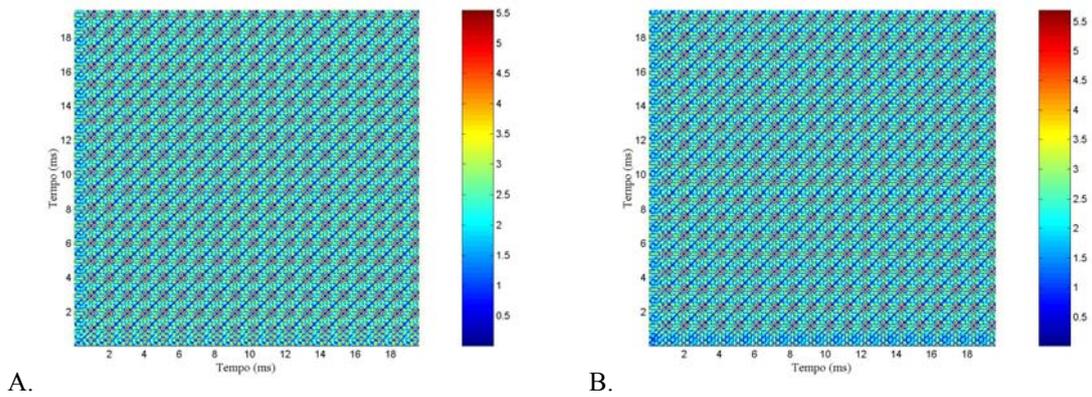


Figura 56 – CRP “normal” (-9' e -3') (A.) e CRP entre -9' e 180' (B.).

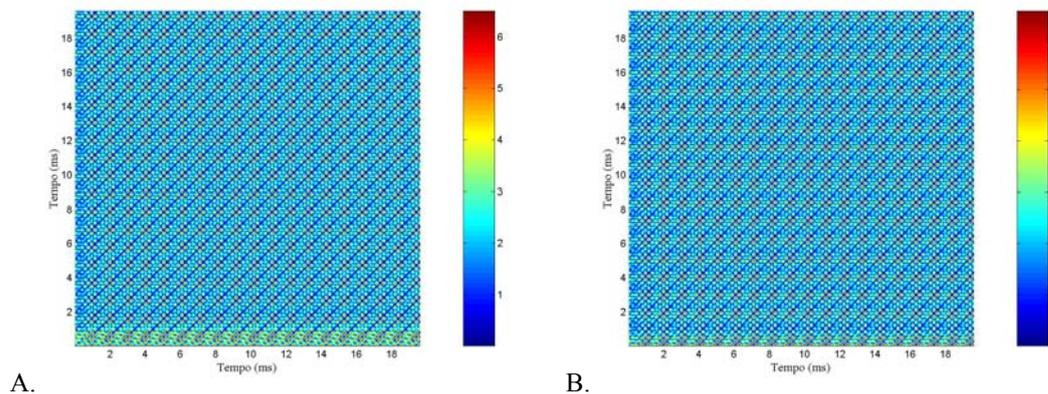


Figura 57 – CRP entre -9' e 9' (A.) e CRP entre -9' e 66' (B.).

A análise quantitativa de *cross*-recorrência (na dimensão 3 e tempo de atraso 10) foi avaliada somente para os valores dos sinais sem filtragem, utilizando-se os valores de desvio de 23,58% para a recorrência, de 1,35% para o determinismo, de 85,67% para a divergência e de 26,08% para a entropia.

Para muitos sinais filtrados, com exceção dos valores de recorrência (taxa de recorrência) os outros valores avaliados pela CRQA não eram calculados pelo algoritmo do *Toolbox* CRP; e não foi possível resolver este problema em tempo de finalizar este trabalho. Porém, os dados avaliados por meio da CRQA com os valores integrais dos sinais foram representativos e os dados obtidos para os peixes 1 e 2 de 10 mg/L BTX, 1 e 2 de 20 mg/L BTX, 5 e 6 de 100 mg/L BTX, e, 3 e 4 de 100 mg/L BTX + etanol podem ser avaliados nas tabelas 11 a 13.

Os dados da primeira tabela (11) se reportam aos peixes em condições “normais”, *cross*-recorrência dos sinais aos 9 e aos 3 minutos pré-contaminação. Na seguinte tabela (12) estão os dados de desvio padrão, calculados a partir das porcentagens obtidas do experimento do padrão “normal” com relação aos valores médios da pré-contaminação para cada sinal. Na tabela 13 os valores de *cross*-recorrência dos sinais pós-contaminação (0' aos 180'); asterisco (*) após o número

indica que o referido valor está acima, dois asteriscos (**) que está abaixo e três asteriscos (***) que está nos limites do desvio padrão da “normal”.

Tabela 11 – CRQA para “normal” (-9’ e -3’).

Peixe	Recorrência	Determinismo	Divergência	Entropia
#1 10mg/L	0,01611	0,94424	0,00621	0,84984
#2 10mg/L	0,01064	0,75646	0,02777	1,25900
#1 20mg/L	0,00832	0,79462	0,01851	2,11290
#2 20mg/L	0,01374	0,96492	0,01369	1,93390
#5 100mg/L	0,01228	0,92634	0,03031	2,29950
#6 100mg/L	0,01646	0,93542	0,00438	0,77895
#3 100mg/L + etanol	0,00331	0,90036	0,01851	1,50880
#4 100mg/L + etanol	0,01398	0,90425	0,00769	1,08500
%DP (n)=	23,58 %	1,35 %	85,67 %	26,08 %

DP = Desvio padrão.

Tabela 12 – Valores do desvio padrão CRQA da “normal”.

Peixe	Recorrência DP	Determinismo DP	Divergência DP	Entropia DP
#1 10mg/L	0,00380	0,01272	0,00532	0,22165
#2 10mg/L	0,00251	0,01019	0,02380	0,32836
#1 20mg/L	0,00196	0,01070	0,01587	0,55107
#2 20mg/L	0,00324	0,01299	0,01174	0,50438
#5 100mg/L	0,00290	0,01248	0,02596	0,59973
#6 100mg/L	0,00388	0,01260	0,00376	0,20316
#3 100mg/L + etanol	0,00078	0,01213	0,01587	0,39351
#4 100mg/L + etanol	0,00330	0,01218	0,00659	0,28298

DP = Desvio padrão.

Tabela 13 – CRQA para período pós-contaminação (0’ e 180’).

Peixe	Recorrência	Determinismo	Divergência	Entropia
#1 10mg/L	0,01574	0,93162***	0,01176*	1,26920*
#2 10mg/L	0,00937***	0,7676*	0,03225	1,45800***
#1 20mg/L	0,00511**	0,70372**	0,04167*	2,61080***
#2 20mg/L	0,01376	0,97576***	0,01219	1,85340
#5 100mg/L	0,01347***	0,9283	0,02000	1,96010
#6 100mg/L	0,00939**	0,88366**	0,02778*	2,05920*
#3 100mg/L + etanol	0,01075*	0,90706***	0,01859	1,57010
#4 100mg/L + etanol	0,00997**	0,85031**	0,02000*	1,82430*

Observando os valores expressos na tabela 13, e reportando-se novamente ao peixe 6 100 mg/L, e, de acordo com os resultados obtidos com este peixe também por

outras avaliações, conclui-se que baixos valores das taxas de recorrência e determinismo, altos valores de divergência e entropia são resultantes de sinais diferentes, e neste caso, em se tratando de sinais estáveis, pode-se inferir como resultados de uma instabilidade maior do sinal. A ocorrência de variações nos valores das medidas de complexidade, chegando aos limites do desvio padrão estipulado (padrão com grande margem de segurança), ao se tratar de osciladores extremamente estáveis, denota ocorrência na variação do sinal possível de ser percebida por sistemas computacionais.

Considerando os resultados obtidos com as diferentes técnicas de análise de sinais utilizadas, pode-se inferir sobre a viabilidade do desenvolvimento de um sistema de biomonitoramento com peixes elétricos da espécie *A. hasemani* para detecção de compostos BTX: *A. hasemani* detecta diferentes concentrações de compostos BTX, manifestando com alterações em suas D.O.Es. possíveis de serem modeladas.

5.4 Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho poderiam expressar em quantos minutos, em média, para um determinado “n” de peixes, estes detectam tal contaminante. Porém, a ênfase foi em busca de respostas para uma pergunta aparentemente mais simples: como “ver” a detecção de certa concentração de um contaminante expressa por um peixe elétrico por meio das suas D.O.Es.?

E, como já discutido no Capítulo 3, fazendo-se menção aos trabalhos de Thomas *et al.* (1996a; 1996b), procurou-se ir além do universo das frequências e além de uma análise criteriosa em função de “dose / resposta”.

Sempre houve preocupações no sentido de expressar similaridades e diferenças sutis em sinais de peixes elétricos, por meio de transformadas, cálculos de integração e/ou representações polinomiais das formas das ondas. E, com o estudo para o biomonitoramento com peixes elétricos de alta estabilidade das D.O.Es., como os da família Apterontidae, aumentou-se consideravelmente a complexidade exigida na avaliação das similaridades e diferenças nos sinais.

Apesar de recente (Eckmann *et al.*, 1987), e embrionária ao se tratar de peixes elétricos, a análise de recorrência apresentou-se como uma ferramenta capaz de elucidar aspectos inatingíveis das D.O.Es mediante a utilização de outros métodos de análise de sinais. Expressando graficamente particularidades específicas de sinais aparentemente idênticos de peixes de uma mesma espécie, porém de indivíduos diferentes. Ao se tratar de relações intra-específicas dos sinais para avaliações sistemáticas, a análise de recorrência pode vir a ser uma ferramenta imprescindível.

Quanto aos sistemas de biomonitoramento a análise quantitativa de recorrência merece maiores investigações para melhor se formatar as medidas de complexidade (taxa de recorrência, determinismo, divergência, entropia e tendências) de acordo com os padrões de estabilidade dos sinais dos peixes elétricos monitorados. A representação numérica da análise da recorrência pode ser tão acessível quanto a frequência é atualmente. Poder-se-ia representar as D.O.Es. de um peixe não somente em valores de frequência – a frequência fundamental deste peixe é 810 Hz; mas também, por exemplo, em valores de recorrência – a taxa de recorrência deste peixe é 0,015. Com mais parâmetro para análise poder-se-ia ver mais detalhes de um mesmo sinal.

As considerações temporais das D.O.Es. avaliadas por meio das transformadas de ondeletas (*Wavelet's*) também merecem mais estudos. Uma proposta para o

desenvolvimento de uma “ondeleta mãe” específica para cada padrão diferente (pulso, onda) das D.O.Es de peixes elétricos, poderia acrescentar mais um poderoso ferramental de análise de sinais para estes peixes. Ainda mais, em se tratando de sistemas de biomonitoramento em “tempo real”, pois este é um método extremamente sensível às variações dos sinais em função tempo, e, apresenta uma resposta de cálculo rápida.

A implementação de filtros digitais para a avaliação das D.O.Es. de Apterontidae foi muito eficiente para a demonstração de variações mais sutis mascaradas pela predominância da frequência fundamental. É comum em outros sistemas que envolvem análises de sinais a utilização de filtros para a avaliação de diferentes partes do espectro do sinal. Thomas *et al.* (1996a; 1996b; 1997) avaliaram em separado as frequências da fundamental e das harmônicas que compuseram D.O.Es. de espécimes *A. albifrons*, demonstrando que alterações ocorrem de forma coincidente, porém não similar, em níveis de frequência além da fundamental.

Com a utilização de filtros digitais pode-se inferir sobre variações nas frequências das D.O.Es em bandas específicas, estudando-se, por exemplo, se existe em peixes elétricos bandas de frequência onde as variações são mais intensas com a adição de um certo contaminante ou com a variação da temperatura, etc.. Alguns sistemas de telecomunicações utilizam uma frequência padrão para propagação dos sinais enquanto que nas outras frequências que compõem o espectro do sinal as informações são carregadas.

É de conhecimento geral, que diferentes espécies de peixes elétricos apresentam diferentes padrões de D.O.Es., principalmente em Apterontidae, nas quais as variações em frequência compreendem a maior faixa (de menos de 800 a mais de 2000 Hz, Alves-Gomes, 1997). Suponha-se que as características espécie-

específicas das D.O.Es. sejam maneiras de restringir a comunicação intra-específica, e mais, estas frequências contêm informações em diferentes bandas de frequência. Com a modelagem dos sinais por meio da implementação de filtros digitais, poder-se-ia inferir sobre aspectos dos sinais que passam despercebidos.

A espécie *A. hasemani*, com o sistema de aquisição, processamento e análise de sinais avaliados neste estudo, é capaz de fornecer por meio das D.O.Es. informações suficientes para se compor um sistema de alerta ambiental. Ficou evidente que na presença de 10 mg/L de BTX ocorre alterações nas D.O.Es. de *A. hasemani*.

Com exceção das avaliações da concentração de 2 mg/L, na maioria dos outros peixes houve o decréscimo no valor das frequências das D.O.Es.. As concentrações menores que 10 mg/L de BTX necessitam do desenvolvimento de técnicas físico-químicas, para serem utilizadas nos experimentos com peixes elétricos, que potencializem a diluição e que não alterem significativamente as características ou concentração do composto.

Ainda com relação aos experimentos com 2 mg/L de BTX acredita-se não ter atingido resultados coerentes, pois é muito provável não ter ocorrido uma difusão eficiente do contaminante, e, em função da aeração constante possa ter havido alguma reação oxidativa alterando a composição ou mesmo promovendo a volatilização. Embora tenha se observado o aumento (e não a diminuição) da média das frequências das D.O.Es. pós-contaminação em relação as D.O.Es. pré-contaminação, optou-se em deixar estas respostas em aberto, para futuras investigações.

Thomas *et al.* (1996a) demonstraram que as D.O.Es. de *A. albifrons* aumentam em uma média de 25 Hz durante a fase de intoxicação por 125 µg/L de Cianeto de Potássio, fato a se considerar, pois o aumento dos valores médios das D.O.Es. do

período pré-contaminação para pós-contaminação, com a concentração de 2 mg/L de BTX para *A. hasemani*, foi em média de 9,8 Hz, com a variação máxima de até 20 Hz. O efeito fisiológico registrado para os compostos BTX em organismos vertebrados é o de afetar o sistema nervoso central (ASTDR, 1999), em consequência, avalia-se diminuição da frequência das D.O.Es.. Porém, nas concentrações de 2 mg/L em peixes da espécie *A. hasemani*, pode ser que este efeito inibidor não ocorra, e a variação para mais das D.O.Es. seja um indicativo de detecção do contaminante. Mas, de fato, se responderá com mais segurança com futuras investigações.

Outro fator relevante a ser discutido é maior sensibilidade, ou o que é o caso, maior variabilidade das D.O.Es. dos peixes com frequência de D.O.Es. mais altas. Segundo Cox-Fernandes & Podos (2004), para espécimes de *A. hasemani* foram observadas D.O.Es. mais altas em peixes de maior tamanho e machos, além de ser discutida a hipótese de que características hormonais em diferentes estágios de maturidade para esta espécie podem interferir nas características das D.O.Es.

Além do que, acrescentando às observações de Crampton (1998a), que considera os peixes elétricos com sinais tipo onda, como mais sensíveis às mudanças ambientais por terem uma demanda energética total menos flexível. Este fato poderia ser avaliado em Apterontidae em relação a maior frequência das D.O.Es., se considerar que para produzir estas altas D.O.Es. a demanda energética seja maior do que para os peixes de frequências mais baixas das D.O.Es., portanto, estes com frequências mais altas apresentam maior sensibilidade às mudanças ambientais.

E finalmente, considerações positivas quanto as possibilidades de aplicações reais de sistemas de alerta ambiental por meio das características biofísicas das D.O.Es. de *A. hasemani* são defendidas. Embora se admita que alterações na idéia básica de biomonitoramento com peixes elétricos devam ser conduzidas para mais

discussões. O estudo de processamento de sinais de peixes elétricos deve ser enfatizado. E, o avanço das técnicas de aquisição e processamento de sinais merece uma atenção especial daqueles que se dedicam às questões ecológicas, fisiológicas, enfim da biologia de peixes elétricos, como também, os pesquisadores das áreas tecnológicas precisam ver nos peixes elétricos possibilidades para o desenvolvimento de artificios bioinspirados.

Precisam-se ver peixes elétricos como vêm os peixes elétricos!

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO

Em função da frequência de captura nas áreas de coleta próximas à Manaus – AM, adaptabilidade ao cativeiro, resistência às condições de trabalho e estabilidade das D.O.Es. *Apteronotus hasemani* foi a espécie de Apterontidae selecionada para este estudo (conforme discutido no Capítulo 2). Estipulou-se patamares para a formatação de um padrão “normal” das D.O.Es. para *A. hasemani* (apresentado no Capítulo 4). A viabilidade do desenvolvimento de sistemas de biomonitoramento para hidrocarbonetos de petróleo por meio da detecção de compostos BTX pela análise das D.O.Es. de peixes da espécie *A. hasemani* (Apterontidae) deve ser considerada; esta posituação fundamenta-se nos resultados obtidos neste estudo e, foram discutidos no Capítulo 5. Portanto:

- A utilização da metodologia de análise de sinais Transformada de *Wavelet's* não demonstrou eficiência maior do que a análise espectral por meio das Transformadas de Fourier; ficando evidente a necessidade de se estipular padrões de *Wavelet* específicos para peixes onduladores.
- Análise de Recorrência demonstrou grande sensibilidade às variações dos sinais de *A. hasemani*, podendo ser um método complementar às análises tradicionais para os sinais de peixes elétricos.
- Pode-se inferir com segurança que *A. hasemani* detecta BTX em concentrações a partir de 10 mg/L.
- *A. hasemani* tende a ser um modelo para estudos em biomonitoramento na região da Amazônia brasileira.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, J.S.. 2003. Apterontidae (Ghost knifefishes). In: R. E. Reis, S. O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (Eds.) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS. Porto Alegre, RS. p. 497-502.
- Alves-Gomes, J.A. 1998. The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* and *Archolaemus* (Ostariophysi; Gymnotiformes) according to 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. In: L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena, and C. A. S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. EDIPUCRS. Porto Alegre, RS. p. 447-460.
- Alves-Gomes, J. A. 1997. Informações preliminares sobre a bio-ecologia de peixes elétricos (Ordem Gymnotiformes) em Roraima. In: Barbosa R. I.; Ferreira E. J. & Costellón E. G. (Eds.). *Homem, ambiente e Ecologia no Estado de Roraima*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM.
- Alves-Gomes, J. A. 1999. Systematic biology of gymnotiform and mormyiform electric fishes: phylogenetic relationships. Molecular clocks and rates of evolution in the mitochondrial rRNA genes. *J. Exp. Biol.*, 202: 1167-1183.
- Alves-Gomes, J. A. 2001. The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective. *Journal of Fish Biology*, 58: 1489-1511.
- Alves-Gomes, J. A.; Ortí, G.; Haygood, M.; Meyer, M.; Heiligenberg, W. 1995. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: A synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 12 (2): 298-318.

- Amorim Jr., H.P.; Levy, A.F.S.; Lima, A.G.G. 1999. Transformadas *Wavelets* aplicadas no reconhecimento de descargas parciais em equipamentos elétricos. *XV SNPTEE*. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. 6 p.
- Ardanaz, J. L.; Silva, A.; Macadar, O. 2001. Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*. *J. Comp. Physiol A.*, 187: 853-864.
- Assad, C.; Rasnow, B.; Stoddard, P. K. 1999. Electric Organ Discharges and Electric Images during Electrolocation. *The Journal of Experimental Biology*, 202: 1185-1193.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1993. Toxicological Profile for Xylene. *Public Health Service*.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1997. Toxicological Profile for Benzene. *Public Health Service*.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1999. Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH). *Public Health Service*.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2000. Toxicological Profile for Toluene. *Public Health Service*.
- Baird, C. 2002. *Química Ambiental*. 2 ed. Bookman, Porto Alegre. 622 p. ISBN 85-363-0002-7
- Barletta, M. 1995. Estudo da comunidade de peixes bentônicos em três áreas do canal principal, próximo à confluência dos rios Negros e Solimões. *In: Projeto Piaba*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM.

- Bastian, J. 1981a. Electrolocation: I. How the electroreceptors of *Apteronotus albifrons* code for moving objects and other electrical stimuli. *J. Comp. Physiol.*, 144: 465-479.
- Bastian, J. 1981b. Electrolocation: II. Effects of moving objects and other electrical stimuli on the activities of two categories of Posterior Lateral Line Lobe Cells in *Apteronotus albifrons*. *J. Comp. Physiol.*, 144: 481-494.
- Bastian, J. 1994. Electrosensory organisms: By detecting weak electric fields from animate or inanimate sources, many aquatic animals acquire information used for orientation, communication and other critical behavior. *Physics Today*, p. 30-37.
- Bennett, M.V.L. 1971. Electroreception. In: Hoar, W. S. & Randall, D. J. (Eds.) *Fish Physiology*, Vol. 5. New York, Academic Press. p 493-574.
- Bleckmann, H.; Schmitz, H.; Von der Emde, G. 2004. Nature as a model for technical sensors. *J Comp Physiol A*, 190: 971-981.
- 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.
- Bullock, T. H. 1999. The future of Research on Electroreception and Electrocommunication, *The Journal of Experimental Biology*, 202: 1455-1458.
- Bullock, T. H.; Heiligenberg, W. F. 1986. Electroreception. New York: Wiley-Interscience 722 p.
- Bullock, T.H.; Fernandes-Souza, N.; Graf, W.; Heiligenberg, W.; Langner, G.; Meyer, D.L.; Pimentel-Souza, F.; Scheich, H.; Viancour, T.A. 1979. Aspectos do uso da

Descarga do Órgão Elétrico e Eletorrecepção nos *Gymnotoidei* e outros peixes Amazônicos. *Acta Amazonica*, 9 (3): 549-572.

Capurro, A. & Malta, C. P. 2004. Noise Autocorrelation and Jamming Avoidance Performance in Pulse Type Electric Fish. *Bulletin of Mathematical Biology*. 66: 885-905.

Casdagli, M.C. 1997. Recurrence plots revisited. *Physica D*, 108: 12-44.

Chagas, C. & Carvalho, A. P. 1961. Bioelectrogenesis: a comparative survey of its mechanisms with particular emphasis on electric fishes. Elsevier Publishing Company. 413p.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. 1986. Resolução N° 20 - 18 de junho de 1986. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, DF.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2000. Resolução N° 273 - 29 de novembro de 2000. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, DF.

CONCAWE – Conservation of Clean Air and Water in Europe. 1988. Ecotoxicology of Petroleum Products. A Review of Published Literature. Brussels: Office of Conservation of Clean Air and Water in Europe, *Report*, n. 88/60.

CONCAWE – Conservation of Clean Air and Water in Europe. 1992. Product Dossier. Brussels: Office of Conservation of Clean Air and Water in Europe, n. 92/103.

CONCAWE – Conservation of Clean Air and Water in Europe. 2002. Environmental Classification of Petroleum Substances – Summary data and rationale. Brussels: Petroleum Products Ecology Group, *Report*, n. 01/54.

- Corseuil, H. X. & Fernandes, M. 1999. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na Gasolina brasileira. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 4 (1 e 2): 71-75.
- Cox-Fernandes, C. & Podos, J. 2004. Sobre a Descarga do Órgão Elétrico do sarapó *Apteronotus hasemani* (Gymnotiformes: Apteronotidae). p. 146-155. In: Cintra, R. (Coord.). *História Natural, Ecologia e Conservação de Algumas Espécies de Plantas e Animais da Amazônia*, Manaus: EDUA, 330 p.
- Cox-Fernandes, C. 1995. Diversity, distribution and community structure of electric fishes (Gymnotiformes) in the channels of the Amazon river system, Brazil. Ph.D. Thesis. Duke University. North Carolina.
- Cox-Fernandes, C. 1998. Sex-related morphological variation in two species of Apteronotid fishes (Gymnotiformes) from Amazon River Basin. *Copeia*, 3: 730-735.
- Cox-Fernandes, C.; Podos, J.; Lundberg, J.G. 2004. Amazonian Ecology: Tributaries Enhance the Diversity of Electric Fishes. *Science*, 305: 1960-1962.
- Crampton, W.G.R. & Albert, J.S. 2005. Evolution of electric signal diversity in gymnotiform fishes. In: Communication in Fishes (Eds. F. Ladich, S.P. Collin, P. Moller & B.G Kapoor). *Science Publishers Inc.*, Enfield, NH. *In press*.
- Crampton, W. G. R. 1996. Gymnotiform fish: an important component of Amazonian flood plain fish communities. *Journal of Fish Biology*, 48: 298-301.
- Crampton, W. G. R. 1998a. Effects of anoxia on the distribution, respiratory strategies and electric signal diversity of gymnotiform fishes. *Journal of Fish Biology*, 53 (Supplement A): 307-330.

- Crampton, W. G. R. 1998b. Electric Signal Design and Habitat Preferences in a Species Rich Assemblage of Gymnotiformes Fishes from the Upper Amazon Basin. *An. Acad. Bras. Ci.*, 70 (4): 805-847.
- de Santana, C. D. 2002. “Apteronotus” sensu stricto (Gymnotiformes: Apteronotidae): *monofiletismo, sistemática, e diversidade subestimada em peixes elétricos Neotropicais*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brasil. 394p.
- de Santana, C. D. 2003 *Apteronotus caudimaculosus* n. sp. (Gymnotiformes: Apteronotidae), a sexually dimorphic black ghost knifefish from the Pantanal, Western Brazil, with a note on the monophyly of the *A. albifrons* species complex. *Zootaxa*, 252: 1-11.
- de Santana, C. D.; Maldonado-Ocampo, J. A.; Severi, W. & Mendes, G. N. 2004 *Apteronotus eschmeyeri*, a new species of ghost knifefish from the Magdalena Basin, Colombia (Gymnotiformes: Apteronotidae). *Zootaxa*, 410: 1-11.
- de Santana, C. D. & Maldonado-Ocampo, J. A. 2004. Redescription of *Apteronotus mariae* (Eigenmann & Fisher, 1914) and the taxonomic status of *Apteronotus jurubidae* (Fowler, 1944) (Gymnotiformes: Apteronotidae). *Zootaxa*, 632: 1-14.
- Eckmann, J.P.; Kamphorst, S.O.; Ruelle, D. Recurrence Plots of Dynamic-Systems. *Europhysics Letters*, 4 (9): 973-977.
- Enger P. S.; Szabo T. 1968. Effects of temperature on discharge rate of the electric organ of some gymnotids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 27:625-627.
- EPA - Environmental Protection Agency. 2003. National Primary Drinking Water Standards. Office of Water. EPA 816-F-03-016. jun. 2003.

- Faure, P. & Korn H. 1998. A new method to estimate the Kolmogorov entropy from recurrence plots: its application to neuronal signals. *Physica D*, 122: 265-279
- Ferreira, H. M. 1953. Influência da temperature na Descarga Elétrica do *Electrophorus electricus* (Linnaeus). *An. da Acad. Brasileira de Ciências*, 25 (3): 267-276.
- Franchina, C. R. 1997. Ontogeny of the electric organ discharge and the electric organ in the weakly electric pulse fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (Hipopomidae, Gymnotiformes). *Journal Comparative Physiology A*, vol. 181, p. 11-119.
- Garcia, M. 1995. Aspectos ecológicos dos peixes das águas abertas de um lago no arquipélago das Anavilhanas, Rio Negro, AM. Dissertação de Mestrado. INPA/UFAM, Amazonas-Brasil. 95 p.
- Geller, W. 1984. A toxicity warning monitor using the weakly electric fish “*Gnathonemus petresi*”. *Water Resources*, 18 (10): 1285 -1290.
- Grove, P.; Moller, P. 1979. Electric Fishes as a Tool for Water Quality Assessment. *Transactions of the American Fisheries Society*, 108: 420-421.
- Hagedorn, M. & Heiligenberg, W. F. 1985. Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. *Anim. Behav.*, 33: 254-265.
- Heiligenberg, W. F. & Bastian, J. 1980. Species specificity of Electric Organ Discharges in sympatric Gymnotoid fish of the Rio Negro. *Acta Biol. Venez.*, 10 (2): 187-203.
- Heiligenberg, W. F. 1993. Eletrosensation. Cap. 5, p.137 In: Evans, D. H. (Ed.). *The Physiology of Fishes*. Marine Science Series, Londres: Boca Raton, 592 p. ISBN 0 8493 8042 1

- Hopkins, C. D. 1995. Convergent designs for electrogenesis and electroreception, *Current Opinion in Neurobiology*, 5 (6): 769-777.
- Hopkins, C. D.; Heiligenberg, W. F. 1978. Evolutionary designs for electric signals and electroreceptors in Gymnotoid fishes of Surinam. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, vol. 3, p. 135-162.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. 2003. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 25 dez. 2003.
- Kay, A. N. & Lewis, J. W. 1993. Fish monitors and role of electric fish as potential indicators of water quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 9: 110 - 114.
- Kirschbaum, F. 1983. Myogenic Electric Organ Precedes the Neurogenic Organ in Apterodontid Fish. *Naturwissenschaften*, 70: 205-206.
- Kirschbaum, F. 1995. Discharge types of gymnotiform fishes. Cap. 8.3 p171 In: Moller, P. *Electric Fishes – History and behavior*. Fish and Fisheries Series 17. 5 ed. New York: Chapman & Hall, 584p. ISBN 0 412 37380 7
- Knudsen, E. I. 1974. Behavioral thresholds to electric signals in high frequency Electric Fish. *J. Comp. Physiol.*, 91: 333-353.
- Knudsen, E. I. 1975. Spatial Aspects of the Electric Fields Generated by Weakly Electric Fish. *J. Comp. Physiol.*, 99: 103-118.
- Kramer, B. 1999a. Mechanisms of signal analyses in *Eingenmannia* (Gymnotiformes): The Jamming Avoidance Response and communication. p. 277-291. In: Val, A. L. and Almeida-Val, V. M. F. (Eds). *Biology of Tropical Fishes*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM.

- Kramer, B. 1999b. Waveform discrimination, phase sensitivity and jamming avoidance in a wave-type electric fish. *J. Exp. Biol.*, 202: 1378 - 1398.
- Kunze, P. & Wezstein, H.U. 1987. Apomorphine and haloperidol influence electric behaviour of a mormyrid fish. *Z. Naturforsch.* 43, 105-107.
- Lewis J. W. & Kay A. N. 1991. The effect of Temperature on electric organ activity in 2 species of *Gnathonemus* (Family Mormyridae). *Environmental Technology*, 12 (9): 815-819.
- Lewis, J. W.; Kay A. N.; Hanna, N. S. 1992a. Responses of Electric Fish *Gnathonemus-Tamandua* (family Mormyridae) to Changes in pH. *Environmental Technology*, 13 (8): 701-705.
- Lewis, J. W.; Kay A. N.; Hanna, N. S. 1992b. Responses of Electric Fish (family Mormyridae) to Chemical-Changes in Water-Quality .1. Cyanide. *Environmental Technology*, 13 (12): 1169-1174.
- Lewis, J. W.; Kay A. N.; Hanna, N. S. 1993. Responses of Electric Fish (family Mormyridae) to Chemical-Changes in Water-Quality .2. Pesticides. *Environmental Technology* 14 (12): 1171-1178.
- Lewis, J. W.; Kay A. N.; Hanna, N. S. 1994. Responses of Electric Fish (family Mormyridae) to Chemical-Changes in Water-Quality .3. Heavy-Metals. *Environmental Technology*, 15 (10): 969-978.
- Lewis, J. W.; Kay A. N.; Hanna, N. S. 1995. Responses of Electric Fish (family Mormyridae) to Inorganic Nutrients and Tributyltin Oxide. *Chemosphere*, 31 (7): 3753-3769.
- MacIver, M. A. & Nelson, M. E. 2000. Body modeling and model-based tracking for neuroethology. *Journal of Neuroscience Methods*, 95:133-143.

- MacIver, M. A. & Nelson, M. E. 2001. Towards a Biorobotic Electrosensory System. *Autonomous Robots*, 11: 263-266.
- MacIver, M. A. 2001. The computational neuroethology of weakly electric fish: Body modeling, motion analysis, and sensory signal estimation. Ph.D. Thesis. University of Illinois at Urbana-Champaign. 187 p.
- MacIver, M. A.; Fontaine, E.; Burdick, J. W. 2004. Designing Future Underwater Vehicles: Principles and Mechanisms of the Weakly Electric Fish. *IEEE Journal of Oceanic Engineering*. vol. 29, n. 3.
- Mago-Leccia, F. 1994. *Electric fishes of continental waters of America*. FUDECI. 207 p.
- Manahan, S. E. 2000. *Environmental Chemistry*. 7 ed. Florida: Lewis Publishers, 898 p. ISBN 1 56670 492-8
- Marrero, C. & Taphorn, D. 1991. Notas sobre la historia natural y la distribución de los peces Gymnotiformes en la cuenca del río Apure y otros ríos de la Orinoquia. *Biollania*, (8): 123-142.
- Marwan, N. 2004. Cross Recurrence Plot Toolbox for Matlab - Reference Manual. Version 4.8, Release 18. Nonlinear Dynamics Group University of Potsdam. Potsdam, DE.
- Marwan, N. 2003. Encounters with Neighbours: Current Developments of Concepts Based on Recurrente Plots and Their Applications. Ph.D. Thesis. University Postdam. Germany.
- Ministério da Fazenda. 2002 - Decreto nº 4.542 de 26 de dezembro de 2002: Tabela de Incidência do Imposto sobre Produtos Industrializados – TIPI. Cap. 27 - *Combustíveis minerais, óleos minerais e produtos da sua destilação; matérias*

betuminosas; ceras minerais. Notas de Subposições 3. Disponível em:

<<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/decretos/2002/dec4542.htm>>.

Acesso em: 15 fev. 2004.

Misiti, M.; Misiti, Y; Oppenheim, G.; Poggi, J. M. 1996. *Wavelet Toolbox User's Guide*. vol. 1. MathWorks.

Moller, P. 1995. Electric Fishes – History and behavior. Fish and Fisheries Series 17, 5 ed. New York: Chapman & Hall, 584 p. ISBN 0 412 37380 7.

Moller, P. 2002. Multinodal sensory integration in weakly electric fish: a behavior account. *Journal of Physiology - Paris*, 96: 547-556.

Moortgat, K. T.; Bullock, T. H; Sejnowski, T. J. 2000. Precision of the Pacemaker Nucleus in a Weakly Electric Fish: Network Versus Cellular Influences. *Journal of Neurophysiology*, 83: 971-983.

Moortgat, K. T.; Keller, C. H. Bullock, T. H; Sejnowski, T. J. 1998. Submicrosecond pacemaker precision is behaviorally modulated: The gymnotiform electromotor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4684-4689.

Nelson, M. E. & MacIver, M. A. 1999. Prey capture in the weakly electric fish *Apteronotus albifrons*: sensory acquisition strategies and electrosensory consequences. *The Journal of Experimental Biology*, 202: 1195-1203.

Nelson, M. E.; MacIver, M. A.; Coombs, S. 2002. Modeling Electrosensory and Mechanosensory Images during the predatory behavior of weakly electric fish, *Brain Behav Evol*, 59:199-210.

Peters, R.C.; Bretschneider, F.; Loos, W. J. G. E; Neumam, I. S. A. 1993. Eletro-reception and Aquatic Biomonitoring. In: Jeffrey & Madden (Eds.). *Bioindicators*

and Environmental Mangement. Londres: Academic Press, 2ed. ISBN:0 12 382590 3.

Petry, P.; Bayley, P. B.; Markle, D. F. 2003. Relationships between fish assemblages, macrophytes and environmental gradients in the Amazon River floodplain.

Journal of Fish Biology, 63(3):547-579.

Petrobras, 2003. Petróleo – a ciência de extrair energia da terra. *Scientific American*.

Ed. Especial – Petrobras, 50 anos de inovação. n. 3.

Pimentel-Souza, F. & Fernandes-Souza, N. 1985. Temperature influence and social

interaction on the frequency of electric organ charges in *Rhamphichthys rostratus*.

Acta Amazonica, 15 (1-2): 35-46.

Pimentel-Souza, F. & Siqueira, A.L. 1992. Effect of external carbon dioxide

concentration on the electric organ discharge frequency in the gymnotiform fish

Apteronotus albifrons. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*,

25(2): 175-180.

Pimentel-Souza, F. 1988. Electric Organ Discharge frequencies from two weakly

electric Gymnotiform fish exposed to carbon dioxide, conductivity and pH

changes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21: 119-121.

Pimentel-Souza, F.; Pereira, J. B.; Alvarenga, N. P. 1976. Comportamento,

termorregulação e aclimatação em temperaturas elevadas do peixe elétrico

Gymnotus. *Ciência e Cultura*, 28 (8): 940-944.

Protázio, J. M. B. 2002. Análise wavelet aplicada a sinais geofísicos. Dissertação.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica e

Instituto de Geociências. Campinas, SP. 124 p.

- Rasnow, B. & Bower, J. M. 1996. The Electric Organ Discharge of the gymnotiform fishes: I. *Apteronotus leptorhyncus*. *J. Comp. Physiol A.*, 178: 383-396.
- Rasnow, B. 1996. The effects of simple objects on the electric field of *Apteronotus*. *J. Comp. Physiol A.*, 178: 397-411.
- Rasnow, B.; Assad, C.; Bower, J. M. 1993. Phase and amplitude maps of the Electric Organ Discharge of the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhyncus*. *J. Comp. Physiol A.*, 172: 481-491.
- Rose, G. J. 2004. Insights into neural mechanisms and evolution of behaviour from electric fish. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 5, p. 943-951.
- Schwertner, G. & Alves-Gomes, J. A. 2003. Peixes Elétricos da Amazônia (Gymnotiformes: Apterontidae) como Potencial Biomonitor de Qualidade de Água. *II Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental*. Itajaí, SC.
- Schwertner, G.; Schwertner, A. B. S.; Bucker, A. & Alves-Gomes, J. A. 2004. Investigação do Potencial de Contaminação Aguda por compostos BTX com Peixes Elétricos da Amazônia (*Apteronotus hasemani* – Gymnotiformes). *III Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental*. Brasília, DF.
- Stodard, P. K. 1999. Predation enhances complexity in the evolution of electric fish signals. *Nature*, vol. 400. p. 254-256.
- Thomas, M. 2000. Integrating Physical, Chemical and Biological Monitoring. Security of Public Water Supplies, 107 – 114.
- Thomas, M.; Chrétien, A.; Florion, A.; Terver, D. 1996a. Real-time detection of potassium cyanide pollution in surface waters using electric organ discharges wave emitted by the tropical fish, *Apteronotus albifrons*. *Environmental Technology*, 17:561-574.

- Thomas, M.; Florion, A.; Chrétien, A.; Terver, D. 1996b. Real-time biomonitoring of water contamination by cyanide based on analysis of the continuous electric signal emitted by a tropical fish: *Apteronotus albifrons*. *Water Research*, 30 (12): 3083-3091.
- Thomas, M.; Florion, A.; Chrétien, D. 1997. The effect of pH and conductivity on the electric behaviour of *Apteronotus albifrons* (Family Apterontidae) in a pollution monitoring system. *Environmental Technology*, 18: 1069 - 1083.
- Thomas, M.; Florion, A.; Chrétien, D. 1998. A new warning biomonitor using a weakly electric fish, *Apteronotus albifrons* (Gymnotiformes), and the effect of temperature on the bioelectric responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 51: 605 - 620.
- Torrence, C., Compo, G.P. 1998. A practical guide to wavelet analysis, *Bulletin of the American Meteorological Society*, vol. 79, n. 1, 61 - 78.
- Val, A. L. & Almeida-Val, V. M. F. 1995. Fishes of the Amazon and their environment. *Zoophysiology*, Springer, vol. 32. New York. p. 224.
- Val, A. L. & Almeida-Val, V. M. F. 1999. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. In: Val, A. L. and Almeida-Val, V. M. F. (Eds). *Biology of Tropical Fishes*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM. p.277-291.
- Webber, C. L. & Zbilut, J. P. 1994. Dynamical assessment of Physiological Systems and states using Recurrence Plot Strategies. *Journal of Applied Physiology*, 76 (2): 965-973.
- Zakon, H. H. & Unguez, G. A. 1999. Development and regeneration of the electric organ. *The Journal of Experimental Biology*, 202: 1427–1434.

- Zbilut, J. P.; Giuliani, A.; Webber Jr, C. L. 1998. Detecting deterministic signals in exceptionally noisy environments using cross-recurrence quantification. *Physics Letters A*, 246: 122 - 128.
- Zbilut, J. P.; Giuliani, A.; Webber Jr, C. L. 2000. Recurrence quantification analysis as an empirical test to distinguish relatively short deterministic versus random number series. *Physics Letters A*, 267: 174-178.
- Zbilut, J. P. & Webber, C. L. 1992. Embeddings and delays as derived from Quantification of Recurrence Plots. *Physics Letters A*, 171 (3-4): 199-203.
- Zupanc, M. M.; Engler, G.; Midson, A.; Oxberry, H.; Hurst, L. A. ; Symon, M. R.; Zupanc, G. K. H. 2001. Light–dark-controlled changes in modulations of the electric organ discharge in the teleost *Apteronotus leptorhynchus*. *Animal Behaviour*, 62: 1119-1128.

ANEXOS

ANEXO I

ALGORÍTMOS (*m-files* MATLAB[®])

Obs.: os arquivos foram nomeados da seguinte forma: n° do peixe_ tempo_ concentração de contaminante.extensão (a extensão *.atf é o formato em ASCII dos arquivos provenientes do *software* AxonScope®). Ex.: 6_15_100.atf

```
function LFC

%*****AMAZONASBRASIL*****
% INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
% LABORATÓRIO DE FISILOGIA COMPORTAMENTAL - LFC
%
% LFC.m faz parte de um grupo de algoritmos desenvolvidos ...
% para analisar Descargas do Órgão Elétrico (D.O.E.) ...
% de peixes elétricos da família Aptereronotidae (Gymnotiformes), ...
% a partir de arquivos no formato ASCII.
%
% Converte *.atf em arquivo *.mat.
% Calcula PS. Concatena PS para gráficos.
% PS = power spectrum de densidade para onda.
% p/ Normal (fs=100KHz - 2048 pontos) e ...
% [ ] BTX (fs=50KHz - 1024 pontos), ...
% 'Hanning' (=~20ms).
%
% Desenvolvido por:
% Esp. Eng. Ambiental Gilberto Schwertner Filho.
% 2005
%*****AMAZONASBRASIL*****

clear all;clc;colordef white;

co=input('Entre com [ ] BTX (mg/L): ');
pn=input('Entre com n° do peixe: ');
ti=input('Entre com o tempo inicial (min.): ');
tf=input('Entre com o tempo final (min.): ');
pq=input('Entre com (1) p/Normal e (2) p/ BTX: ');

if pq == 1
    fs=100000;nf=2048;tx=2001;xx=2;
elseif pq == 2
    fs=50000;nf=1024;tx=1035;xx=3;
end;

ext='.atf';

[arq, caminho]=uigetfile('*.atf', 'Arquivo *.atf');
cd(caminho);

PSG=[];HzG=[];
cont=ti;

while cont <= tf
    arq=[num2str(pn) '_' num2str(cont) '_' num2str(co) ext];
    ca=['A11..A' num2str(tx)];
    cb=['B11..B' num2str(tx)];

    tempo=1000*(dlmread (arq,'\t',ca));
    onda=dlmread (arq,'\t',cb);

    [PS,f]=psd(onda,nf,fs);
    [M,I]=max(PS(3:300));
    Hz=(double(f(I)));

    datafile=[arq(1:size(arq,2)-4) '.mat'];
    save (datafile,'onda','tempo','PS','f','Hz');

    PSG=[PSG PS];HzG=[HzG;Hz];

    cont=cont+xx;

end;

afile=[arq(1:size(arq,2)-13) 'hgz.xls'];
dlmwrite(afile,HzG,'\t');

datafile=[arq(1:size(arq,2)-11) 'c.mat'];
save (datafile,'PSG','HzG');

%*****AMAZONASBRASIL*****
```

```

function LFCF

%*****AMAZONASBRASIL*****
% INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
% LABORATÓRIO DE FISILOGIA COMPORTAMENTAL - LFC
%
% LFCF.m faz parte de um grupo de algoritmos desenvolvidos ...
% para analisar Descargas do Órgão Elétrico (D.O.E.) ...
% de peixes elétricos da família Apterotonidae (Gymnotiformes).
%
% Filtra a frequência fundamental e calcula PSD para sinal filtrado.
%
% Desenvolvido por:
% Esp. Eng. Ambiental Gilberto Schwertner Filho.
% 2005
%*****AMAZONASBRASIL*****

clear all;clc;colordef white;

co=input('Entre com [ ] BTX (mg/L): ');
pn=input('Entre com nº do peixe: ');
ti=input('Entre com o tempo inicial (min.): ');
tf=input('Entre com o tempo final (min.): ');
pq=input('Entre com (1) p/Normal e (2) p/ BTX: ');

[arq, caminho]=uigetfile('*.mat', 'Arquivo *.mat');
cd(caminho);
load(arq);

ext='.mat';
cont=ti;

if pq == 1
    xx=2;fs=100000;nf=2048;
    fc=(Hz+(Hz*.8))/(fs/2);
elseif pq == 2
    xx=3;fs=50000;nf=1024;
    fc=(Hz+(Hz*.8))/(fs/2);
end;

PSG=[];

while cont<=tf
    arq=[ num2str(pn) '_' num2str(cont) '_' num2str(co) ext ];
    load(arq);

    [B,A]=butter(8,fc,'high');
    onda=filter(B,A,onda);
    [PS,f]=psd(onda,nf,fs);

    datafile=['1'arq(1:size(arq,2)-4) '.mat'];
    save (datafile,'Hz','onda','tempo','PS','f');

    PSG=[PSG PS];

    cont=cont+xx;

end;

datafile=[arq(1:size(arq,2)-11) 'fc.mat'];
save (datafile,'PSG');

%*****AMAZONASBRASIL*****

```

```

function LFCCRP

%*****AMAZONASBRASIL*****
% INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
% LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA COMPORTAMENTAL - LFC
%
% LFCCRP.m faz parte de um grupo de algoritmos desenvolvidos ...
% para analisar Descargas do Órgão Elétrico (D.O.E.) ...
% de peixes elétricos da família Aptereronotidae (Gymnotiformes).
%
% Calcula e grafica CRP.
% Calcula CRQA e salva em *.mat e *.xls, entre dois arquivos.
% (Cross Recurrence Plot Toolbox - NDG Univ. Potsdam).
%
% Desenvolvido por:
% Esp. Eng. Ambiental Gilberto Schwertner Filho.
% 2005
%*****AMAZONASBRASIL*****

clear all;clc;colordef white;

[arq, caminho]=uigetfile('*.mat', 'Arquivo *.mat');
cd(caminho);
load(arq);
x=onda;
clear onda;

[arq, caminho]=uigetfile('*.mat', 'Arquivo *.mat');
cd(caminho);
load(arq);
y=onda;
clear onda;

C=crp(x,y,3,10,.1,'distance','normalize','nogui');

A=crqa(x,y,3,10,.1,[],'euclidean','normalize','nogui');

Fig=figure;
set(Fig,'Position',[100 50 650 500]);
set(Fig,'Name',[arq(1:size(arq,2)-7)]);

surf(C,'FaceColor','interp',...
'EdgeColor','none','FaceLighting','phong');
axis tight;
set(gca,'XTickLabel','2|4|6|8|10|12|14|16|18|20');
xlabel('Tempo (ms)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'YTickLabel','2|4|6|8|10|12|14|16|18|20');
ylabel('Tempo (ms)','FontSize',12,'FontName','times');
colormap jet;
colorbar;
view([0 90]);

afile=[arq(1:size(arq,2)-4) 'ccrp.xls'];
dlmwrite(afile,A,'\t');

datafile=[arq(1:size(arq,2)-4) 'ccrp.mat'];
save (datafile,'A');

%*****AMAZONASBRASIL*****

```

```

function LFCCRQA
%*****AMAZONASBRASIL*****
% INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
% LABORATÓRIO DE FISILOGIA COMPORTAMENTAL - LFC
%
% LFCCRQA.m faz parte de um grupo de algoritmos desenvolvidos ...
% para analisar Descargas do Órgão Elétrico (D.O.E.) ...
% de peixes elétricos da família Apterontidae (Gymnotiformes).
%
% Calcula CRQA e salva em *.mat e *.xls...
% concatena valores de CRQA em *.mat e *.xls
% (Cross Recurrence Plot Toolbox - NDG Univ. Potsdam).
%
% Desenvolvido por:
% Esp. Eng. Ambiental Gilberto Schwertner Filho.
% 2005
%*****AMAZONASBRASIL*****

clear all;clc;colordef white;

co=input('Entre com [ ] BTX (mg/L): ');
pn=input('Entre com nº do peixe: ');
ti=input('Entre com o tempo inicial (min.): ');
tf=input('Entre com o tempo final (min.): ');
pq=input('Entre com (1) p/Normal e (2) p/ BTX: ');

if pq == 1
    xx=2;
elseif pq == 2
    xx=3;
end;

[arq, caminho]=uigetfile('*.mat', 'Arquivo *.mat');
cd(caminho);

ext='.mat';
cont=ti;

AT=[];

while cont<=tf
    arq=[ num2str(pn) '_' num2str(cont) '_' num2str(co) ext ];
    load(arq);

    A=crqa(onda,3,1,.1,[],'euclidean','normalize','nogui');

    afile=[arq(1:size(arq,2)-7) 'cr.xls'];
    dlmwrite(afile,A,'\t');

    datafile=[arq(1:size(arq,2)-7) 'cr.mat'];
    save (datafile,'A');

    AT=[AT;A];

    cont=cont+xx;
end;

afile=[arq(1:size(arq,2)-11) 'crqa.xls'];
dlmwrite(afile,AT,'\t');

datafile=[arq(1:size(arq,2)-11) 'crqa.mat'];
save (datafile,'AT');

%*****AMAZONASBRASIL*****

```

```

function LFCG2D

%*****AMAZONASBRASIL*****
% INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
% LABORATÓRIO DE FISILOGIA COMPORTAMENTAL - LFC
%
% LFCG2D.m faz parte de um grupo de algoritmos desenvolvidos ...
% para analisar Descargas do Órgão Elétrico (D.O.E.) ...
% de peixes elétricos da família Apterontidae (Gymnotiformes).
%
% Cria gráficos forma da onda (onda/tempo) e PS a partir de arquivo *.mat.
% p/ Normal e [ ] BTX.
%
% Desenvolvido por:
% Esp. Eng. Ambiental Gilberto Schwertner Filho.
% 2005
%*****AMAZONASBRASIL*****

clear all;clc;colordef white;

[arq, caminho]=uigetfile('*.mat', 'Arquivo *.mat');
cd (caminho);
load (arq);
H=num2str(Hz);

Fig=figure;
set(Fig, 'Position', [100 50 650 500]);
set(Fig, 'Name', [arq, '   Frequência: ' H ' Hz']);

subplot (2,1,1);
plot(tempo,onda,'r');
xlabel('Tempo','FontSize',12,'FontName','times');
ylabel ('Amplitude','FontSize',12,'FontName','times');
grid on

subplot (2,1,2);
plot(f,PS,'g');
xlim([500 5000]);
xlabel('Frequência (Hz)','FontSize',12,'FontName','times');
ylabel ('Magnitude','FontSize',12,'FontName','times');

%*****AMAZONASBRASIL*****

```

```

function LFCG3D
%*****AMAZONASBRASIL*****
% INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
% LABORATÓRIO DE FISILOGIA COMPORTAMENTAL - LFC
%
% LFCG3D.m faz parte de um grupo de algoritmos desenvolvidos ...
% para analisar Descargas do Órgão Elétrico (D.O.E.) ...
% de peixes elétricos da família Apterontidae (Gymnotiformes).
%
% Cria gráficos 3D de PSD.
% p/ Normal (fs=100KHz - 2048 pontos) e ...
% [ ] BTX (fs=50KHz - 1024 pontos), ...
% 'Hanning' (=~20ms).
%
% Desenvolvido por:
% Esp. Eng. Ambiental Gilberto Schwertner Filho.
% 2005
%*****AMAZONASBRASIL*****

clear all;clc;colordef white;

pq=input('Entre com (1) p/Normal e (2) p/ BTX: ');
[arq,caminho]=uigetfile('*.mat', 'Arquivo *.mat');
cd (caminho);
load (arq);

if pq == 1;
Fig=figure;
set(Fig,'Position',[100 50 650 500]);set(Fig,'Name',[arq]);
surf(PSG(10:200,:),'FaceColor','interp', ...
'EdgeColor','none','FaceLighting','phong');
axis tight;view([100 40]);camlight left;grid on;colormap(jet);
xlabel('Tempo (h)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'XTickLabel','4|8|12|16|20|24');
ylabel('Frequência (Hz)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'YTickLabel','1000|1500|2000|2500|3000|3500|4000|4500|5000');
zlabel('Magnitude','FontSize',12,'FontName','times');
Fig1=figure;
set(Fig1,'Position',[100 50 650 500]);set(Fig1,'Name',[arq]);
surf(PSG(10:200,:),'FaceColor','interp', ...
'EdgeColor','none','FaceLighting','phong');
axis tight;view([90 50]);camlight left;grid on;colormap(jet);
xlabel('Tempo (h)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'XTickLabel','4|8|12|16|20|24');
ylabel('Frequência (Hz)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'YTickLabel','1000|1500|2000|2500|3000|3500|4000|4500|5000');
zlabel('Magnitude','FontSize',12,'FontName','times');

elseif pq == 2;
Fig=figure;
set(Fig,'Position',[100 50 650 500]);set(Fig,'Name',[arq]);
surf(PSG(10:200,:),'FaceColor','interp', ...
'EdgeColor','none','FaceLighting','phong');
axis tight;view([100 40]);camlight left;grid on;colormap(jet);
xlabel('Tempo (min.)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'XTick',[5 10 20 30 40 50 60]);
set(gca,'XTickLabel','BTX|15|45|75|105|135|165');
ylabel('Frequência (Hz)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'YTickLabel','1000|1500|2000|2500|3000|3500|4000|4500|5000');
zlabel('Magnitude','FontSize',12,'FontName','times');
Fig1=figure;
set(Fig1,'Position',[100 50 650 500]);set(Fig1,'Name',[arq]);
surf(PSG(10:200,:),'FaceColor','interp', ...
'EdgeColor','none','FaceLighting','phong');
axis tight;view([90 50]);camlight left;grid on;colormap(jet);
xlabel('Tempo (min.)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'XTick',[5 10 20 30 40 50 60]);
set(gca,'XTickLabel','BTX|15|45|75|105|135|165');
ylabel('Frequência (Hz)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'YTickLabel','1000|1500|2000|2500|3000|3500|4000|4500|5000');
zlabel('Magnitude','FontSize',12,'FontName','times');

end;

%*****AMAZONASBRASIL*****

```

```

function LFCGRW

%*****AMAZONASBRASIL*****
% INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
% LABORATÓRIO DE FISILOGIA COMPORTAMENTAL - LFC
%
% LFCGRW.m faz parte de um grupo de algoritmos desenvolvidos ...
% para analisar Descargas do Órgão Elétrico (D.O.E.) ...
% de peixes elétricos da família Apterotonidae (Gymnotiformes).
%
% Calcula e grafica RP e Wavelet.
% (Cross Recurrence Plot Toolbox - NDG Univ. Potsdam e ...
% Wavelet Toolbox).
%
% Desenvolvido por:
% Esp. Eng. Ambiental Gilberto Schwertner Filho.
% 2005
%*****AMAZONASBRASIL*****

clear all;clc;colordef white;

[arq, caminho]=uigetfile('*.mat', 'Arquivo *.mat');
cd (caminho);
load (arq);

C=crp(onda,3,10,.1,'distance','normalize','nogui');

Fig=figure;
set(Fig,'Position',[100 50 650 500]);
set(Fig,'Name',[arq(1:size(arq,2)-7)]);

surf(C,'FaceColor','interp', ...
'EdgeColor','none','FaceLighting','phong');
axis tight;
set(gca,'XTickLabel','2|4|6|8|10|12|14|16|18|20');
xlabel('Tempo (ms)','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'YTickLabel','2|4|6|8|10|12|14|16|18|20');
ylabel('Tempo (ms)','FontSize',12,'FontName','times');
colormap jet;
colorbar;
view([0 90]);

Fig1=figure;
set(Fig1,'Position',[100 50 650 500]);
set(Fig1,'Name',[arq(1:size(arq,2)-7)]);

subplot (2,1,1);
plot(tempo,onda,'r');
xlabel('Tempo','FontSize',12,'FontName','times');
ylabel ('Amplitude','FontSize',12,'FontName','times');
grid on

subplot(2,1,2);
W=cwt(onda,1:.1:128,'db8','plot');
colormap jet;
colorbar;
xlabel('Tempo','FontSize',12,'FontName','times');
set(gca,'XTickLabel','2|4|6|8|10|12|14|16|18|20');
ylabel ('Escala','FontSize',12,'FontName','times');

%*****AMAZONASBRASIL*****

```

```

function LFCHZ

%*****AMAZONASBRASIL*****
% INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
% LABORATÓRIO DE FISILOGIA COMPORTAMENTAL - LFC
%
% LFCHZ.m faz parte de um grupo de algoritmos desenvolvidos ...
% para analisar Descargas do Órgão Elétrico (D.O.E.) ...
% de peixes elétricos da família Apterontidae (Gymnotiformes), ...
% a partir de arquivos no formato ASCII.
%
% Converte *.atf em arquivo *.mat.
% Calcula Frequência (Hz) (Cálculo compilado de Cris Braun 2004).
%
% Desenvolvido por:
% Esp. Eng. Ambiental Gilberto Schwertner Filho.
% 2005
%*****AMAZONASBRASIL*****

clear all;clc;colordef white;

co=input('Entre com [ ] BTX (mg/L): ');
pn=input('Entre com nº do peixe: ');
ti=input('Entre com o tempo inicial (min.): ');
tf=input('Entre com o tempo final (min.): ');
pq=input('Entre com (1) p/Normal e (2) p/ BTX: ');

if pq == 1
    tx=2001;zz=1000;xx=2;zx=13;
elseif pq == 2
    tx=1035;zz=500;xx=3;zx=66;
end;

ext='.atf';
[arq, caminho]=uigetfile('*.atf', 'Arquivo *.atf');
cd(caminho);
SG=[];cont=ti;

while cont <= tf
    arq=[num2str(pn) '_' num2str(cont) '_' num2str(co) ext];
    ca=['A11..A' num2str(tx)];
    cb=['B11..B' num2str(tx)];
    onda=dlmread (arq,'\t',cb);
    SG=[SG onda];cont=cont+xx;
end;

for s = 1:zx;
    pico=max(SG(:,s));tri=0.8*pico;
    t_s=find((SG(:,s) > tri);index_s=2:(length(t_s));
    ultimo_pico=0.01*[(t_s((t_s(index_s)-t_s(index_s-1)>1)));t_s(end)];
    size(ultimo_pico,1);
    for xx=1:(size(ultimo_pico,1))-1
        inter(xx)=ultimo_pico(xx+1)-ultimo_pico(xx);
    end;
    inter_medio(s)=mean(inter);Hz(s)=zz*(1/inter_medio(s));
end;

Fig=figure;
set(Fig, 'Position', [100 50 650 500]);set(Fig, 'Name', [arq]);
s=1:zx;plot(s,HZ,'r')
xlabel('Tempo ', 'FontSize',12, 'FontName', 'times');
ylabel ('Hz', 'FontSize',12, 'FontName', 'times');

Hzm=mean(Hz);CV=std(Hz)/mean(Hz);
Hzi=mean(Hz(:,1:5));Hzf=mean(Hz(:,6:length(Hz)));
Hzstd=std(Hz);Hzstdi=std(Hz(:,1:5));
Hzstdf=std(Hz(:,6:length(Hz)));
Hzt=[Hzi;Hzf;Hzm;Hzstd;Hzstdi;Hzstdf];

afile=[arq(1:size(arq,2)-11) 'hzcalc.xls'];dlmwrite(afile,HZ,'\t');
afile=[arq(1:size(arq,2)-11) 'hztcalc.xls'];dlmwrite(afile,Hzt,'\t');
datafile=[arq(1:size(arq,2)-11) 'hzcalc.mat'];
save (datafile,'Hz','CV','Hzi','Hzf','Hzm','Hzstd','Hzstdi','Hzstdf');

%*****AMAZONASBRASIL*****

```

ANEXO II

**RESUMO NO II SBEA – II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE
ENGENHARIA AMBIENTAL (ITAJAÍ, SC – 2003).**

II Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental – UNIVALI / Itajaí, 05 a 08 de outubro de 2003

1204

**PEIXES ELÉTRICOS DA AMAZÔNIA (GYMNOTIFORMES:
APTERONOTIDAE) COMO POTENCIAL BIOMONITORES
DE QUALIDADE DE ÁGUA**

Gilberto Schwertner Filho; José Antônio Alves-Gomes

INPA / BADPI / LFC – Lab. de Fisiologia Comportamental;
schwet@inpa.gov.br; puraque@inpa.gov.br

Os peixes da ordem Gymnotiformes são popularmente conhecidos como "peixes elétricos" pela capacidade de produzirem corrente elétrica alternada. As características biofísicas (forma de onda, amplitude, taxa de repetição e frequência espectral) da Descarga do Órgão Elétrico (DOE) são diretamente dependentes da composição físico-química da água onde o peixe se encontra. Cada espécie possui uma DOE própria e entre as espécies existentes, as da família Apterontidae são as únicas que produzem DOE's em frequência acima de 1000 Hz, com coeficientes de variação (Desvio Padrão/Média) da ordem de 10^{-4} registrados na bibliografia. Este é o oscilador biológico mais estável que se conhece e, portanto, altamente adequado para estudos de biomonitoramento. Neste estudo foram avaliadas 4 das mais de 40 espécies da família Apterontidae: *Apterontus albifrons*, *A. bonapartii*, *A. hasemani* e *Sternachaella terminalis*. Os espécimes foram mantidos em aquários com água estabilizada, com pH 7 e à temperatura de 27 °C. As DOE's foram amplificadas, visualizadas em um osciloscópio e analisadas em software específico, gerando informações para comparar a estabilidade da DOE's das 4 diferentes espécies nas mesmas condições ambientais. Os coeficientes de variação foram avaliados em 900 s, com frequência fundamental captada a cada 180 s. Para *A. albifrons* o coeficiente de variação das DOE's foi 0,0037 e média da frequência de 897 Hz. Para *A. bonapartii* o coeficiente de variação da DOE's foi de 0,0024 e média de frequência de 1301 Hz. Para *P. hasemani* o coeficiente de variação das DOE's foi de 0,0030 e média de frequência de 91 Hz. E para *S. terminalis* o coeficiente de variação da DOE's foi de 0,0040 e média de frequência de 1328 Hz. Como todos os resultados dos coeficientes de variação foram uma ordem de grandeza maior do que dita a literatura especializada, é possível que nossos resultados reflitam a necessidade de um maior tempo de aclimação dos indivíduos do que o utilizado. A partir destes estudos preliminares, serão conduzidos outros testes como objetivo do aperfeiçoamento de um sistema de biomonitoramento de efluentes tendo peixes elétricos como biomonitores. Neste sistema utilizaremos as espécies selecionadas em função da estabilidade das suas DOE's.

ANEXO III

**ARTIGO NO III SBEA – III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE
ENGENHARIA AMBIENTAL (BRASÍLIA, DF – 2004)**

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO AGUDA POR COMPOSTOS BTX COM PEIXES ELÉTRICOS DA AMAZÔNIA (*Apteronotus hasemani* – GYMNOTIFORMES)

Gilberto Schwertner Filho¹²
Aldecinei Bastos Siqueira Schwertner¹³
Augusto Bucker¹
José Antônio Alves Gomes¹

¹INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LFC – Laboratório de Fisiologia Comportamental
Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis – 69011-970 – Manaus, AM, Brasil
{bucker, puraque}@inpa.gov.br

²INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
PBTRN – Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical de Recursos Naturais
BADPI – Biologia de Água Doce e Pesca Interior
Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis – 69011-970 – Manaus, AM, Brasil
schwert@inpa.gov.br

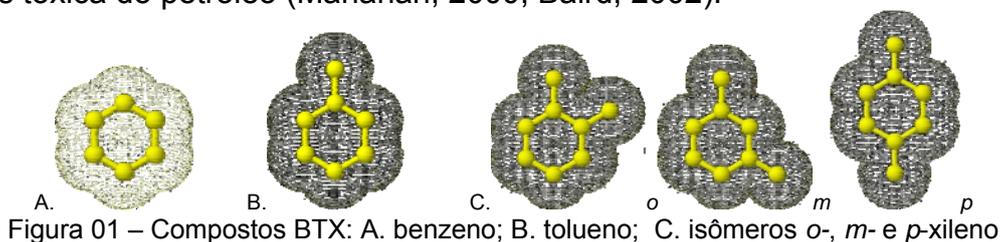
³UFAM – Universidade Federal do Amazonas
PPGBIOTEC – Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia
Av. Gen. Rodrigo O. Jordão Ramos, 3000 – Coroado I – 69077-000 – Manaus, AM, Brasil
aldi@inpa.gov.br

Abstract. The neotropical electric fishes of the order Gymnotiformes, are known for their ability to generate electricity. The family Apterontidae, is different from other gymnotiforms in that the Electric Organs Discharges (EODs) are produced by the action potential of neurons vs. tissue of myogenic origin. Since 2002, the Laboratory of Physiology and Behavior (LFC-/INPA) has been conducting research using apteronotids as bioindicators of water quality, mainly looking at contamination caused by petroleum products. The petroleum component BTX (benzene, toluene and xylenes) are toxic substances which have a great affinity for water. In our study we looked at the effects of BTX contamination in 4 individuals of *Apteronotus hasemani*. Using the EODs frequencies to observe a physiological response, it was determined that only a period of four minutes was needed to detect a BTX concentration of 10,000 ppm. The efficiency of the contaminant was evaluated using a cytotoxic methodology. Cells were observed in apoptosis and necrosis. Therefore, the data from these initial experiments illustrate the value in using apteronotids as bioindicators in future contaminate studies.

Keywords: Apterontidae, electric kinifishes, biomonitoring, petroleum, and EODs.

1. Introdução

Os compostos aromáticos benzeno, tolueno e isômeros *orto*, *meta* e *para*-xileno (**figura 01**), conhecidos como compostos BTX, constituem a parcela mais tóxica do petróleo (Manahan, 2000; Baird, 2002).



Os problemas de maior complexidade ambiental relacionados ao petróleo, principalmente em ambientes aquáticos, são atribuídos aos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno (C_6H_6), tolueno ($C_6H_5CH_3$) e xilenos (C_8H_{10}), pois estes são os constituintes aromáticos do petróleo com maior potencial de mobilização na água (ASTDR, 1993; ASTDR, 1997; Corseuil & Fernandes, 1999; ASTDR, 2000). Estes hidrocarbonetos que têm tendência de serem hidrofóbicos (baixa solubilidade em água), mas podem ser miscíveis em água, constituindo, a fração solúvel em água do petróleo (*WSF – water soluble fraction*) (CONCAWE, 2002).

Particularmente, estes compostos de baixo peso molecular podem afetar o sistema nervoso central de vertebrados. Há registros de que o benzeno causa câncer (leucemia) (ATSDR, 1999), sendo classificado no Grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer, como cancerígeno para humanos (IARC, 2003).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2000) reconhece a insuficiência e ineficácia de resposta diante aos problemas ambientais com hidrocarbonetos e, em alguns casos, a dificuldade de implantar as ações necessárias para evitar possíveis problemas ambientais.

Diante da realidade da exploração, transporte e beneficiamento de petróleo na Amazônia, desde 2002 que no Laboratório de Fisiologia Comportamental – LFC do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA desenvolvem-se pesquisas com peixes elétricos da Amazônia (Gymnotiformes) como biomonitores em ambientes aquáticos, visando compor sistemas de biomonitoramento em tempo real para as mais diversas atividades petrolíferas.

A Ordem dos peixes Gymnotiformes (de distribuição Neotropical), compreende mais de 100 espécies, divididas em sete famílias (**tabela 01**) (Alves-Gomes et al., 1995). São popularmente conhecidos como “peixes elétricos” pela capacidade de produzirem corrente elétrica alternada (Chagas & Carvalho, 1961; Bennett, 1971). Os Gymnotiformes podem ser subdivididos em dois grandes grupos de acordo com o padrão temporal das D.O.Es. (**tabela 01**): peixes pulsadores e peixes onduladores (Kirschbaum, 1995; Alves-Gomes, 1997).

As características biofísicas (forma de onda, amplitude, taxa de repetição e frequência espectral) da Descarga do Órgão Elétrico (D.O.E.), podem ser relacionadas com a composição físico-química da água onde o peixe se encontra (Pimentel-Souza & Siqueira, 1992; Thomas et al., 1997; Thomas et al., 1998; Thomas, 2000; Moll, 2001; Schwertner & Alves-Gomes,

2003). Além disto, as D.O.Es. podem ser gravadas, monitoradas e analisadas em detalhes com o auxílio de equipamentos eletrônicos apropriados, o que as tornam um excelente modelo experimental.

Tabela 01 – Relação Família / Sinal / Eletrócito

FAMÍLIA	TIPO DE SINAL	ELETRÓCITO
APTERONOTIDAE	Onda	Neurogênico
EIGENMANNIIDAE	Onda	Miogênico
STERNOPYDIDAE	Onda	Miogênico
RHAMPHICHTHYIDAE	Pulso	Miogênico
HYPOPOMIDAE	Pulso	Miogênico
GYMNOTIDAE	Pulso	Miogênico
ELECTROPHORIDAE	Pulso	Miogênico

Em função do seu órgão neurogênico, a família Apterontidae, que é mais diversa e numerosa na Ordem Gymnotiformes com 46 espécies descritas (Mago-Leccia, 1994; Alves-Gomes, 1997; de Santana, 2002; de Santana, 2003; de Santana et al., 2004), contém as únicas espécies que produzem D.O.Es. em frequências altas, que variam entre 800 e 2000 Hz (Alves-Gomes, 1997), com coeficientes de variação (Desvio Padrão/Média) da ordem de 0,0002 segundos ($2 \cdot 10^{-4}$ s) (Mortgat et al., 2000). Estes órgãos neurogênicos possuem frequências de descarga bem mais altas do que os órgãos miogênicos, porque todas as sinapses envolvidas na D.O.E. de um órgão neurogênico são elétricas (Bullock et al., 1979). Este é o oscilador biológico mais estável que se conhece (Alves-Gomes, 2001), o que confere a estas espécies uma vantagem adicional para estudos de biomonitoramento (Schwertner & Alves-Gomes, 2003).

Com o objetivo de avaliar o comportamento das D.O.Es. de Gymnotiformes da família Apterontidae e testar os procedimentos experimentais adotados para qualificar os sistemas de biomonitoramento, foi realizado um experimento buscando extremos: utilizando indivíduos da espécie *Apterontus hasemani*, que segundo Schwertner & Alves-Gomes (2003), apresentam maior coeficiente de variação das D.O.Es., e, utilizando-se de uma alta concentração do contaminante (1000 vezes maior do que, a mais tolerante concentração mínima dos compostos BTX exigida para o consumo humano, que é de 10 ppm para os xilenos, de acordo com EPA, 2003).

2. Metodologia

Os peixes utilizados neste experimento foram capturados no complexo de lagos do Catalão próximo a Manaus – AM. Foram utilizados quatro espécimes de *Apterontus hasemani* (**figura 02**), sendo três fêmeas com comprimento padrão de 20,5 (F20), 21 (F21) e 27 (F27) cm e um macho com comprimento padrão de 28 cm (M28).



Figura 02 – *Apterontus hasemani* (Ellis)

A temperatura da água foi mantida constante em 25 °C, a CE (condutividade elétrica) inicial em 15 µS/cm e o pH inicial em torno de 7,0 (±1,5). Os contaminantes foram introduzidos por meio de um difusor na concentração de 10.000 ppm em aquários de 10 L revestidos com filmes inertes. As gravações das D.O.Es. ocorreram a partir da introdução dos contaminantes no aquário. O tempo de aclimação dos peixes aos aquários experimentais foi de 2 horas. Após 15 minutos de gravação das D.O.Es. foi veiculado o contaminante.

Foi utilizado o Xilol comercial como representante elementar dos compostos BTX avaliados. O Xilol comercial é uma mistura dos isômeros *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, sendo seu maior constituinte o isômero *m*-xileno com 60 a 85 % e pequenas quantidades de benzeno e de tolueno; segundo o Ministério da Fazenda (2002) em função das características para comercialização do produto, considera-se Xilol o produto com conteúdo superior a 50% em peso de xilenos, cujo peso molecular em média da mistura é de 106,16 (peso molecular do *m*-xileno: 106,17; do *o*-xileno: 106,16; do *p*-xileno: 106,17; tolueno: 92,14 e benzeno: 78,11 - ATSDR, 1993; 1997; 2000).

Para gravação das D.O.Es., a descarga de cada peixe foi captada por eletrodos de prata (eletrodo positivo + na cabeça, e, eletrodo negativo - na cauda do peixe), e o sinal foi amplificado por meio de um amplificador diferencial. Este sinal foi monitorado com um contador de frequência (captada frequência instantânea a cada 10 segundos) e visualizado na tela de um osciloscópio (Fluke 196 Scopemeter e Tektronix TDS 220, respectivamente). Simultaneamente, os sinais foram digitalizados com conversor analógico/digital (Vetter Digital 3000A) e gravados em um sistema de aquisição de dados (VCR). Todos os sinais gravados foram importados para um computador onde foram feitas análises mais detalhadas sobre as D.O.Es. por meio do *software* FlukeView® e planilhas de dados. Foram analisados a taxa de repetição e a frequência das D.O.Es.. Esquema do sistema de aquisição e análise de dados vide **figura 03**.

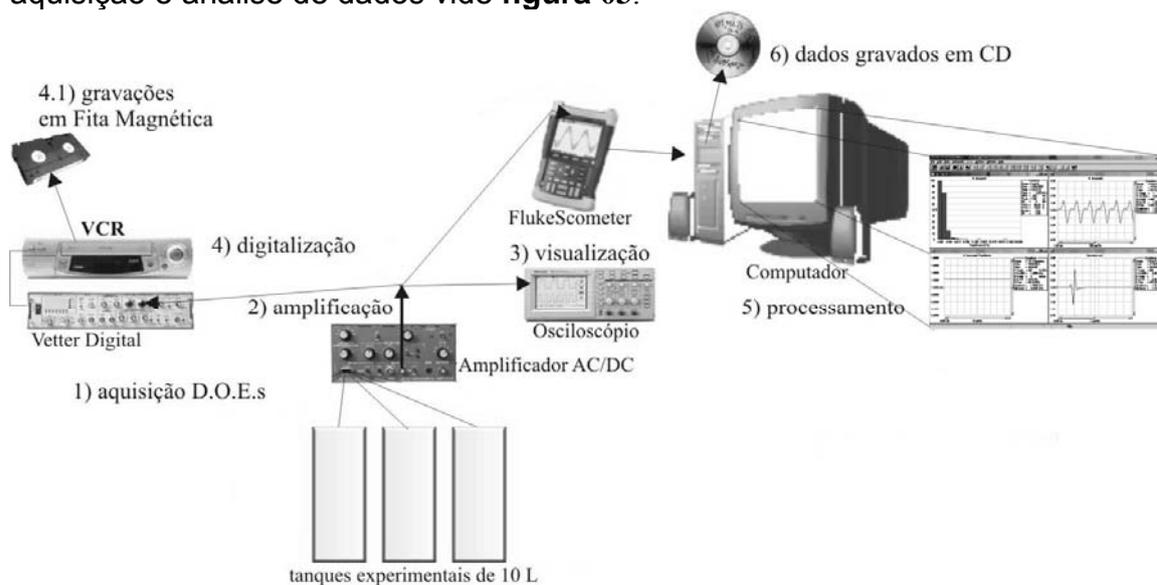


Figura 03 – Esquema do sistema de aquisição e análise de dados

Foram feitas lâminas para observação de citotoxicidade com material sanguíneo e rim cefálico por meio de microscópio óptico. Observou-se a ocorrência de células em necrose, apoptose, deformações na membrana plasmática e/ou deformação nuclear. O sangue foi coletado por punção da veia caudal (em torno de 100 μ L) com o auxílio de seringas heparinizadas. Gotas de sangue foram colocadas sobre lâminas de microscopia sendo executado esfregaço. Em seguida, o peixe foi seccionado ventro-lateral, foi retirado o rim cefálico, colocado sobre lâmina de microscopia, macerado gentilmente e executado esfregaço. Após período de 12 horas para a secagem do material, as lâminas foram submetidas a um banho de 15 minutos em Metanol P.A. (100%) para a fixação, coradas por mais 15 minutos em Giemsa 5%, lavadas com água destilada e secas ao ar, em temperatura ambiente.

Foram seguidos critérios de avaliação para a identificação de células em apoptose e necrose celular segundo Fenech et al. (2003).

3. Resultados

Os quatro espécimes submetidos à investigação pela contaminação aguda de 10.000 ppm de BTX sobreviveram pelo tempo médio de 1 h e 40 min. (F20 – 1 h e 35 min.; F21 – 1 h e 38 min.; F27 – 1 h e 44 min. e M28 – 1 h e 45 min.). Na **figura 04** é apresentado o gráfico da relação tempo (s) e frequência (Hz) das D.O.Es. para os quatro espécimes avaliados.

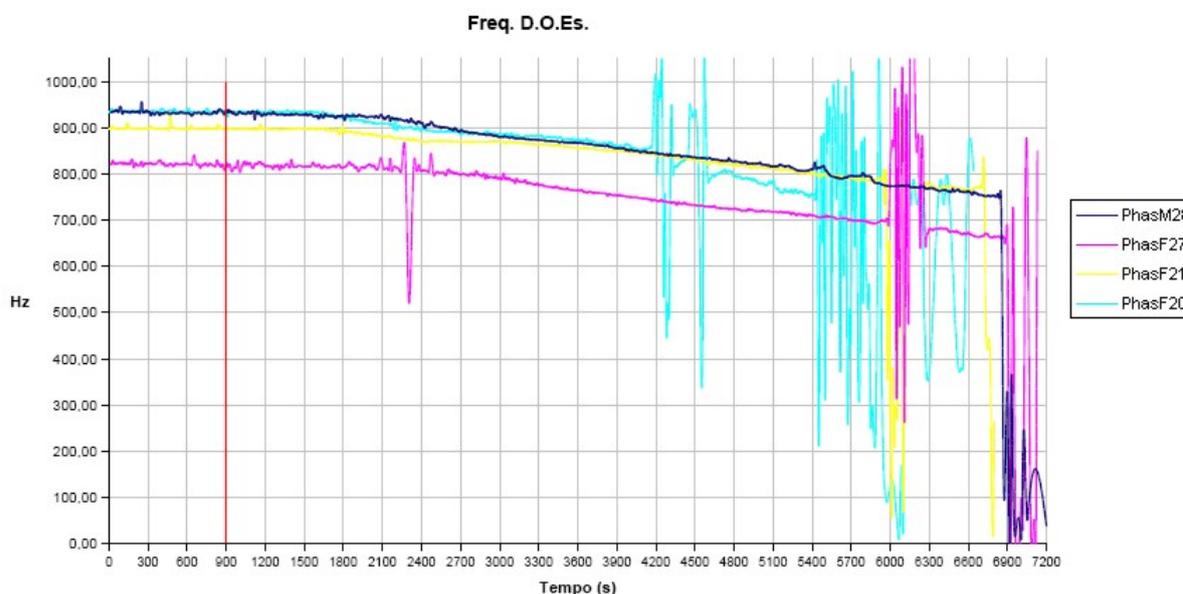


Figura 04 – Gráfico da variação da frequência das D.O.Es. para *Apteronotus hasemani*. Linha vermelha (900 s) indica adição do contaminante.

Verificou-se que na presença do contaminante as frequências das D.O.Es. decresceram, em todos os espécimes; evidenciando a característica inibidora do sistema nervoso central dos compostos BTX em vertebrados (ATSDR, 1999).

Avaliou-se o desvio padrão da frequência das D.O.Es. de cada minuto para cada espécime: para F20, F21 e M28 o desvio padrão do minuto

imediatamente após a veiculação do contaminante (minuto 15) apresentou o dobro do desvio padrão do minuto anterior; para F27 por volta do minuto 15 o desvio padrão foi o dobro do desvio padrão médio para os quatro indivíduos: denotou-se a percepção imediata do contaminante (**figuras 05, 06, 07 e 08**).

F20

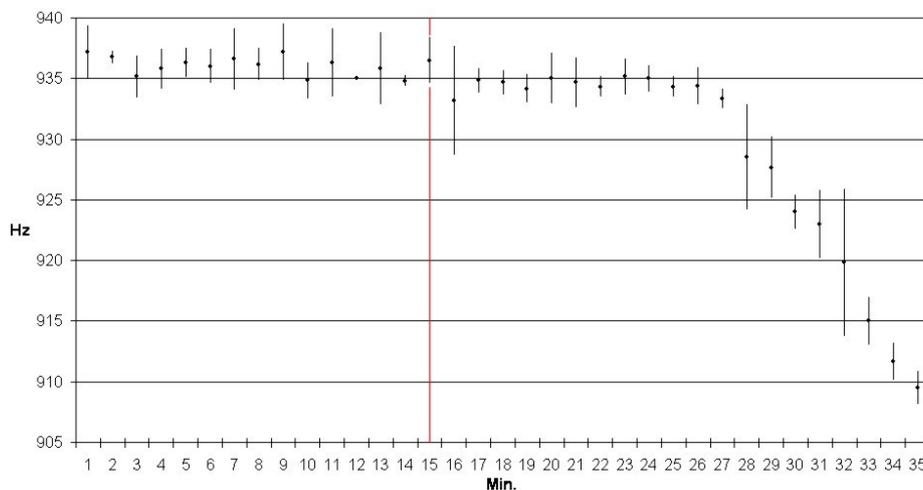


Figura 05 – Gráfico média e desvio padrão D.O.Es. (fêmea 20,5 cm).
Linha vermelha (15 min.) indica adição do contaminante.

F21

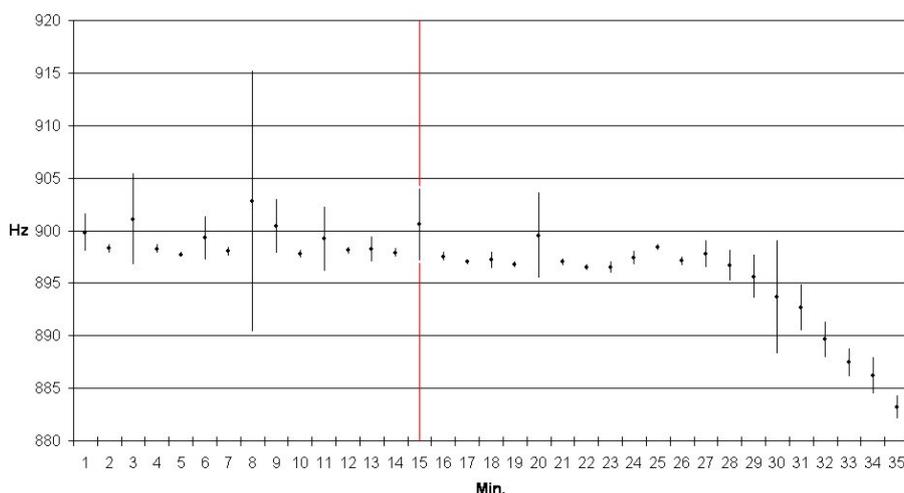


Figura 06 – Gráfico média e desvio padrão D.O.Es. (fêmea 21 cm).
Linha vermelha (15 min.) indica adição do contaminante.

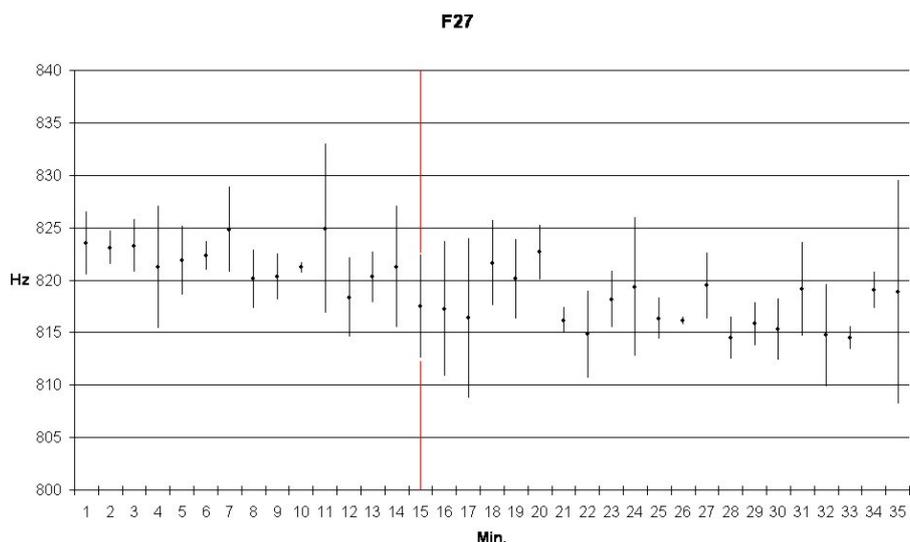


Figura 07 – Gráfico média e desvio padrão D.O.Es. (fêmea 27 cm).
Linha vermelha (15 min.) indica adição do contaminante.

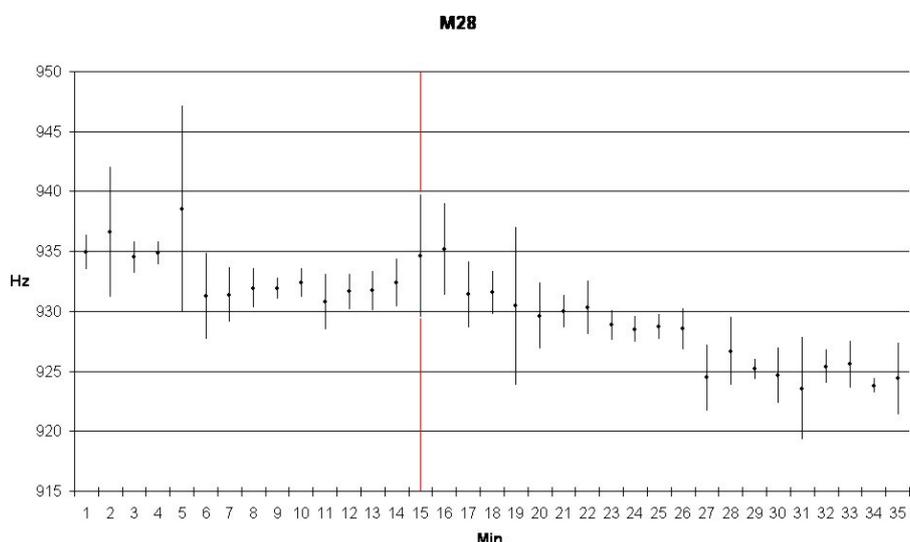


Figura 08 – Gráfico média e desvio padrão D.O.Es. (macho 28 cm).
Linha vermelha (15 min.) indica adição do contaminante.

Com a média do desvio padrão de cada indivíduo dos 14 min. que antecederam a contaminação (peixe em água não contaminada, um padrão normal), buscou-se o valor da frequência que foi uma vez menor a esta média. Para F20 este valor foi atingido aos 19 min., para F21 aos 19 min., para F27 aos 21 min. e para M28 aos 19 min. Assim, podemos inferir que, por volta de 4 minutos após a veiculação do contaminante a frequência ultrapassou o limite (inferior) do desvio padrão da frequência quando os peixes estavam em condições normais, sem contaminação, denotando alteração dos valores da frequência das D.O.Es. .

Em se tratando do parâmetro citotóxico, muitas das células evidenciaram mudanças citoplasmáticas e nucleares (**figura 09**) que são consideradas características de uma célula em processo de morte celular programada, levando, assim, as células ao processo de apoptose e necrose (**figura 09 A e B**, respectivamente), caracterizando que os indivíduos analisados foram submetidos a um estresse agudo, evidenciando a contaminação frente à exposição experimental.

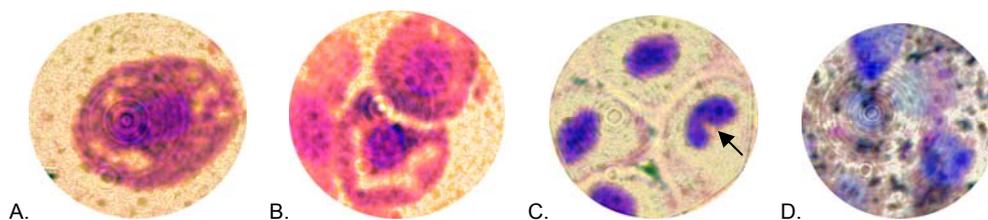


Figura 09 – Citotoxicidade (1000x): A. eritrócito em estágio inicial de apoptose; B. eritrócitos em estágio inicial de necrose; C. célula do rim cefálico (fêmea) com deformação nuclear; D. células do rim cefálico (macho) com impossibilidade de identificação de estruturas

4. Discussão

O objetivo do experimento foi contemplado, uma vez que, este experimento foi qualitativo, sem as implicações estatísticas quantitativas, como por exemplo, número amostral (n), pseudo-replicações e reconhecimento de padrões. Procurou-se submeter o menor número possível de espécimes à contaminação aguda.

Quanto aos valores das freqüências das D.O.Es., à afirmativa da detecção do contaminante (compostos BTX) aos 4 minutos, pela análise da média do desvio padrão dos primeiros 14 minutos, período em que os peixes estavam em água estabilizada sem contaminante, como limite dos valores de freqüência normal, apresentou equidade de resultados, sendo representativo para os indivíduos avaliados. Alguns valores altos do desvio padrão antes da veiculação do contaminante, ocorreram devido ao fenômeno “*chirp*”, que é representado por um pico de descarga mais alta do que o normal. Porém, após a veiculação do contaminante, a queda dos valores das freqüências das D.O.Es. foi causada pela presença e ação das altas concentrações dos compostos BTX (Xilol comercial).

A avaliação da citotoxicidade, também investigativa, apresentou resultados relevantes, uma vez que foram observadas a presença de grande número de células em apoptose e necrose, evidenciando o efeito do contaminante na concentração veiculada. Também, pôde-se observar que as lâminas feitas do esfregaço do rim cefálico do macho (M28) apresentaram uma coloração intensa e com muitos fragmentos, o que tornou difícil a visualização das células e conseqüente identificação das estruturas.

Deste experimento, além dos resultados passíveis de mensuração, fomentou-se modificações no sistema de exaustão, nos eletrodos, nos aquários experimentais e no armazenamento dos resíduos; resultando, assim, a demonstração de relevância destes experimentos de ordem investigativa.

Os dados deste trabalho serão de importância para futuros experimentos visando compor o sistema de biomonitoramento com peixes apteronotídeos que está em pleno desenvolvimento no Laboratório de

Fisiologia Comportamental – LFC do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Agradecimentos

Ao apoio incondicional da Msc. Jaqueline da Silva Baptista, do Msc. Carlos David C. de Santana e do Msc. Christopher R. Aadland. Pelo apoio financeiro da Fundação de AMPARO A PESQUISA DO AMAZONAS – FAPEAM, do CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA – CNPq e da FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS do MINISTÉRIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA – FINEP/MCT. Gilberto Schwertner Filho é bolsista mestrado CNPq. Aldecinei B. S. Schwertner é bolsista mestrado FAPEAM. Augusto Bucker é bolsista DCTA/FAPEAM.

Referências

ALVES GOMES, J. A. Informações preliminares sobre a bio-ecologia de peixes elétricos (Ordem Gymnotiformes) em Roraima. In: BARBOSA, R. I.; FERREIRA, E. J. & COSTELLÓN, E. G. (Eds.). Homem, ambiente e Ecologia no Estado de Roraima. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM. 1997.

ALVES GOMES, J. A. The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective. *Journal of Fish Biology*. 58: 1489 – 1511. 2001.

ALVES-GOMES, J. A.; ORTÍ, G.; HAYGOOD, M.; MEYER, M.; HEILIGENBERG, W. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: A synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 12(2): 298-318. 1995.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Xylene. Public Health Service. 1993.

ATSDR. Toxicological Profile for Benzene. Public Health Service. 1997.

ATSDR. Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH). Public Health Service. 1999.

ATSDR. Toxicological Profile for Toluene. Public Health Service. 2000.

BAIRD, C. Química Ambiental. 2 ed. Bookman, Porto Alegre. 2002. 622 p. ISBN 85-363-0002-7

BENNETT, M.V.L. Electroreception. In: HOAR, W. S. & RANDALL, D. J. (Eds.) Fish Physiology, Vol. 5. New York, Academic Press. p 493-574. 1971.

Bullock, T.H.; Fernandes-Souza, N.; Graf, W.; Helligenberg, W.; Langner, G.; Meyer, D.L.; Pimentel-Souza, F.; Scheich, H.; Viancour, T.A. Aspectos do uso da Descarga do Órgão Elétrico e Eletorrecepção nos Gymnotoidei e outros peixes Amazônicos. *Acta Amazonica*, 9(3): 549-572. 1979.

CHAGAS, C. & CARVALHO, A. P. Bioelectrogenesis: a comparative survey of its mechanisms with particular emphasis on electric fishes. Elsevier Publishing Company. 1961. 413p.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2000. Resolução N° 273 - 29 de novembro de 2000. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, DF.

CONCAWE – Conservation of Clean Air and Water in Europe. Environmental Classification of Petroleum Substances – Summary data and rationale. Brussels: Petroleum Products Ecology Group, Report, n. 01/54. 2002.

CORSEUIL, H. X. & FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na Gasolina brasileira. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 4(1 e 2): 71-75. 1999.

EPA - Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Standards. Office of Water. EPA 816-F-03-016. jun. 2003.

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534 65–75. 2003.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2003. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 25 dez. 2003.

KIRSCHBAUM, F. Discharge types of gymnotiform fishes. Cap. 8.3 p171 In: MOLLER, P. Electric Fishes – History and behavior. Fish and Fisheries Series 17. 5 ed. New York: Chapman & Hall, 584p. 1995. ISBN 0 412 37380 7

Mago-Leccia, F. Electric fishes of continental waters of America. FUDECI. 1994. 207 p.

MANAHAN, S. E. Environmental Chemistry. 7 ed. Florida: Lewis Publishers. 2000. 898 p. ISBN 1-56670-492-8

MINISTÉRIO DA FAZENDA - Decreto nº 4.542 de 26 de dezembro de 2002: Cap. 27. Disponível em: <www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/decretos/2002/dec4542.htm>. Acesso em: 15 fev. 2004.

MOLL, R. Auswirkungen der Wasserqualität auf die elektrischen Signale von *Apteronotus albifrons* (Linnaeus, 1766). Diplomarbeit. Universität Konstanz, DE. 2001.

MOORTGAT, K. T.; BULLOCK, T. H.; SEJNOWSKI, T. J. Precision of the Pacemaker Nucleus in a Weakly Electric Fish: Network Versus Cellular Influences. *Journal of Neurophysiology*, 83: 971-983. 2000.

PIMENTEL-SOUZA, F. & SIQUEIRA, A.L. Effect of external carbon dioxide concentration on the electric organ discharge frequency in the gymnotiform fish *Apteronotus albifrons*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25(2): 175-180. 1992.

de SANTANA, C. D. “*Apteronotus*” sensu stricto (Gymnotiformes: Apterontidae): monofiletismo, sistemática, e diversidade subestimada em peixes elétricos Neotropicais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brasil. 394p. 2002.

de SANTANA, C. D. *Apteronotus caudimaculosus* n. sp. (Gymnotiformes: Apterontidae), a sexually dimorphic black ghost knifefish from the Pantanal, Western Brazil, with a note on the monophyly of the *A. albifrons* species complex. *Zootaxa*, 252: 1-11. 2003.

de SANTANA, C. D.; MALDONADO-OCAMPO, J. A.; SEVERI, W. & MENDES, G. N. *Apteronotus eschmeyeri*, a new species of ghost knifefish from the Magdalena Basin, Colombia (Gymnotiformes: Apterontidae). *Zootaxa*.410:1-11. 2004.

SCHWERTNER, G. & ALVES-GOMES, J. A.. Peixes Elétricos da Amazônia (Gymnotiformes: Apterontidae) como Potencial Biomonitor de Qualidade de Água. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL, 2003, Itajaí, SC. Livro de Resumos. Itajaí: UNIVALI, 2003. v.1, p. 262.

THOMAS, M. Integrating Physical, Chemical and Biological Monitoring. *Security of Public Water Supplies*.107 – 114. 2000.

THOMAS, M.; FLORION, A.; CHRÉTIEN, D. A new warning biomonitor using a weakly electric fish, *Apteronotus albifrons* (Gymnotiformes), and the effect of temperature on the bioelectric responses. *Environmental Monitoring and Assessment*. 51: 605 – 620. 1998.

THOMAS, M.; FLORION, A.; CHRÉTIEN, D. The effect of pH and conductivity on the electric behaviour of *Apteronotus albifrons* (Family Apterontidae) in a pollution monitoring system. *Environmental Technology*, 18: 1069 – 1083. 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)