

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

RESPOSTAS IONOREGULATÓRIAS DO TAMBAQUI, *COLOSSOMA
MACROPOMUM*, AO PETRÓLEO E SUA DISPERSÃO QUÍMICA

Rafael Mendonça Duarte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais-PPG-BTRN/INPA, Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

**Manaus – AM
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

RESPOSTAS IONOREGULATÓRIAS DO TAMBAQUI, *COLOSSOMA
MACROPOMUM*, AO PETRÓLEO E SUA DISPERSÃO QUÍMICA

Rafael Mendonça Duarte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais-PPG-BTRN/INPA, Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Orientador: Dr. Adalberto Luís Val

Financiamento: CNPq e Petrobrás

Manaus – AM
2005

A minha mãe, Vera Sonia Mendonça,
a minha irmã, Marcela Mendonça
Duarte e a minha companheira,
Adriana Kourmouyan.
A Marcelo Cunha Duarte *in memoriam*

FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Rafael Mendonça

Respostas ionoregulatórias do tambaqui, *Colossoma macropomum*, ao petróleo e sua dispersão química / Rafael Mendonça Duarte – 2005. Manaus, AM, xi + 70p.

Dissertação de Mestrado (INPA/UFAM)

1. Regulação iônica 2. Tambaqui 3. Petróleo 4. Dispersantes

CDD 19.ed. 597.5041

SINOPSE

O presente trabalho analisou o efeito do óleo cru, do dispersante Corexit 9500[®], e da dispersão química do óleo cru sobre o fluxo líquido dos íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻, e do fluxo unidirecional de Na⁺, determinando também a concentração dos principais íons plasmáticos (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻), de alguns parâmetros respiratórios, como o hematócrito e a concentração de hemoglobina, e de estresse, como a concentração de glicose sangüínea, em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Os exemplares de tambaqui expostos ao óleo cru disperso quimicamente, apresentaram distúrbios osmoregulatórios, com perdas líquidas (J_{net}) ($p < 0,05$) dos três íons analisados, particularmente durante as primeiras horas de exposição. A dispersão química do óleo cru parece afetar o transporte de Na⁺ através de membrana, estimulando as perdas difusivas (J_{out}) e alterando os mecanismos de transporte paracelular (J_{in}), dependendo da concentração do dispersante Corexit 9500[®] utilizada nos testes (1:1000 e 1:1200). Não foram observadas alterações severas na concentração plasmática dos íons analisados e nos parâmetros respiratórios e de estresse avaliados, indicando a grande habilidade do tambaqui em reduzir a permeabilidade da membrana branquial aos íons, impedindo que os distúrbios nos processos de transporte iônico no nível branquial afetem a concentração iônica plasmática, não comprometendo o balanço energético e a sobrevivência dos animais.

Agradecimentos

Ao Dr. Adalberto Luis Val pela orientação, atenção, confiança e estímulo que permitiram a realização desse trabalho.

À Dra. Aline Yuri Matsuo pelo apoio na montagem dos experimentos e pelas discussões que auxiliaram no desenvolvimento do trabalho.

À Petrobrás pelo financiamento do projeto e pelo suporte na divulgação dos resultados.

A Eternal Ltda. pelo auxílio no descarte do material contaminado produzido durante as séries experimentais

A toda equipe do LEEM pelo inestimável auxílio durante a montagem, realização, análise e limpeza de material dos experimentos, pelas discussões, aprendizado e também pelos inúmeros momentos de alegria.

Ao amigo e “quase” Dr. Rubens Tomio Honda por ter me recebido em Manaus, pelas conversas que contribuíram para ampliar meu horizonte científico, e pelo companheirismo nos momentos de ressaca.

A todos os amigos que fiz na turma de mestrado do BADPI/ 2003, que apesar das diferenças, me acolheram, apoiaram e ajudaram nessa árdua caminhada.

Ao Edvaldo, técnico do laboratório de plantas e solos, pelo auxílio nas leituras das amostras.

A Carminha Arruda e a Elany Cristina por todo apoio, carinho e respeito para com os alunos do curso do BADPI

A todos os amigos, novos ou antigos, que um jeito ou de outro contribuíram para realizar esse trabalho

À Adriana Koumrouyan pelo apoio, incentivo, compreensão, carinho, e por acreditar e fazer parte dos meus sonhos.

Ionoregulatory responses of the tambaqui *Colossoma macropomum* to crude petroleum and to crude petroleum chemically dispersed

Abstract

The aim of this work was to assess the effect of crude petroleum and crude petroleum chemically dispersed on the ionic regulation in juvenile of tambaqui, *Colossoma macropomum*. The exploitation of petroleum in the Solimões River sedimentary basin has increased the risk of contamination of the Amazonian water bodies. Dispersants are chemical substances used in the reduction of the impact caused by the spill of petroleum in water bodies, however, the use of dispersants has not been recommended since it increases the oil toxicity to aquatic organisms. Our results show that hydrocarbons chemically dispersed are able to act at the gill level, changing permeability and modifying the mechanisms of ion transport through the membrane in tambaqui, resulting in net losses (J_{net}) of Na^+ , K^+ , and Cl^- , particularly, during the first hours of exposure. Unidirectional Influx (J_{in}) and efflux (J_{out}) of Na^+ changed after exposure to petroleum chemically dispersed (OC+DIS), with diffusive losses ($p < 0.05$) in the two concentrations tested of the dispersant Corexit 9500[®]. The influx of Na^+ showed different responses to the petroleum chemically dispersed. It increased at the higher dispersant concentration (1:1000), and was inhibited at lower concentration (1:1200). However, tambaqui showed ability to reduce ion gill permeability, decreasing the net losses (J_{net}) of Na^+ , K^+ , and Cl^- after 24 hours of exposure, except in the higher dispersant concentration (1:1000) where losses of K^+ stayed increased ($p < 0.05$) throughout the experimental period. The plasmatic content of the major ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), some respiratory parameters, as the hematocrit and the hemoglobin concentration, and parameters of stress, as the concentration of glucose, only showed minor responses to the petroleum chemically dispersed. Concentration were reduced, hemoglobin concentration and plasma Na^+ , Ca^{2+} , and Cl^- , hematocrit and plasma K^+ concentration were increased, while plasma glucose concentration changed along the experimental period.

Respostas ionoregulatórias do tambaqui, *Colossoma macropomum*, ao petróleo e sua dispersão química

Resumo

O objetivo central deste trabalho foi de avaliar o impacto do petróleo e da dispersão química do petróleo sobre aspectos relacionados a regulação iônica em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*. A exploração de petróleo na bacia sedimentar do Rio Solimões tem aumentado o risco de contaminação dos corpos d'água da Amazônia. Dispersantes são substâncias químicas empregadas na redução do impacto causado pela liberação de petróleo nos corpos d'água, no entanto, a sua utilização não tem sido totalmente recomendada por aumentar a toxicidade do óleo aos organismos aquáticos. Os resultados indicam que os hidrocarbonetos dispersos quimicamente são capazes de atuar no nível branquial, alterando a sua permeabilidade e modificando os mecanismos de transporte de íons através da membrana no tambaqui, levando a perdas líquidas (J_{net}) de Na^+ , K^+ , e Cl^- , particularmente durante as primeiras horas de exposição. O transporte transcelular (J_{in}) e paracelular (J_{out}) de Na^+ sofreu alterações após a exposição à dispersão química do óleo cru (OC+DIS), com perdas difusivas significativas ($p < 0,05$) nas duas concentrações de dispersante Corexit 9500[®] testadas. O influxo de Na^+ apresentou respostas distintas a dispersão química do petróleo, apresentando estímulo nas taxas de absorção de Na^+ na maior concentração de dispersante (1:1000), enquanto na concentração mais diluída (1:1200) o influxo de Na^+ foi inibido. No entanto, o tambaqui apresenta a capacidade de reduzir a permeabilidade da membrana branquial aos íons, reduzindo as perdas líquidas (J_{net}) de Na^+ , K^+ , e Cl^- após 24 horas de exposição, exceto na maior concentração de dispersante (1:1000) onde as perdas de K^+ permaneceram elevadas ($p < 0,05$) durante todo período experimental. A concentração dos principais íons plasmáticos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), de parâmetros respiratórios, como o hematócrito e a concentração de hemoglobina, e de estresse, como a concentração de glicose sanguínea, responderam modestamente a dispersão química do petróleo, com redução da concentração de hemoglobina e dos íons Na^+ , Ca^{2+} , e Cl^- no plasma, e aumento do hematócrito e do K^+ plasmático, enquanto a concentração de glicose variou ao longo do período experimental.

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS

- A_{540}	Absorbância em 540 nanômetros
- °C	Graus celsius
- Ca^{2+}	Íon cálcio
- CC	Células de cloreto
- Cl^-	Íon cloreto
- CL_{50}	Concentração média letal
- CP	Células pavimentosas
- Cu^{2+}	Íon cobre
- cpm	Contagem por minuto
- g	Gramas
- g/dL	Gramas por decilitro
- h	Horas
- H^+	Íon hidrogênio
- HCO_3^-	Íon bicarbonato
- Ht	Hematócrito
- [Hb]	Concentração de hemoglobina
- K^+	Íon potássio
- KCN	Cianeto de potássio
- $K_3[Fe(CN)_6]$	Ferricianeto de potássio
- KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
- Km	Quilômetro
- Km^2	Quilômetros quadrados

- J_{in}	Influo
- J_{net}	Fluo líquido
- J_{out}	Efluo
- L	Litros
- m^3	Metros cúbicos
- Mg^{2+}	Íon magnésio
- mEq	Miliequilante
- mg	Miligramas
- ml	Mililitros
- mm	Milímetros
- μEq	Microequivalente
- μl	Microlitro
- nm	Nanômetros
- Na^+	Íon sódio
- ^{22}Na	Sódio radioativo
- NaCl	Cloreto de sódio
- nCi	Nano
- NH_4^+	Íon amônio
- nmol	Nanomoles
- OMA	Agregado óleo-mineral
- PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
- pH	Potencial hidrogeniônico
- pH	Potencial hidrogeniônico intraeritrocitário

- rpm Rotações por minuto
- SA Atividade específica do radioisótopo
- SEM Erro padrão da média
- WAF Fração insolúvel do petróleo
- WSF Fração solúvel do petróleo

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Petróleo	2
1.1.1. Petróleo no ambiente aquático.....	4
1.1.2. Petróleo na Amazônia	6
1.1.3. Dispersantes químicos do petróleo	7
1.2. Regulação iônica em peixes de água doce.....	8
1.2.1. Efeito do petróleo.....	12
1.2.2. Efeito dos dispersantes e da dispersão química do óleo cru	15
1.3. Objetivos	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1. Coleta e aclimação dos animais	18
2.2. Efeito da dispersão química sobre o fluxo de Na^+ , K^+ , e Cl^-	18
2.2.1. Protocolo Experimental.....	19
2.2.2. Análise das amostras	20
2.2.3. Cálculos.....	21
2.3. Efeito da dispersão química do óleo cru sobre parâmetros hematológicos	21
2.3.1. Protocolo experimental	22
2.3.2. Análise das amostras.....	23
2.4. Análise estatística	24
3. RESULTADOS.....	25
3.1. Fluxo unidirecional de Na^+	25
3.2. Fluxos líquidos de K^+ e Cl^-	27
3.3. Concentração de íons plasmáticos	28
3.4. Parâmetros hematológicos e glicose sangüínea.....	29
4. DISCUSSÃO.....	45
4.1. Fluxo unidirecional de Na^+	45
4.2 Fluxos líquidos de K^+ e Cl^-	49
4.3. Parâmetros hematológicos e íons plasmáticos	52
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1. Introdução

O crescente aumento na taxa de industrialização e no consumo de energia, particularmente nos grandes centros urbanos, ainda fazem do petróleo a principal fonte de matéria-prima utilizada, sendo empregado em inúmeros processos industriais, como na produção de combustíveis, cosméticos, materiais de limpeza, plásticos, solventes, explosivos, entre outros (Freedman, 1989; Cetesb, 2005). Os hidrocarbonetos são introduzidos nos ecossistemas aquáticos de diversas formas, podendo derivar de fontes naturais como algas e plâncton, ou de fontes antrópicas, como resíduos domésticos e industriais, além da queima incompleta de combustíveis fósseis e de biomassa vegetal. No entanto, os derramamentos de petróleo durante os processos de transporte e refino são responsáveis pelo maior aporte de hidrocarbonetos no ambiente (Cetesb, 2005). Dessa forma, o aumento da concentração de hidrocarbonetos nos ecossistemas aquáticos é decorrente da utilização indiscriminada do petróleo como fonte central para obtenção de energia.

Recentemente, os ecossistemas aquáticos brasileiros vêm sofrendo com o impacto da contaminação por hidrocarbonetos do petróleo, sendo registrados vazamentos na Baía de Guanabara/RJ (1300 m³ de óleo) e no canal de São Sebastião/SP (86 m³ de óleo) no ano de 2000, com implicações sobre os ecossistemas marinhos costeiros das regiões. Entretanto, o maior derramamento documentado ocorreu em águas interiores, nos Rios Barigui e Iguçu, no Paraná (2000), com a liberação de cerca de 4000m³ de óleo cru. Apesar disso, o monitoramento dos níveis de hidrocarbonetos do petróleo na água e no sedimento das áreas afetadas não tem indicado impacto significativo (Meniconi *et al.*, 2002). Contudo, componentes residuais do óleo, principalmente hidrocarbonetos

resistentes à degradação, tem sido detectados em áreas próximas dos locais de derrames, como observado por Douglas *et al.* (2002) nas proximidades do Rio Desaguadero, na Bolívia. No entanto, elevados níveis de hidrocarbonetos do petróleo têm sido reportados em amostras de sedimento e em mexilhões mesmo após quatro anos do derramamento, como no caso do acidente com o petroleiro *Exxon Valdez* no Alasca em 1989 (Paine *et al.*, 1996). Dessa forma, apesar dos rigorosos protocolos de segurança utilizado pela Petrobrás durante a extração, transporte e refino do óleo, o aumento da produção de gás natural e óleo cru na província de Urucu/AM tende a elevar os riscos de contaminação pelos hidrocarbonetos do petróleo nos complexos ecossistemas aquáticos da Amazônia, principalmente sobre a bacia do Rio Solimões, por onde é feito o escoamento da produção.

1.1. Petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos constituída por grandes quantidades de carbono e hidrogênio, além de oxigênio, nitrogênio e enxofre, sendo formado pela decomposição anaeróbica incompleta de matéria orgânica, tanto animal quanto vegetal, durante longos períodos geológicos. Essa mistura complexa é composta por 3 fases distintas, uma gasosa conhecida como gás natural, uma líquida chamada óleo cru, e uma sólida ou semi-sólida de natureza asfáltica (Freedman, 1989).

O óleo cru é formado por centenas de hidrocarbonetos que podem ser hidrossolúveis ou insolúveis em água, sendo que a fração solúvel (WSF) é composta principalmente por hidrocarbonetos de cadeia curta, enquanto a fração insolúvel (WAF) por hidrocarbonetos de cadeia longa (Freedman, 1989; Sauer & Boehm, 1995). Os

hidrocarbonetos de cadeia curta podem ser alifáticos ou aromáticos (como os poliaromáticos, PAHs), possuindo baixa pressão parcial de vapor, sendo extremamente voláteis e com curta permanência nos ambientes aquáticos (Sauer & Boehn, 1995). Contudo, muitos dos hidrocarbonetos de cadeia curta, particularmente os PAHs de maior tamanho, são considerados lipofílicos apresentando a capacidade de se acumular nos tecidos dos organismos aquáticos, representando a fração mais tóxica do óleo derramado (Neff, 1979).

Muitos PAHs, como o benzo[a]antraceno e o benzo[a]pireno, são reconhecidamente tóxicos aos organismos (Baird, 2002). Entretanto, estudos sobre a biotransformação dos PAHs têm demonstrado que estes compostos, por si só, não são agentes mutagênicos e cancerígenos. Uma vez dentro dos organismos, os PAHs sofrem reações de epoxidação e hidratação na sua estrutura química, sendo transformados em moléculas mais hidrofóbicas, o que facilita a sua excreção. Contudo, as moléculas intermediárias do processo de biotransformação podem produzir cátions mais estáveis e capazes de se ligar a outras moléculas, como o DNA, levando a formação de câncer (Baird, 2002; Azevedo & Lima, 2003).

Os hidrocarbonetos de cadeia longa são menos solúveis em água e, por essa razão, são muito mais persistentes nos ecossistemas aquáticos, podendo permanecer na superfície da coluna d'água criando uma barreira viscosa na interface ar-água, impedindo a penetração de luz e diminuindo a disponibilidade de oxigênio por meio de alterações nas taxas fotossintéticas. Quando comparado aos PAHs, os hidrocarbonetos de cadeia longa são considerados menos tóxicos aos organismos aquáticos, mas tendem a ser potencialmente perigosos à ictiofauna Amazônica, uma vez que muitas das espécies de

peixes da região desenvolveram adaptações comportamentais e morfológicas, além de ajustes bioquímicos e fisiológicos, para sobreviver às condições de escassa disponibilidade de oxigênio encontrada em grande parte dos corpos d'água da região (Val & Almeida-Val, 1995; Val, 1996), particularmente nos lagos de várzea e nos igapós durante a estação seca. Dessa forma, muitas das adaptações desenvolvidas pelos animais contra hipóxia ambiental, com o intuito de aumentar o transporte de oxigênio para os tecidos, acabam aumentando o contato com os xenobióticos, prejudicando a sua sobrevivência no caso de alterações ambientais causadas por ações antrópicas (Val, 1997; Val & Almeida-Val, 1999), como no caso de derramamentos de petróleo nos ecossistemas aquáticos.

1.1.1. Petróleo no ambiente aquático

Ao ser liberado para o ambiente e entrar em contato com a água, os hidrocarbonetos do petróleo presentes na camada de óleo sofrem uma série de reações de oxidação e redução denominadas de intemperismo. A velocidade com que se processam as reações de intemperismo é diferente para cada derramamento, sendo controlada por diversas características inerentes ao óleo e ao ambiente, tais como: tipo de óleo derramado, tipo de ambiente, condições ambientais (clima, turbulência, vento, sedimentação, fluxo de água, entre outras), atividade microbiana, local do derramamento (superfície e substrato) e o tempo (Sauer & Boehm, 1995). Os processos de intemperismo podem ser divididos em imediatos e tardios, sendo que os processos imediatos incluem a evaporação, a dispersão natural, a formação de uma camada de óleo na interface ar-água (dissipação) e a dissolução parcial de compostos na coluna d'água. Como exemplos de

processos tardios temos a biodegradação, a emulsificação do óleo na água e as transformações fotoquímicas (foto-oxidação). Alguns fatores como a espessura da camada de óleo, a intensidade luminosa, a aeração e a disponibilidade de nutrientes nos corpos d'água podem influenciar os processos de intemperismo, tanto instantâneos quanto tardios (Kingston, 2002).

Alguns dos processos de degradação do óleo como a dispersão natural, a dispersão química, a emulsificação e a biodegradação transformam a camada de óleo em pequenas gotículas que são menos impactantes ao ambiente porque são mais facilmente degradadas do que a camada de óleo, sendo a formação dessas gotículas dependente do fluxo de água e da turbulência do local (Wiese *et al.*, 1999). As gotículas podem interagir com material inorgânico particulado suspenso, como sedimentos carregados pelos corpos d'água ou transportados pelo vento (Payne *et al.*, 2003), ou ainda interagir com partículas biológicas, incluindo fitoplâncton e zooplâncton, sendo que este último pode ingerir as gotículas de óleo e liberá-las por meio das fezes (Johansson *et al.*, 1980). As gotículas de óleo podem também adsorver partículas minerais à sua superfície formando agregados óleo-minerais (OMA), sendo que a formação dos OMA é dependente de propriedades físicas dos minerais, como tamanho, densidade, composição e concentração, de propriedades do óleo, como viscosidade, tamanho das gotículas, composição, densidade e concentração, e de condições ambientais, como temperatura, pH, salinidade e condições hidrodinâmicas (Khelifa *et al.*, 2002). A ampliação do tamanho das gotículas de óleo por aglomeração, adsorção, ou por pelletização biológica pelo zooplâncton pode levar a um aumento da remoção do óleo e, por outro lado, aumentar a sedimentação e o transporte de

hidrocarbonetos para o sedimento, afetando mais de um compartimento do ecossistema (Delvigne, 2002).

1.1.2. Petróleo na Amazônia

As primeiras descobertas de jazidas de gás economicamente exploráveis na Amazônia Central foram feitas em dez campos dispersos no município de Carauari/AM no médio Juruá em 1978, enquanto a descoberta de petróleo só ocorreu em 1986 nas proximidades do Rio Urucu, a oeste de Carauari (Ab'Sáber, 2004). A exploração de petróleo na Amazônia é feita principalmente na bacia sedimentar do rio Solimões, com aproximadamente 1,8 milhões km², que possui uma reserva de 132 milhões de barris de petróleo. As primeiras descobertas de quantidades não comerciais de petróleo na Amazônia ocorreram no ano de 1954 nas cidades de Nova Olinda, Autaz Mirim, e Maués. Em 1976, foi realizado o primeiro levantamento sísmico na Bacia do Solimões e em 1986 iniciou-se a prospecção petrolífera na Amazônia com a descoberta da província de Urucu (Castelões, 2003).

Segundo dados da Unidade de Negócios da Bacia do Solimões (UN-BSOL), a produção de petróleo em 2002 foi de 58.074 barris/dia, totalizando 3,8% de toda produção nacional. O petróleo explorado na província de Urucu é considerado de alta qualidade e dele são produzidos os derivados mais nobres como o diesel e a nafta (Castelões, 2003). Quando os poços pioneiros de exploração ultrapassaram a marca de 3000 barris diários, o transporte do óleo começou a ser feito partindo de uma estação coletora improvisada no Rio Urucu até Manaus. No entanto, a partir do final dos anos 80 (88/89) o transporte de óleo começou a ser feito pelo Rio Tefé, percorrendo uma distância

de aproximadamente 990 km do porto terminal no próprio rio até a refinaria Isaac Sabba (Reman) em Manaus (Ab'Sáber, 2004).

1.1.3. Dispersantes químicos do petróleo

Dispersantes são compostos químicos que contêm em sua fórmula um ou mais surfactantes não-iônicos, surfactantes aniônicos e um ou mais solventes (National Research Council, 1989), sendo que normalmente os mesmos surfactantes são utilizados em fórmulas químicas de diversos dispersantes com diferenças apenas no tipo de solvente utilizado. Os surfactantes ou agentes tensoativos são substâncias orgânicas capazes de reduzir a tensão superficial da água devido à estrutura assimétrica de sua molécula, com a presença de um grupo fortemente hidrofílico (polar) e outro fortemente hidrofóbico (apolar), emulsificando moléculas hidrossolúveis e lipossolúveis por meio de formação de micelas (Mastroi, 1997). Os surfactantes demonstram uma marcada atividade biológica podendo se ligar a proteínas, peptídeos, DNA e membranas fosfolipídicas (Cserhádi *et al.*, 2002), aumentando a permeabilidade da membrana celular, interferindo na osmorregulação, no equilíbrio ácido-base e nas trocas gasosas (Abel, 1974, Heath, 1995).

Os dispersantes são empregados como respostas químicas aos derramamentos de petróleo, atuando na camada de óleo presente na interface ar-água, transformando-a em pequenas gotículas que penetram na coluna d'água. O real impacto do uso do dispersante em acidentes com petróleo ainda não está bem estabelecido. Pace *et al.* (1995) demonstraram que os dispersantes aumentam temporariamente a concentração do óleo na água quando comparados à quantidade de hidrocarbonetos que entram na coluna quando

o óleo é degradado naturalmente. Porém, a toxicidade inerente ao óleo permanece a mesma, independente se foi disperso química ou fisicamente. Alguns estudos de laboratório têm sugerido que os dispersantes aumentam a toxicidade do óleo, sendo o óleo dispersado quimicamente mais tóxico (National Research Council, 1989, Wolfe *et al.*, 2001). Por outro lado, a dispersão química do petróleo em pequenas gotículas aumenta a superfície de contato do óleo com o meio, facilitando sua biodegradação (Prince *et al.*, 2003).

O uso efetivo de dispersantes durante as primeiras horas de derramamentos pode prevenir ou reduzir o impacto a habitats costeiros e à fauna local. Contudo, o uso de dispersantes não é plenamente recomendado para todos os tipos de derramamento e habitats devido a limitações na capacidade de mistura imediata e da diluição (George-Ares & Clark, 2000). Características ambientais como temperatura, salinidade, dureza e turbulência da água podem também afetar a toxicidade dos dispersantes (Lewis, 1992). Baixas temperaturas, salinidade e turbulência, assim como altas diluições reduzem os potenciais efeitos adversos dos dispersantes, enquanto o aumento no tempo de exposição aos dispersantes geralmente resulta em aumento da toxicidade. As características da biota exposta aos surfactantes, como estágio de vida e variações intra e interespecífica, também determinam a toxicidade dos agentes tensoativos presentes na formulação dos dispersantes de óleo (George-Ares & Clark, 2000).

1.2. Regulação iônica em peixes de água doce

Peixes de água doce enfrentam um enorme desafio para manter a homeostase iônica, uma vez que apresentam fluidos corpóreos mais concentrados do que o meio em

que vivem e, dessa forma, o principal desafio para eles é evitar a perda de íons para o meio externo e regular a entrada excessiva de água (Evans, 1993; Schmidt-Nielsen, 1999; Baldisserotto, 2002). Os principais órgãos envolvidos na osmorregulação são as brânquias, o rim e a bexiga urinária, sendo as brânquias o principal órgão responsável pelas trocas gasosas e excreção dos resíduos metabólicos, desempenhando papel importante na absorção e excreção dos íons, participando, também, da manutenção do equilíbrio ácido-base (Wood, 1992; Goss *et al.*, 1998; Schmidt-Nielsen, 1999; Baldisserotto, 2002).

Os mecanismos de transporte iônico através do epitélio branquial apresentam estreita ligação com a regulação ácido-base, de modo que os peixes de água doce respondem rapidamente a alterações no seu “status” ácido-base sangüíneo por meio de modificações nas taxas de troca dos íons, particularmente do Na^+ e do Cl^- (Heisler, 1993; Goss *et al.*, 1998), uma vez que esses íons são absorvidos do ambiente aquático, enquanto equivalentes ácidos (H^+/NH_4^+) e básicos (HCO_3^-) são liberados para o meio, respectivamente (Evans, 1993; Baldisserotto, 2002). Ainda existem dúvidas sobre a maneira como o transporte através do epitélio é realizado, os locais exatos onde ocorrem esses processos de troca e os mecanismos reguladores desses processos (Evans, 1993; Goss *et al.*, 1998). Estudos têm sugerido que as células de cloreto (ou ricas em mitocôndrias - CC) e pavimentosas (CP) participam ativamente do processo de regulação iônica, sendo que Daborn *et al.* (2001) demonstraram que as CC podem participar ativamente da aclimatação de *Fundulus heteroclitus* a diferentes salinidades por meio da abertura e fechamento de suas criptas apicais, enquanto as CP apresentam a capacidade de reduzir a sua permeabilidade aos íons.

O modelo padrão aplicado para peixes teleósteos de água doce apresenta as CC como responsáveis pelo transporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, e como o HCO_3^- é fundamental para o tamponamento sanguíneo, alterações de pH podem influenciar o fluxo de Cl^- , de modo que em situações de acidose sanguínea, por meio de hiperóxia ou hipercapnia ambiental, ocorre uma grande redução na absorção de Cl^- (e excreção dos equivalentes básicos), e em alguns casos um aumento na absorção de Na^+ (e excreção dos equivalentes ácidos) (Evans, 1993; Goss *et al.*, 1998). Sendo assim, variações no pH do sangue promovem alterações no fluxo de Cl^- e estão intimamente relacionadas com modificações na morfologia do epitélio branquial, principalmente com as alterações na área superficial das CC, bem como com as variações no seu número e posicionamento nos filamentos branquiais. Desse modo, a taxa de troca $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ pode ser modificada pela cobertura das CC pelas CP adjacentes (Goss *et al.*, 1998).

O modelo para absorção de Na^+ propõe que o local de transporte desse íon é a superfície apical das CC, com as CP desempenhando pequena função no fluxo de Na^+ . Alguns estudos, por outro lado, têm sugerido que a absorção desse íon ocorre através da lamela dos filamentos branquiais em locais normalmente não associados com as CC (Goss *et al.*, 1998). Peixes de água doce (*Ameirus nebulosus*, por exemplo) submetidos à acidose sanguínea apresentaram um aumento significativo na densidade das microvilosidades na superfície das CP, com aumentado número de mitocôndrias e numerosas vesículas localizadas na porção apical do citoplasma. Essas alterações morfológicas e ultraestruturais sugerem um aumento da atividade metabólica das CP, indicando que este tipo celular participa da absorção de Na^+ (Goss *et al.*, 1998). A absorção de Na^+ envolve mecanismos de extrusão ativa de H^+ , via H^+ -ATPase que,

eletroquimicamente fazem com que o Na^+ entre passivamente nas células via canais apicais na membrana (Lin & Randall, 1993). As H^+ -ATPase estão localizadas na membrana apical e em vesículas sub-apicais nos filamentos e nas células lamelares. No entanto, ainda não está definido se as H^+ -ATPases localizam-se nas CC, nas CP ou em ambos tipos celulares.

Os peixes amazônicos têm evoluído em corpos d'água com grandes variações ambientais, diárias e sazonais, na quantidade de oxigênio dissolvido e na composição iônica, encontrando os menores níveis de sais dissolvidos nos riachos da bacia de drenagem do Rio Negro (Na^+ 16,5 $\mu\text{eq/l}$, K^+ 8,4 $\mu\text{eq/l}$, Mg^{2+} 9,4 $\mu\text{eq/l}$, Ca^{2+} 10,6 $\mu\text{eq/l}$, e H^+ 0,13 $\mu\text{eq/l}$) e os maiores no rio Solimões (Na^+ 98,5 $\mu\text{eq/l}$, K^+ 23,2 $\mu\text{eq/l}$, Mg^{2+} 88,0 $\mu\text{eq/l}$, Ca^{2+} 360 $\mu\text{eq/l}$, e H^+ 8,1 $\mu\text{eq/l}$) (Furch *et al.*, 1982). As águas da região possuem outras características peculiares como, baixo pH, escassez de íons dissolvidos, além de alta quantidade de matéria orgânica dissolvida quando comparados a outros ecossistemas de água doce, apresentando, também, variações no conteúdo eletrolítico, na quantidade de ácidos orgânicos dissolvidos e no pH, propriedades estas relacionadas às características geoquímicas de sua bacia de drenagem (Fitkau, 1964). Por isso, a ictiofauna amazônica tem desenvolvido ajustes comportamentais, fisiológicos e bioquímicos para sobreviver às contínuas e severas variações encontradas nos corpos d'água da região (Val, 1996).

A espécie amazônica *Metynnis hypsauchen* mantida em água com baixa concentração de íons proveniente do Rio Negro, apresentou perdas líquidas (J_{net}) de Na^+ e Cl^- durante as primeiras seis horas de exposição. No entanto, os animais estimularam o influxo alcançando valores positivos após 18 h de experimento. O aumento gradual da temperatura da água (1°C/h), de 26 para 33°C, resultou na perda dos dois íons, que se

mantiveram em níveis reduzidos mesmo após seis horas de exposição (Baldisserotto & Val, 2002). O tambaqui tem demonstrado grande habilidade em suportar o estresse provocado pela exposição ao pH ácido, particularmente por meio de alterações na permeabilidade da membrana branquial e pela manutenção de taxas significativas de influxo, podendo suportar a exposição a pH 3,5, reduzindo as perdas de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} após 18 h (Wood *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1999).

Matsuo & Val (2002), estudando duas espécies do gênero *Corydoras*, encontraram que a exposição a águas ácidas (pH 3,5) estimulou as perdas líquidas (J_{net}) dos íons Na^+ e K^+ ao longo de seis horas experimento, sendo que a presença de Ca^{2+} dissolvido na água reduziu a permeabilidade branquial aos íons, verificado pela redução do efluxo de Na^+ e K^+ . Outros caracídeos tropicais habitantes de águas ácidas e pobres em íons dos tributários do Rio Negro, como *Paracheirodon innesi*, *Gymnocorymbus ternetzi*, e *Paracheirodon axelrodi*, apresentam especializações nos mecanismos de transporte iônico contra o gradiente de concentração, com alta afinidade dos transportadores pelos íons (baixo K_m) e altas taxas de transporte (alto J_{max}), proporcionando altos valores de influxo (J_{in}) de Na^+ mesmo durante a exposição a pH 3,5 (Gonzalez *et al.*, 1997; Gonzalez & Prest, 1999; Gonzalez & Wilson, 2001).

1.2.1. Efeito do petróleo

Estudos prévios sobre o efeito tóxico do petróleo em peixes têm demonstrado que estes apresentam uma série de alterações fisiológicas (Engelhardt *et al.*, 1981; Alkindi *et al.*, 1996; Matsuo, 2004), comportamentais (Engelhardt *et al.*, 1981; Brauner *et al.*, 1999) e bioquímicas (Ponte & Val, 1996; Gagnon & Holdway, 1999), com o intuito de reduzir o

impacto dos hidrocarbonetos. A principal rota de entrada da maioria dos poluentes, e também dos hidrocarbonetos, nos peixes é através das brânquias (Abel, 1974; Wood, 1992; Mazon *et al.*, 1999), levando a distúrbios nos mecanismos de troca gasosa e iônica dos animais, comprometendo o metabolismo e o equilíbrio ácido-base.

A exposição da truta arco-íris (*Oncorhynchus mikiss*) aclimatada à água doce a diferentes tipos de petróleo, resultou em anormalidades comportamentais como nado desorientado, anorexia e reações de “tosse”, sendo evidentes também danos branquiais com separação do epitélio, anormalidades das células de cloreto (CC) e fusão das lamelas secundárias. A concentração dos íons monovalentes no plasma (Na^+ , K^+ , Cl^-) e a osmolalidade apresentaram reduções, sendo que os distúrbios hidrominerais reportados foram relacionados a danos na integridade do epitélio branquial (Engelhardt *et al.*, 1981). Alkindi *et al.* (1996), expondo exemplares de linguado *Pleuronectes flesus* L. a 50% da WSF por 48 h observaram elevações na concentração de glicose e de cortisol no plasma após três horas, sendo que estas se mantiveram até o final do período experimental. Também foram documentados distúrbios respiratórios, com a redução dos valores de Ht e da [Hb] após três horas e até o final das 48 h de exposição. Alterações na composição iônica do sangue foram modestas, sendo encontrados aumentos na concentração de K^+ plasmático após 24 h de exposição.

Alterações na homeostase iônica de peixes amazônicos têm sido reportadas quando estes são expostos ao petróleo, particularmente, por meio de distúrbios nos mecanismos de transporte iônico através do epitélio branquial, com relevante efeito sobre a composição iônica plasmática e o equilíbrio ácido-base dos animais (Mendes & Val, 1996; Matsuo, 2004). A espécie de respiração aérea facultativa, *Lipossarcus pardalis*,

quando exposta a uma lâmina de petróleo de 0,16 mm apresentou elevações do pH intraeritrocitário (pHi) e na concentração de Na^+ plasmático após 24 h de exposição. Exemplares de tambaqui expostos a diferentes frações de petróleo (1,4 a 11,2% do volume de água) apresentaram alterações na permeabilidade da membrana branquial, com distúrbios na dinâmica de transporte iônico, sendo estimuladas as perdas difusivas (J_{out}) e o transporte transcelular (J_{in}) de Na^+ , o que acarretou em perdas líquidas (J_{net}) modestas, mas constantes, ao longo de seis horas de exposição, com alterações da permeabilidade da membrana branquial também evidenciada pela indução da atividade da enzima CYP1A nas brânquias e no fígado dos animais, indicando a absorção, e o transporte de hidrocarbonetos nos organismos (Matsuo, 2004).

Muitas espécies da ictiofauna amazônica também têm apresentado alterações nos processos respiratórios quando expostas ao petróleo. Exemplares de tambaqui expostos ao petróleo aumentaram a concentração de glicose plasmática e o consumo de O_2 no coração e no fígado, além de distúrbios osmóticos com aumento na concentração plasmática de Na^+ após 24 h de exposição (Costa *et al.*, 1996). O tambaqui e o tamoatá quando expostos a uma lâmina de petróleo de 2,56 mm apresentaram redução no Ht e na [Hb], sendo encontradas alterações também nos leucócitos, com reduções nos níveis de linfócitos, neutrófilos e monócitos. (Oliveira & Val, 1996). A espécie de respiração aérea facultativa, *Hoplosternum littorale*, aumentou a frequência respiratória após 45 min de exposição ao óleo cru. Contudo, os valores de hematócrito e concentração de Na^+ e K^+ no plasma não apresentaram alterações significativas quando expostos a 50% da fração solúvel do petróleo (Brauner *et al.*, 1999).

1.2.2. Efeito dos dispersantes e da dispersão química do óleo cru

Organismos aquáticos expostos ao dispersante e ao óleo dispersado quimicamente podem exibir alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais. Os primeiros estágios de vida dos organismos são mais sensíveis aos dispersantes do que os animais adultos, sendo os peixes geralmente menos sensíveis aos dispersantes do que os crustáceos e moluscos (Singer *et al.*, 1995; George-Ares & Clark, 2000). A sobrevivência e o crescimento de juvenis de truta arco-íris (*O. mikiss*) têm sido comprometida após a exposição a dispersantes e ao óleo cru dispersado quimicamente, sendo que a mistura óleo e dispersante também provocou o aumento do conteúdo de água nos organismos, sugerindo alterações nos mecanismos de regulação da homeostase do animal (Lockhart *et al.*, 1996).

Juvenis de *Macquaria novemaculeata* (“Australian bass”) expostos ao dispersante Corexit 9527[®], na proporção de 1:30 (dispersante:óleo), demonstraram um aumento acentuado do consumo de oxigênio e da atividade da enzima citocromo c oxidase (CCO) nas brânquias e no fígado, sendo reportado também aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no fígado (Cohen *et al.*, 2001). Em outra série experimental, o óleo cru dispersado pelo Corexit 9527[®] apresentou maior toxicidade que o óleo queimado e o óleo cru em *M. novemaculeata*, com toxicidade sub-letal 6 a 7 vezes maior do que o observado para os outros dois tratamentos (Cohen & Nugegoda, 2000). Os valores de CL₅₀ (96 h) encontrados para juvenis de *Melanotaenia fluviatilis* indicam que os dispersantes aumentam a toxicidade do óleo cru, sendo que os menores valores de CL₅₀ foram encontrados para o óleo dispersado pelo dispersante Corexit 9527[®] e pelo Corexit 9500[®] (0,74 e 1,37 mg/l, respectivamente) (Pollino & Holdway, 2002).

No Brasil, apesar do aumento dos casos de contaminação dos corpos d'água por hidrocarbonetos do petróleo, poucos estudos tem sido realizados com o intuito de avaliar o efeito deletério das próprias atividades remediadoras realizadas durante a contenção e redução dos impactos gerados por derramamentos de petróleo. Segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente N° 269 (CONAMA, 2000), a utilização de dispersantes químicos do petróleo é proibida em áreas costeiras com baixa circulação e pouca renovação de água, em estuários, canais, ou áreas sensíveis como manguezais, marismas, recifes de corais, lagunas, restingas, baixios expostos pela maré, unidades de conservação, parques ecológicos e reservas ambientais, além de áreas discriminadas em mapas de sensibilidade ambiental como: locais de desova e berçário natural para peixes, território de espécies ameaçadas de extinção, áreas de migração e reprodução de espécies (mamíferos, aves, tartarugas) ou de criação artificial de peixes, crustáceos e moluscos com interesse comercial, ou ainda em áreas onde os recursos hídricos são utilizados para abastecimento humano ou fins industriais.

No entanto, face ao potencial risco que um acidente com petróleo tem sobre os ecossistemas aquáticos da Amazônia, uma vez que estes apresentam grandes variações espaciais em suas características físico-químicas, além de, apresentar alterações sazonais no volume de água dos sistemas que determinam modificações na biodisponibilidade dos hidrocarbonetos do petróleo aos organismos, a utilização de dispersantes químicos pode auxiliar no esforço para minimizar o impacto de derramamentos na região. Contudo, o efeito dos hidrocarbonetos do petróleo e do óleo dispersado quimicamente sobre os peixes de água doce, particularmente sobre os mecanismos de transporte iônico e

manutenção da homeostase da fauna de peixes da Amazônia, necessita ser melhor estudado.

1.3. Objetivos

1.3.1. Gerais

A presente proposta tem como objetivo avaliar a toxicidade da dispersão química do óleo cru sobre a regulação iônica da espécie de peixe tropical *Colossoma macropomum*, contribuindo na busca de soluções em casos de acidente com petróleo nos complexos ecossistemas amazônicos, colaborando na geração de medidas legalmente aplicáveis sob os poluentes e sua implicação sobre a biota aquática.

1.3.2. Específicos

O presente trabalho buscou analisar o efeito da dispersão química do óleo cru sobre a regulação iônica e aspectos respiratórios em juvenis de *C. macropomum*, verificando se o óleo cru tem o seu efeito tóxico aumentado com o uso do dispersante químico Corexit 9500[®]. Para tanto, foi analisado o efeito do óleo cru, do dispersante Corexit 9500[®], e da mistura óleo cru e dispersante sobre a dinâmica de transporte do íon Na⁺ através da membrana branquial, além de avaliar o fluxo líquido dos íons K⁺ e Cl⁻. Foi também verificado o efeito tóxico da dispersão química do óleo sobre a concentração plasmática dos principais íons (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻), e alguns parâmetros respiratórios (hematócrito, concentração de hemoglobina) e de estresse (concentração plasmática de glicose) no tambaqui (*C. macropomum*).

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e aclimação dos animais

Os juvenis de tambaqui, pesando em média $2,42 \pm 0,60\text{g}$, foram adquiridos da Fazenda Santo Antônio, localizada na rodovia AM-010 (Km 113, Rio Preto da Eva), e transportados em sacos plásticos até o laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular – LEEM, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Nas dependências do laboratório, os animais foram submetidos a um tratamento profilático com sal, segundo Pavanelli *et al.* (1998), onde foram mantidos em solução 0,3 % de NaCl por 24 h, em tanque de 500 L com aeração constante. Após a profilaxia, os animais foram aclimatados em tanques de 3000 L com aeração constante e renovação ininterrupta de água (~20ml/s). Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial (26% de proteína bruta), três vezes ao dia *ad libitum*, durante todo o período pré-experimental. A alimentação foi interrompida uma semana antes do início das séries experimentais.

2.2. Efeito da dispersão química sobre o fluxo de Na^+ , K^+ , e Cl^-

Este experimento analisou o efeito do óleo cru, do dispersante Corexit 9500[®] e da dispersão química do óleo cru sobre a dinâmica de transporte do íon Na^+ e fluxo líquido de K^+ e Cl^- no tambaqui. Dessa forma, foi analisado quantitativamente o fluxo dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- , bem como as taxas de influxo (J_{in}) e efluxo (J_{out}) de Na^+ .

O fluxo unidirecional de Na^+ foi estimado a partir do desaparecimento do radioisótopo (^{22}Na) das câmaras experimentais. Este procedimento apresenta grandes vantagens em relação à determinação dos eletrólitos no plasma, uma vez que apresenta

maior sensibilidade, é um método não invasivo, e o mesmo animal pode ser utilizado para amostragens ao longo do tempo (para mais detalhes ver Wood, 1992). O fluxo líquido dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- foi determinado pelo aumento (ou diminuição) da concentração destes íons nas câmaras experimentais ao longo do tempo.

2.2.1. Protocolo Experimental

Os juvenis de tambaqui, pesando em média $8,96 \pm 0,19$ g, foram transferidos individualmente para câmaras de polipropileno com aeração constante, recobertas com plástico preto, em um volume de água de 500 ml, para aclimatação antes do início da fase experimental. Após 24 h nas câmaras, os animais foram enxaguados por 30 s em água destilada e transferidos para novas câmaras de polipropileno com volume de água de 300 ml onde permaneceram em repouso por mais uma hora. Os experimentos foram conduzidos sem renovação do volume de água das câmaras, caracterizando um sistema estático.

A concentração de óleo cru utilizada no experimento foi de 2% do volume de água (6 ml de óleo cru), sendo o óleo cru liberado na interface ar-água com o auxílio de uma seringa de plástico. No tratamento concomitante do dispersante Corexit 9500[®] e do óleo cru foram testadas duas concentrações: 1:1000 e 1:1200 (1 parte de dispersante para 1000 e 1200 partes de óleo cru, ou 6 μl e 5 μl de dispersante para 6 ml de óleo cru, respectivamente). Para o tratamento somente com dispersante Corexit 9500[®] também foram utilizadas as concentrações de 1:1000 e 1:1200 (6 μl e 5 μl , respectivamente). Em todos os tratamentos com o dispersante foi preparada uma solução diluída na proporção de 1 parte de dispersante para 100 partes de água deionizada (200 μl para 20 ml). A

solução estoque de dispersante foi preparada por meio de agitação mecânica por uma hora antes de ser utilizada nos experimentos.

O experimento de fluxo unidirecional consistiu de 4 tratamentos, controle (CTL), óleo cru (OC), dispersante (DIS), e óleo cru + dispersante (OC+DIS), com 10 animais submetidos a cada tratamento. Após o período de aclimação por uma hora nas câmaras experimentais no volume determinado (300 ml), foi adicionado em cada câmara experimental 27 µl do estoque de 5 nCi/µl de ^{22}Na , observado a seguir um período de 10 min para a mistura e homogeneização da solução dentro das câmaras. Em seguida, o óleo cru e a solução de dispersante foram colocados nas câmaras experimentais de acordo com os tratamentos. Imediatamente após, a primeira amostra de 20 ml de água foi retirada indicando o início do período de análise do fluxo (T0). Amostras consecutivas foram retiradas após 3, 6, 9, 12 e 24 horas de experimento. As amostras foram acondicionadas em "vials" e mantidas a -4°C até o momento da análise.

2.2.2. Análise das amostras

A determinação dos cátions Na^{+} e K^{+} nas amostras retiradas ao longo da fase experimental foi realizada por meio de espectrofotometria de absorção atômica (AAAnalyst 800, Perkin-Elmer), enquanto a concentração do ânion Cl^{-} foi determinada pelo método descrito por Zall *et al.* (1956). Para a determinação da contagem (cpm) do ^{22}Na nas amostras, alíquotas de 500 µl de água foram transferidas para vials de cintilação, às quais foram adicionados 2,5 ml de coquetel de cintilação para amostras aquosas (ACS - Amershan Biosciences). Os vials foram agitados para homogeneização da solução, e transferidos para o cintilador (LS 6500 - Beckman Coulter), onde cada amostra foi

“contada” por 5 min. Os resultados, expressos em cpm, foram utilizados para a determinação da atividade específica (SA) do marcador radioativo nas câmaras experimentais, sendo a SA empregada nos cálculos de fluxo unidirecional.

2.2.3. Cálculos

Para a determinação do fluxo unidirecional de Na⁺ (J_{in}, J_{out}, J_{net}) e os fluxos líquidos de Na⁺, K⁺, e Cl⁻, foram utilizados os resultados obtidos na análise da concentração dos íons e da contagem do radioisótopo nas amostras de água retiradas durante o experimento de fluxo, de acordo com o descrito por Wood (1992):

$$J_{net} = ([\text{íon}_1]) - [\text{íon}_2]). V / W . T,$$

$$J_{in} = ([R_1] - [R_2]). V / 0,5 . W . T . SA,$$

$$J_{out} = J_{net} - J_{in},$$

onde, **íon₁** e **íon₂** são, respectivamente, as concentrações inicial e final dos íons na água (μmol/l), **V** é o volume (L) de água na câmara no final do intervalo de amostragem, **W** é o peso do peixe (g), **T** é o intervalo de tempo (h) entre o início e o final da amostragem, **R₁** e **R₂** são as contagens (cpm) do radioisótopo no início e no final do intervalo de amostragem, respectivamente, e **SA** é a atividade específica do radioisótopo (cpm/ml), que é determinada da seguinte forma:

$$SA = ([R_1] / [\text{íon}_1]) + ([R_2] / [\text{íon}_2])$$

2.3. Efeito da dispersão química do óleo cru sobre parâmetros hematológicos

O efeito do óleo cru, do dispersante Corexit 9500[®] e da dispersão química do óleo cru sobre a homeostase iônica e sobre determinados parâmetros hematológicos do

tambaqui foi determinado por meio da análise da concentração dos principais íons (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-) no plasma, da concentração de glicose sanguínea, do hematócrito (Ht) e da concentração de hemoglobina ([Hb]).

2.3.1. Protocolo experimental

Para esta série experimental foram utilizados juvenis de tambaqui pesando em média $32,74 \pm 0,44\text{g}$, aclimatados individualmente em câmaras de polipropileno com aeração constante, recobertas com plástico preto, em um volume de 2 L por 24 h. Em seguida, os animais foram transferidos para novas câmaras de polipropileno com o volume de água de 1 L e permaneceram em repouso por mais uma hora. Novamente não houve renovação da água e dos químicos utilizados nos testes, caracterizando um sistema estático.

A concentração de óleo cru utilizada nesta série experimental foi a mesma empregada para os experimentos de fluxo unidirecional, isto é, 2% do volume de água. Nos tratamentos com o dispersante Corexit 9500[®] foi testada apenas a proporção de 1:1200 (dispersante:óleo cru, ou 16,6 μl de dispersante para 20 ml de óleo cru). A solução estoque de dispersante utilizada nos testes foi preparada conforme o descrito para os experimentos de fluxo unidirecional.

Para esta análise também foram utilizados quatro tratamentos, controle (CTL), dispersante (DIS), óleo cru (OC), e a mistura óleo cru e dispersante (OC + DIS), sendo 10 indivíduos submetidos a cada tratamento para cada intervalo de tempo de exposição (T0, 3, 6, 9, 12, e 24 h de experimento), perfazendo 240 animais experimentais. Após o período de exposição, os animais foram retirados das câmaras e amostras de sangue

foram coletadas com seringas heparinizadas por meio de punção da veia caudal, e mantidas no gelo enquanto eram processadas as análises dos parâmetros hematológicos.

2.3.2. Análise das amostras

A partir do sangue total retirado de cada animal nos cinco intervalos de exposição aos tratamentos foram determinados o hematócrito (Ht), a concentração de hemoglobina ([Hb]) e a concentração de glicose plasmática. Para determinar o valor do Ht, duas amostras de sangue de cada animal foram transferidas para tubos de microhematócrito e centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 min, em uma centrífuga FANEM Modelo 207N, sendo a leitura do percentual (%) de sedimentação dos eritrócitos feita com o auxílio de um cartão padronizado. Já a [Hb] foi determinada pelo método da cianometahemoglobina descrito por Kampen & Zijlstra (1964). Para tanto, 15µl de sangue foram diluídos em 3ml do reagente de Drabkin (KCN 0,5g; KH₂PO₄ 1,4g; K₃[Fe(CN)₆] 2,0g; água destilada q.s.p. 1000ml). A absorvância das amostras foi determinada no comprimento de onda de 540nm, em um espectrofotômetro Spectronic Genesis-2, sendo a solução de Drabkin utilizada como “branco”. Os valores da concentração de hemoglobina foram expressos em g/dl e calculados por meio da seguinte equação:

$$[\text{Hb}] \text{ (g/dl)} = A_{540} \times 0,146 \times D$$

onde, A_{540} = absorvância das amostras em 540 nm, $0,146$ = fator de correção e D = diluição (200 x).

A concentração de glicose foi determinada com auxílio de medidor eletrônico de glicose sangüínea (Accu-Chek Advantage II / Roche), onde 10µl de sangue total são

colocados em fitas de leitura do aparelho que, por meio de uma análise eletroquímica da amostra, apresenta a concentração de glicose em g/dl.

Para a determinação dos níveis plasmáticos de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Cl^- , o sangue total foi centrifugado por 10 min a 3.000 rpm em uma centrífuga NT-801. O sobrenadante (plasma) foi retirado e armazenado em tubos tipo eppendorfs a -4°C até o momento das análises. Para a determinação da concentração de Na^+ , K^+ e Cl^- , as amostras de plasma foram diluídas 1000 x em água deionizada e para a determinação da concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} , as amostras de plasma foram diluídas 200 x em solução de cloreto de lantânio 0,1%. A concentração dos cátions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} foram determinados por meio de espectrofotometria de absorção atômica (AAAnalyst 800 - Perkin-Elmer), enquanto o ânion Cl^- foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Zall *et al.* (1956).

2.4. Análise estatística

Os resultados obtidos nas séries experimentais estão expressos como Média \pm SEM. A análise estatística foi realizada por meio de uma análise de variância de um fator (ANOVA one-way), seguido de teste de comparação múltipla de Dunnett. Foi utilizado também o teste de Tukey para discriminação de diferenças entre os tratamentos experimentais. No caso dos dados analisados não atenderem as premissas para a utilização da ANOVA, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste à posteriori de Dunn's (Zar, 1984). Foi mantido o nível de significância de 95% em todas as análises para a discriminação das diferenças significativas entre as médias.

3. Resultados

3.1. Fluxo unidirecional de Na⁺

A análise dos fluxos unidirecionais (J_{in} , J_{out} , J_{net}) de Na⁺ dos exemplares de tabaqui indica um efeito pronunciado da dispersão química do óleo sobre a dinâmica de transporte deste íon (Figs. 1 e 2). O tratamento OC + DIS aumentou significativamente as taxas de efluxo de Na⁺ (J_{out}), em relação ao grupo controle, nas duas concentrações testadas (1:1000 e 1:1200) para o dispersante Corexit 9500[®]. Os maiores valores de J_{out} , -742,45 e -714,20 nmol/g/h, foram encontrados no tratamento com a proporção 1:1000 de dispersante (Fig. 1), após três e seis horas de exposição, respectivamente, sendo que, após seis horas de exposição as perdas difusivas foram contidas, atingindo valores próximos do controle. Na proporção de 1:1200 (Fig. 2), as perdas difusivas também foram significativas, -708,03 nmol/g/h, no período de 3-6 h de exposição, mas rapidamente os animais demonstraram capacidade de reduzir estas perdas aos níveis encontrados nos animais controle. Somente no último período de análise (12-24 h) os valores de J_{out} dos animais submetidos ao OC+DIS voltaram a apresentar diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Ao contrário do padrão de resposta bem definido encontrado para o efeito da dispersão química sobre o J_{out} de Na⁺, nas duas concentrações de dispersante testadas foram observados efeitos diferentes sobre o influxo de Na⁺ (J_{in}) nos exemplares de tabaqui. Nas primeiras três horas de exposição à concentração mais diluída de dispersante (1:1200), os animais apresentaram uma inibição significativa na taxa de influxo (25%), que aliada às enormes perdas difusivas deste período, proporcionaram as

perdas líquidas (J_{net}) significativas encontradas durante as primeiras horas de exposição ao OC+DIS. As taxas de influxo somente voltaram a apresentar uma inibição significativa nos seus valores após nove horas de exposição ao OC +DIS. Nesta série experimental (1:1200), os animais expostos ao tratamento OC também apresentaram diferenças significativas nas J_{net} durante as primeiras três horas (Fig. 2).

No tratamento OC+DIS com a maior concentração de dispersante testada (1:1000), houve um aumento significativo nas taxas de J_{in} (~200%), em relação ao grupo controle, no período de 3-6 h. No entanto, as enormes taxas de efluxo (J_{out}) dos animais durante as primeiras seis horas de experimento, contribuíram para a manutenção das perdas líquidas (J_{net}) durante as primeiras seis horas de exposição ao OC+DIS. Esse aumento nas taxas de influxo permaneceu ao longo do experimento, sendo encontradas diferenças significativas após 9 h de exposição, as quais permaneceram até o final da fase experimental. Neste experimento, os exemplares de tambaquis expostos ao OC também apresentaram taxas de J_{in} aumentadas após 12 h de exposição ao tratamento (Fig. 1).

Na série experimental com a concentração de dispersante diluída 1:1200, todos os tratamentos, DIS, OC, e OC+DIS, apresentaram fluxos líquidos (J_{net}) de Na^+ significativamente diferentes dos níveis encontrados para os animais controle (11,24; -128,32; e -320,01 nmol/g/h, respectivamente), nas primeiras três horas de experimento. Após 12 h de teste, somente os tratamentos OC e OC+DIS demonstraram valores de J_{net} significativamente diferentes daqueles apresentados pelo grupo controle, sendo que no caso do tratamento OC+DIS, também foram observadas perdas líquidas de Na^+ neste período de teste (Fig. 2). Na proporção de 1:1000 de dispersante os animais expostos ao tratamento OC+DIS apresentaram severas perdas líquidas de Na^+ (-661,78 e -498,98

nmol/g/h) durante os primeiros dois intervalos de tempo (três e seis horas de exposição, respectivamente). Neste teste, o tratamento OC também apresentou perdas líquidas significativamente maiores do que o grupo controle, mas somente no período de 6-9 h de exposição (Fig. 1).

3.2. Fluxos líquidos de K^+ e Cl^-

A avaliação dos efeitos da dispersão química do óleo cru sobre os fluxos líquidos dos íons K^+ e Cl^- revelou comportamentos distintos quanto à manutenção do balanço destes íons nos tabaquis (Figs. 3 a 6). O fluxo líquido de K^+ apresentou resposta dependente da concentração de dispersante, sendo que na concentração de 1:1200 não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento OC+DIS e o grupo controle. Nesta série experimental, o tratamento DIS apresentou um aumento significativo nas perdas líquidas durante as primeiras três horas de exposição, enquanto os animais submetidos ao tratamento OC demonstraram um J_{net} positivo (39,59 nmol/g/h) e próximo à zero, nos dois últimos períodos de exposição (9-12 e 12-24 h), respectivamente (Fig. 4). Já os efeitos do tratamento OC+DIS sobre o J_{net} do K^+ na maior concentração de dispersante (1:1000) foram muito mais severos e contínuos, e estão representados por perdas líquidas significativas (-122,96; -64,67; -186,46 nmol/g/h) de K^+ ao longo das primeiras horas de exposição ao tratamento (3, 6 e 9 horas de exposição, respectivamente). A análise do último período de exposição (12-24h) ao OC+DIS, também revelou perdas líquidas de K^+ significativamente maiores do que as encontradas no grupo controle. Os animais submetidos ao tratamento OC nesta série experimental também apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, representadas por

um aumento das perdas e dos ganhos líquidos de K^+ nos períodos de 0-3 e 9-12 h, respectivamente (Fig. 3).

As maiores perdas líquidas de Cl^- (-756,07 e -514,05 nmol/g/h), foram observadas nos exemplares de tabaqui submetidos ao OC+DIS durante as primeiras horas de exposição (0-3h) nas duas concentrações de dispersante testadas (1:1000 e 1:1200, respectivamente). Na proporção de 1:1200, as perdas permaneceram elevadas e significativamente diferentes do grupo controle ao longo das primeiras nove horas de exposição ao OC+DIS, sendo que após esse período os valores atingiram níveis próximos ao controle (Fig. 6), enquanto que na maior concentração de dispersante (1:1000) não foram encontradas diferenças em relação ao controle apenas no segundo período de exposição (3-6h), porém as perdas observadas nos demais períodos experimentais foram mais persistentes, sendo encontradas até as 12 h de experimento. Nesta série experimental, o tratamento OC também apresentou perdas líquidas significativas de Cl^- em relação ao controle nos períodos 0-3 e 9-12 h de exposição (Fig. 5).

3.3. Concentração de íons plasmáticos

A análise da concentração dos principais íons plasmáticos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Cl^-) dos exemplares de tabaqui submetidos à série experimental onde a concentração de dispersante Corexit 9500[®] testada foi de 1:1200 não demonstrou efeito significativo sobre a maioria dos íons avaliados (Figs. 7 a 11), exceto para o K^+ , que se comportou de forma diferenciada ($P < 0,05$). Durante as primeiras três horas de exposição, os animais submetidos aos tratamentos DIS, OC, e OC+DIS tiveram uma redução na concentração de K^+ no plasma, sendo encontradas diferenças significativas no tratamento DIS no início do período de amostragem (T0) e nos tratamentos OC e OC+DIS após três horas de

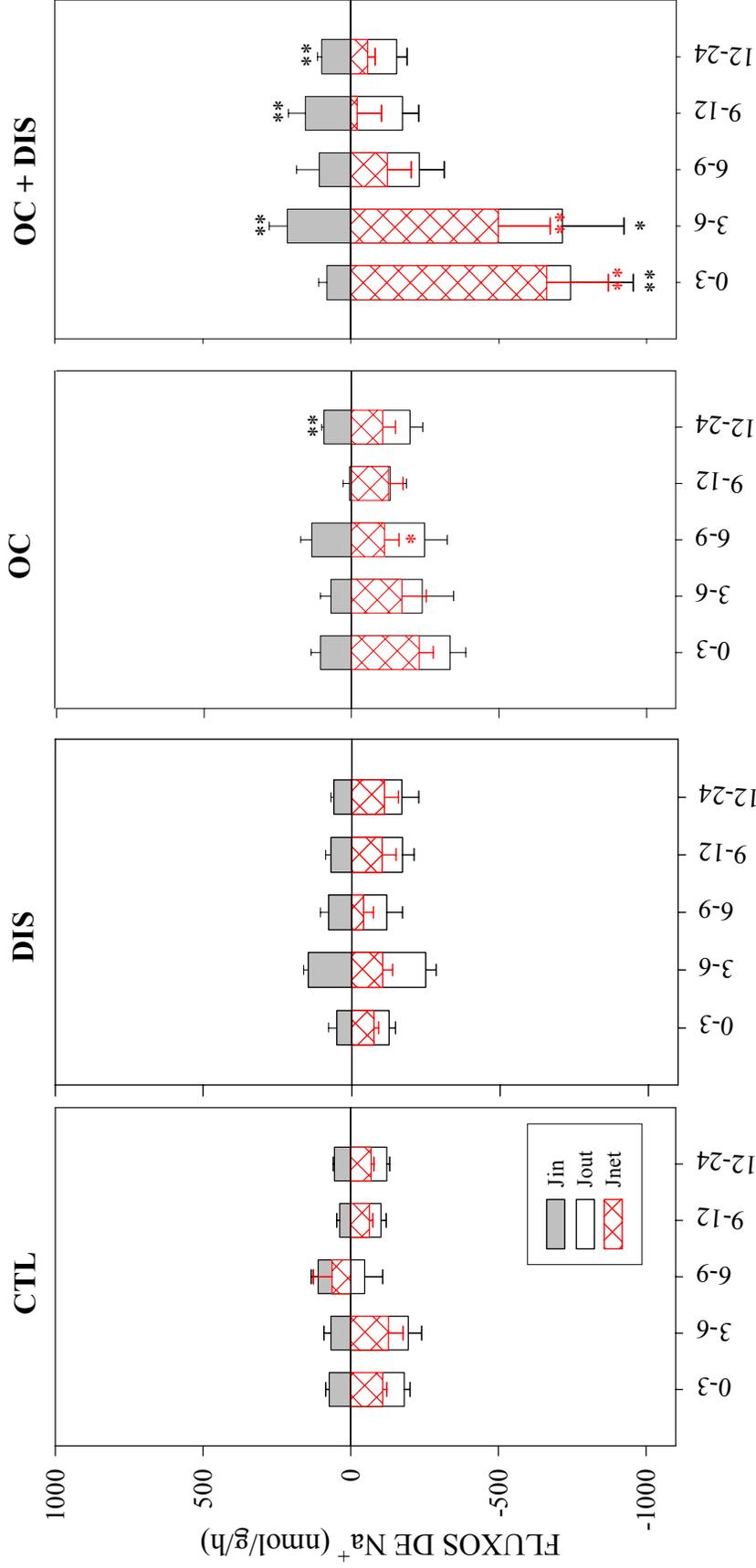
exposição. Após seis horas de experimento, todos os tratamentos apresentaram um aumento de K^+ no plasma, sendo que somente aqueles expostos ao OC e OC+DIS apresentaram um aumento significativo. Ao final das 24 h de exposição aos tratamentos, somente os exemplares de tabaqui submetidos ao tratamento OC+DIS apresentaram novamente concentrações plasmáticas de K^+ significativamente mais elevadas do que as observadas no grupo CTL (Fig. 7).

O tratamento com OC+DIS causou reduções significativas nas concentrações de Na^+ e Cl^- plasmáticos após 6 (105,11 mEq/l) e 12 h (134,08 mEq/l), respectivamente, sendo também verificada redução na concentração de Cl^- nos exemplares de tabaqui expostos ao OC após seis h de experimento (Figs. 8 e 11). Os níveis do cátion divalente Ca^{2+} reduziram-se significativamente em relação ao grupo controle nos animais submetidos ao OC+DIS após 24 horas de exposição, enquanto os níveis de Mg^{2+} não foram afetados (Figs. 9 e 10).

3.4. Parâmetros hematológicos e glicose sanguínea

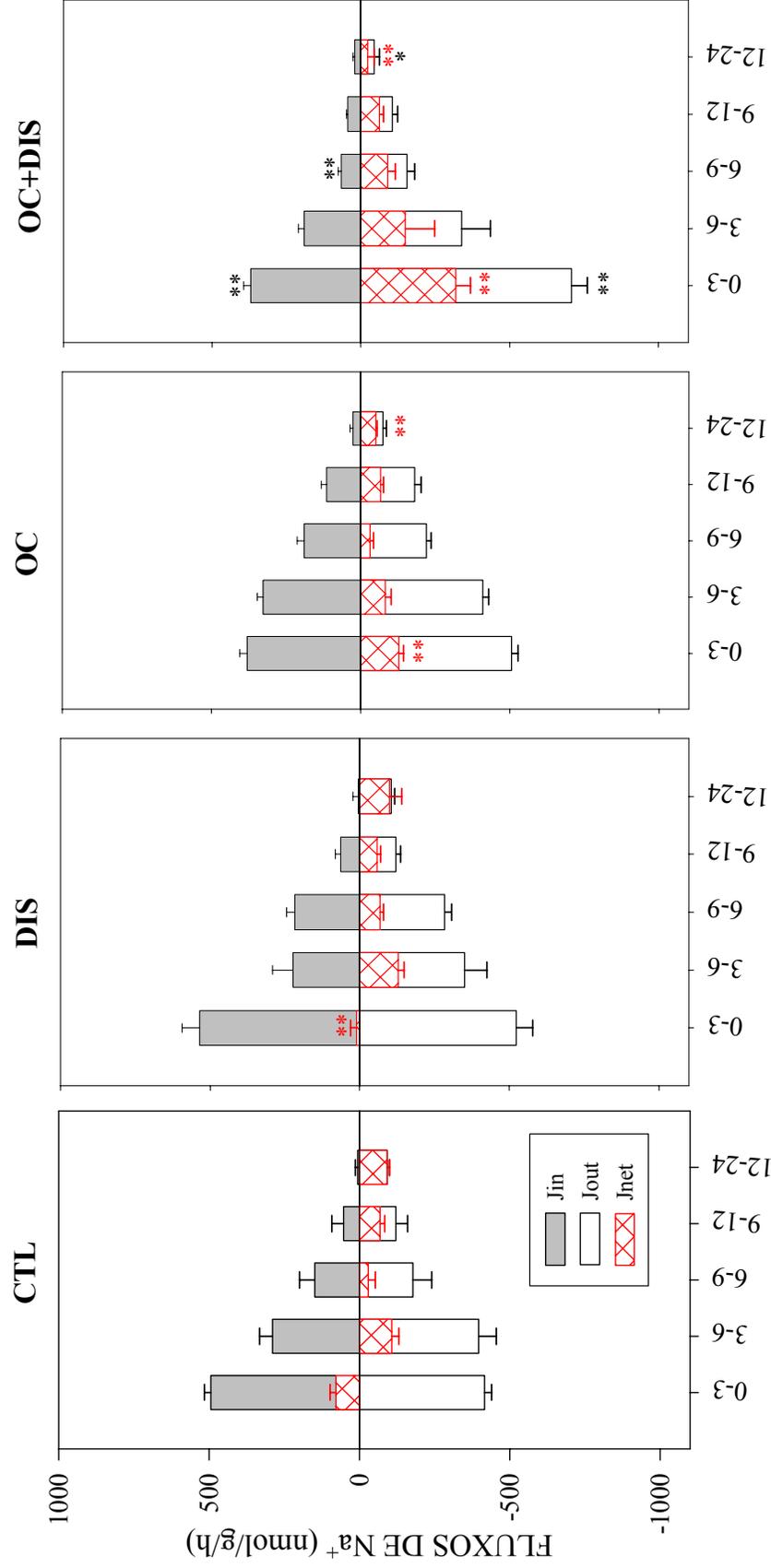
Tanto os parâmetros hematológicos analisados (Ht, e [Hb]) quanto a concentração de glicose sanguínea apresentaram respostas significativas à dispersão química do óleo cru (Figuras 12 a 14). O sangue dos exemplares de tabaqui submetidos por 24 h ao OC+DIS apresentou um aumento na porcentagem de sedimentação dos eritrócitos (~30% de sedimentação). Já a [Hb] foi reduzida significativamente para níveis abaixo de 5 g/dL nos exemplares de tabaqui submetidos aos tratamentos DIS e OC+DIS após seis horas de exposição. A concentração de glicose sanguínea apresentou variações significativas em relação ao grupo controle dependente do tratamento e do tempo de exposição. Nos animais submetidos ao OC+DIS, nos primeiros momentos de exposição (T0), uma

redução moderada, porém significativa, atingindo valores médios de 49 g/dL. Somente após 24 h de exposição ao OC e ao OC+DIS é que os níveis sanguíneos de glicose voltaram a apresentar valores significativamente maiores do que o grupo controle.



INTERVALO DE TEMPO (h)

Figura 1. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre os fluxos de Na^+ em juvenis de tabaqui (*C. macropomum*). OC – 2% Vol. Água; DIS – 1:1000 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média \pm SEM. (*) indica diferença significativa no influxo (J_{in}) e no efluxo (J_{out}) em relação ao grupo controle (CTL), no mesmo período experimental ($p < 0,05$). (**) indica diferença significativa no influxo (J_{in}) e no efluxo (J_{out}) em relação ao grupo CTL, no mesmo período experimental ($p < 0,01$). (*) representa diferença significativa no fluxo líquido (J_{net}) em relação ao grupo CTL no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). (**) representa diferença significativa no fluxo líquido (J_{net}) em relação ao grupo CTL no mesmo tempo experimental ($p < 0,01$).



INTERVALO DE TEMPO (h)

Figura 2. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre os fluxos de Na⁺ em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% Vol. Água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média ± SEM. (*) indica diferença significativa no influxo (J_{in}) e no efluxo (J_{out}) em relação ao grupo controle (CTL), no mesmo período experimental (p<0,05). (**) indica diferença significativa no influxo (J_{in}) e no efluxo (J_{out}) em relação ao grupo CTL, no mesmo período experimental (p<0,01). (*) representa diferença significativa no fluxo líquido (J_{net}) em relação ao grupo CTL no mesmo tempo experimental (p<0,05). (**) representa diferença significativa no fluxo líquido (J_{net}) em relação ao grupo CTL no mesmo tempo experimental (p<0,01).

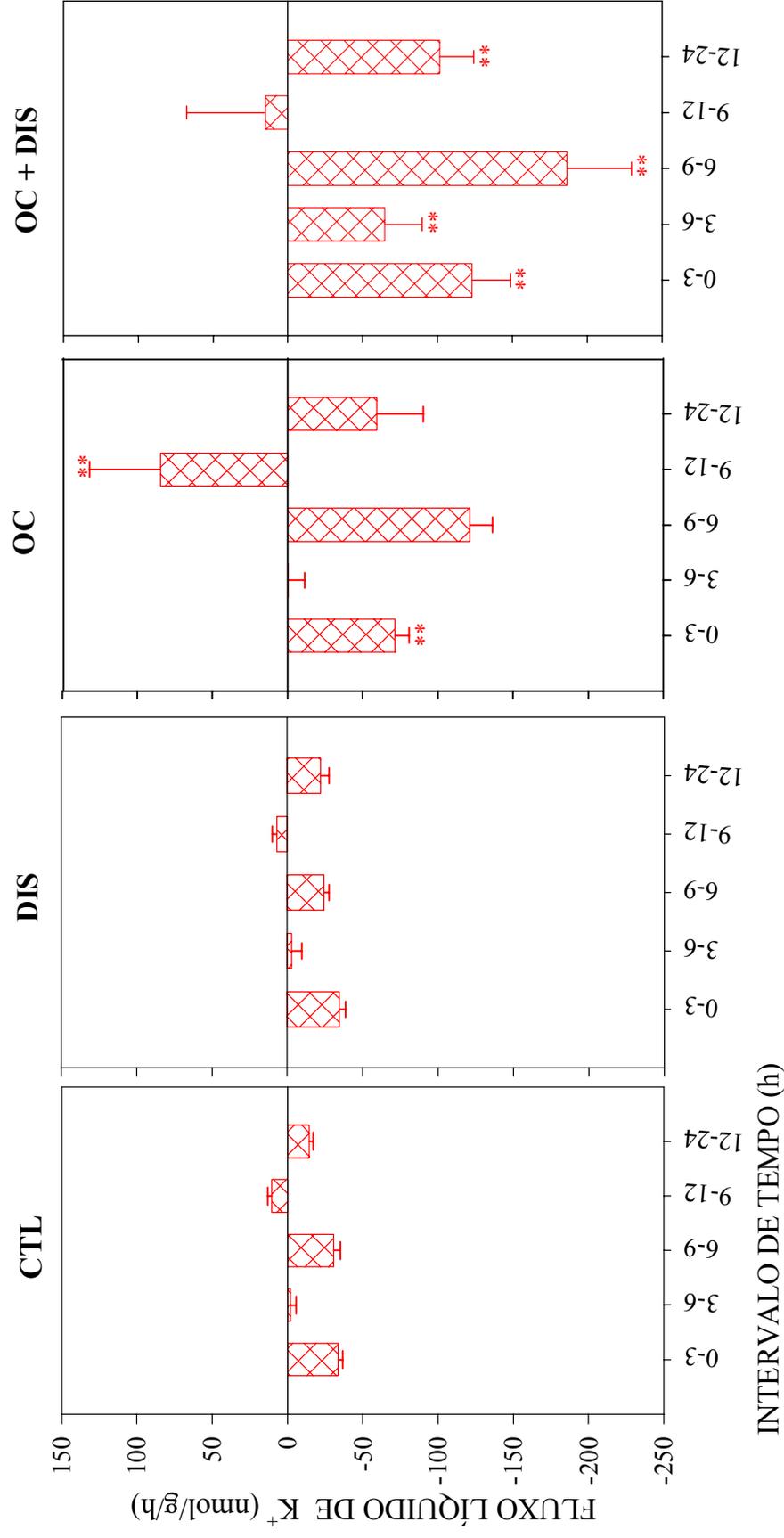


Figura 3. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre o fluxo líquido de K⁺ em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% Vol. Água; DIS – 1:1000 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média ± SEM. (*) representa diferença significativa no fluxo líquido no grupo CTL no mesmo tempo experimental (p<0,05). (**) indica diferença significativa no fluxo líquido (J_{net}) em relação ao grupo CTL, no mesmo período experimental (p<0,01).

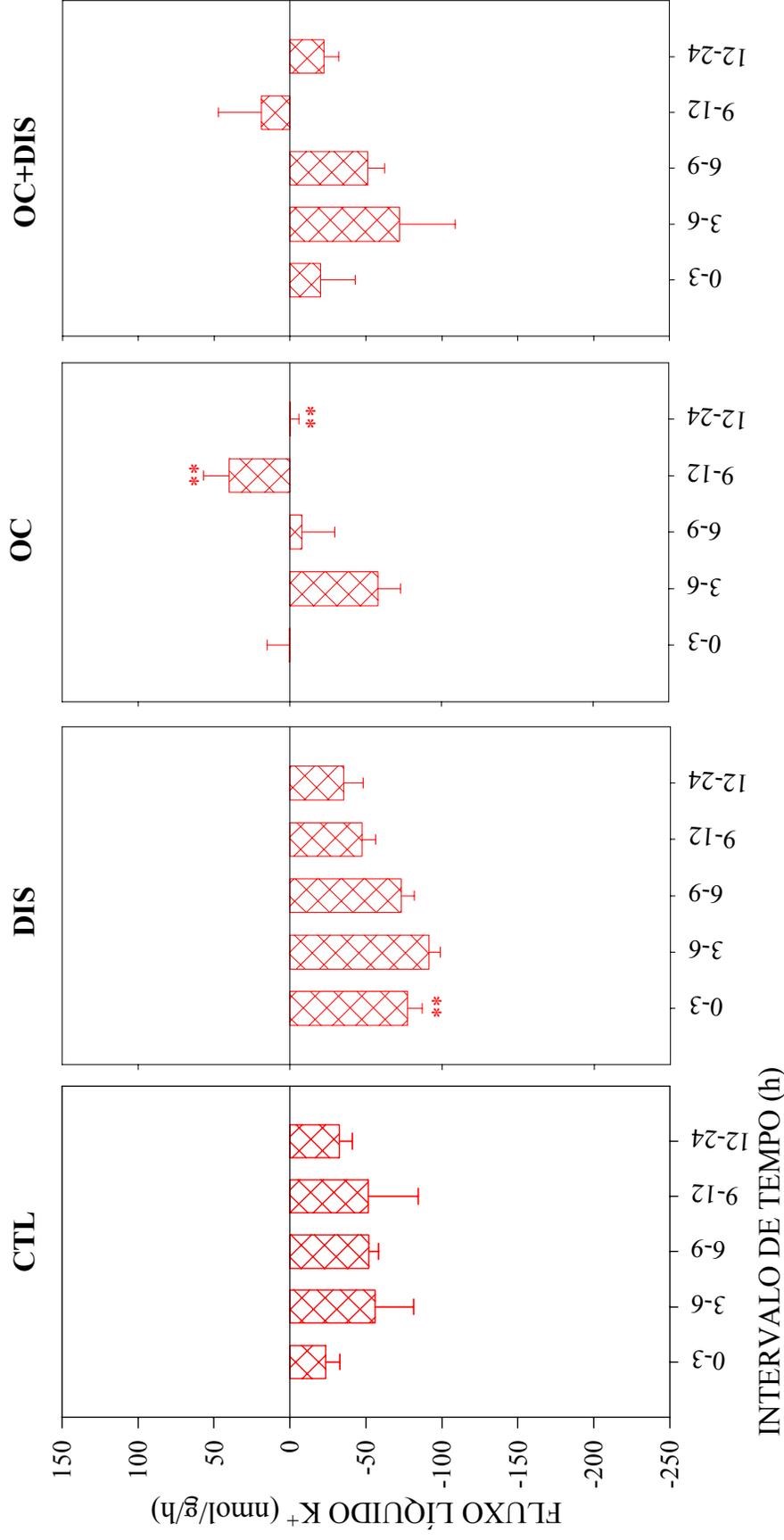


Figura 4. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre o fluxo líquido de K⁺ em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% Vol. Água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média ± SEM. (*) representa diferença significativa no fluxo líquido em relação ao grupo CTL no mesmo tempo experimental (p<0,05). (**) indica diferença significativa no fluxo líquido (J_{net}) em relação ao grupo CTL, no mesmo período experimental (p<0,01).

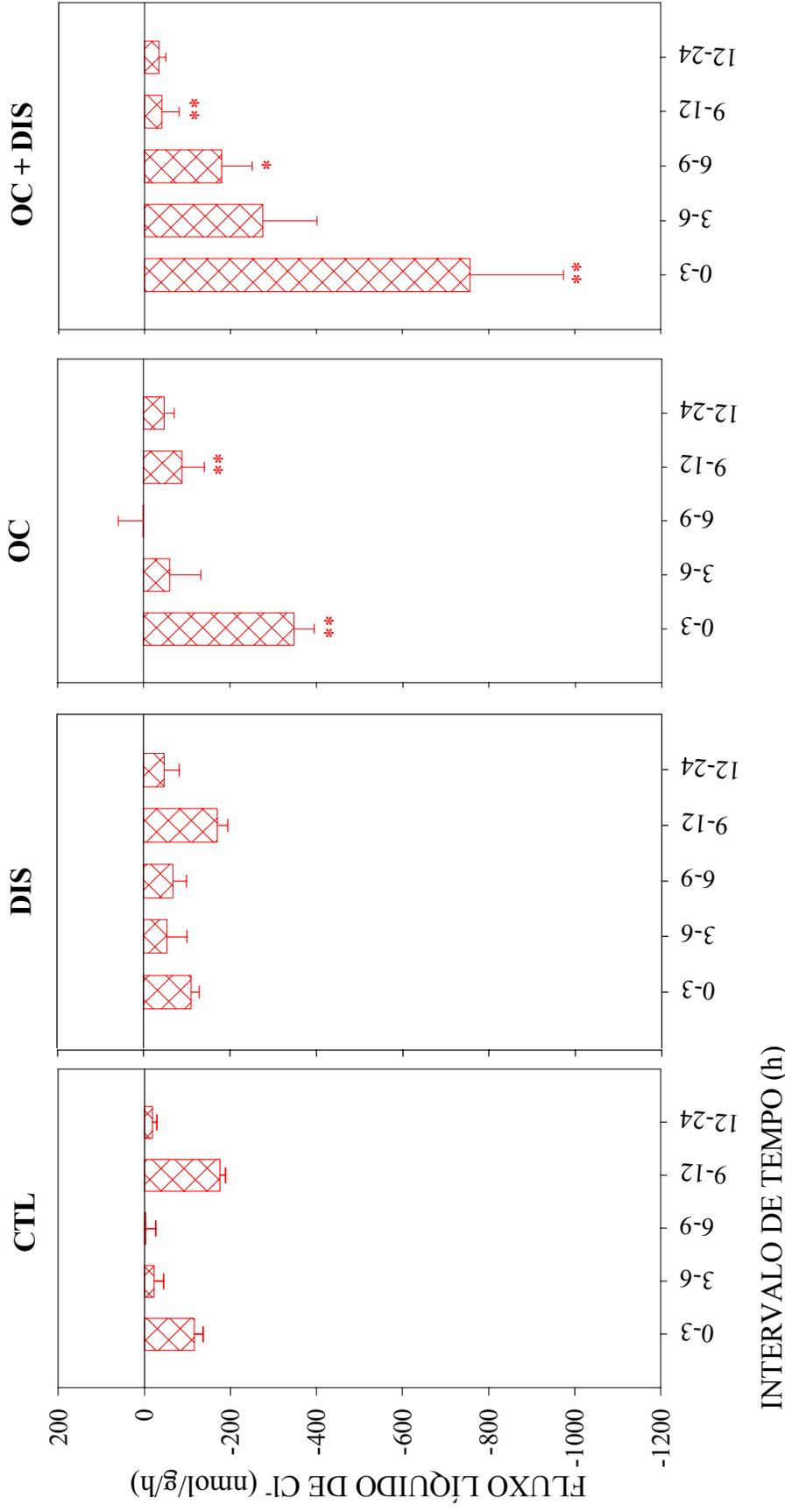


Figura 5. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre o fluxo líquido de CTL em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% Vol. Água; DIS – 1:1000 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média \pm SEM. (*) representa diferença significativa no fluxo líquido em relação ao grupo CTL no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). (**) indica diferença significativa no fluxo líquido (J_{net}) em relação ao grupo CTL, no mesmo período experimental ($p < 0,01$).

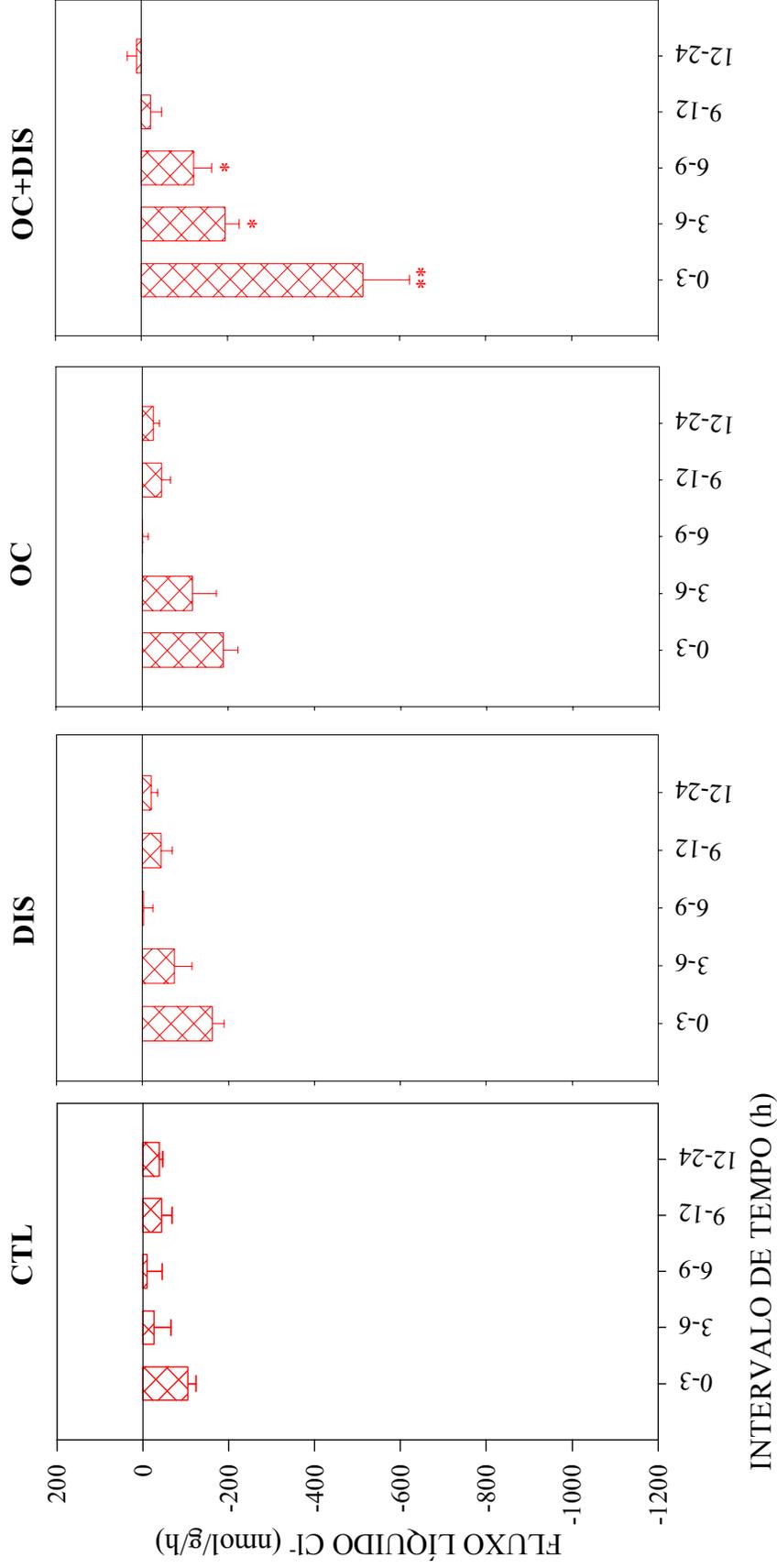


Figura 6. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre o fluxo líquido de CT em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% Vol. Água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média \pm SEM. (*) representa diferença significativa no fluxo líquido (J_{net}) em relação ao grupo CTL no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). (**) indica diferença significativa no fluxo líquido (J_{net}) em relação ao grupo CTL, no mesmo período experimental ($p < 0,01$).

CONCENTRAÇÃO DE K⁺ PLASMÁTICO

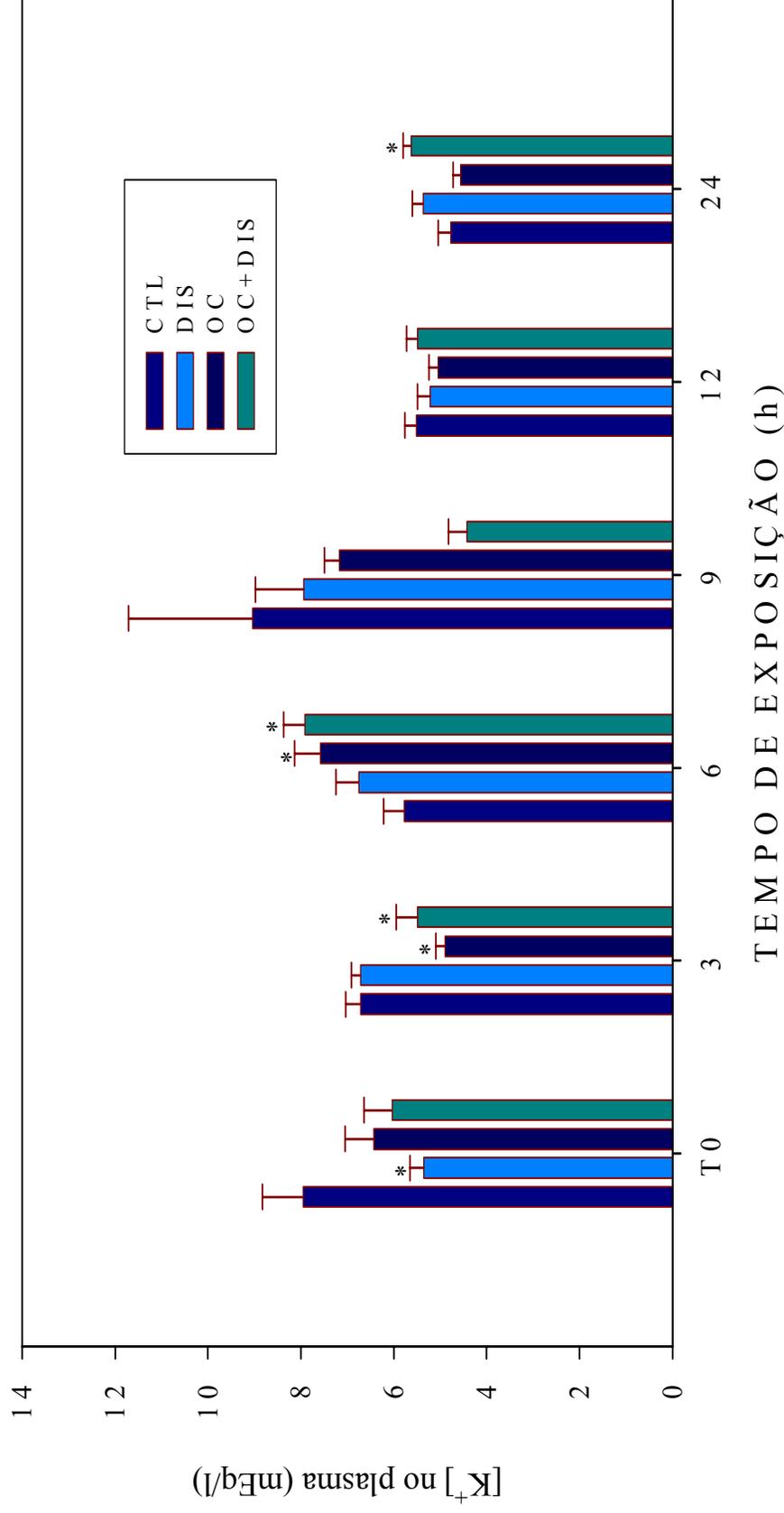


Figura 7. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre a concentração plasmática de K⁺ em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% do Vol água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média ± SEM. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo CTL, em cada tempo de exposição (p<0,05).

CONCENTRAÇÃO DE Na^+ PLASMÁTICO

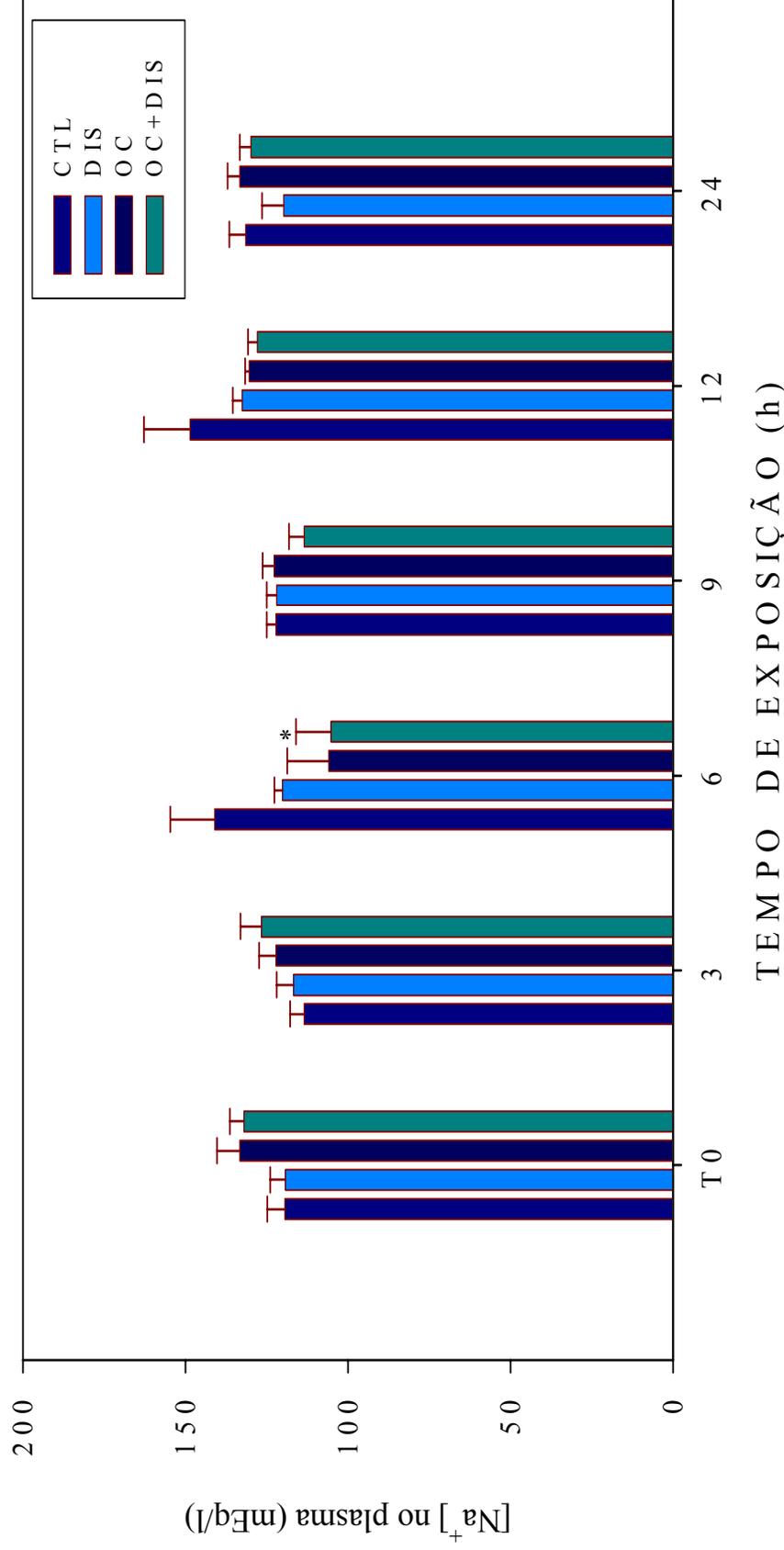


Figura 8. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre a concentração plasmática de Na^+ em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% do Vol água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média \pm SEM. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo CTL, em cada tempo de exposição ($p < 0,05$).

CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} PLASMÁTICO

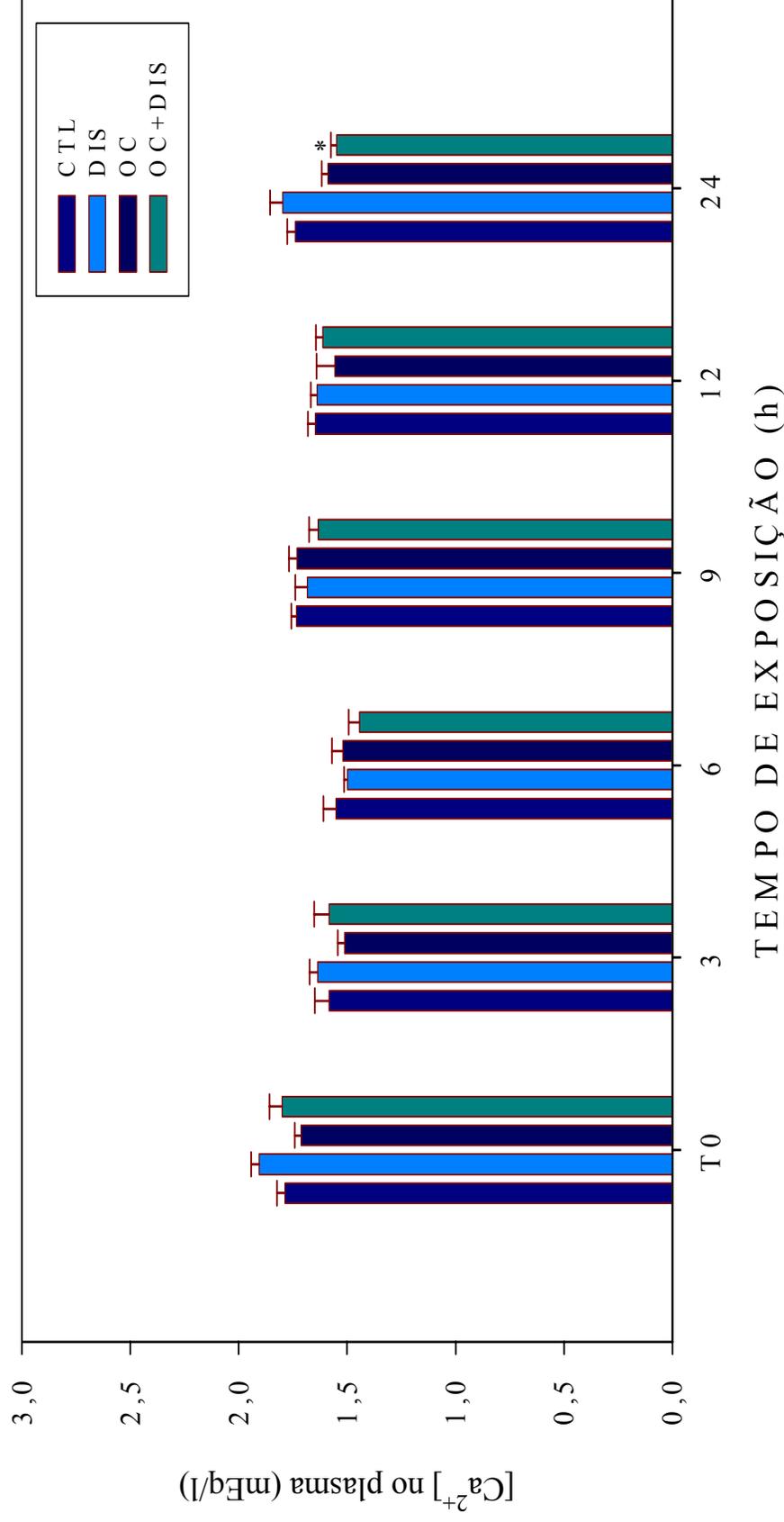


Figura 9. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre a concentração plasmática de Ca^{2+} em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% do Vol água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média \pm SEM. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo CTL, em cada tempo de exposição ($p < 0,05$).

CONCENTRAÇÃO DE Mg^{2+} PLASMÁTICO

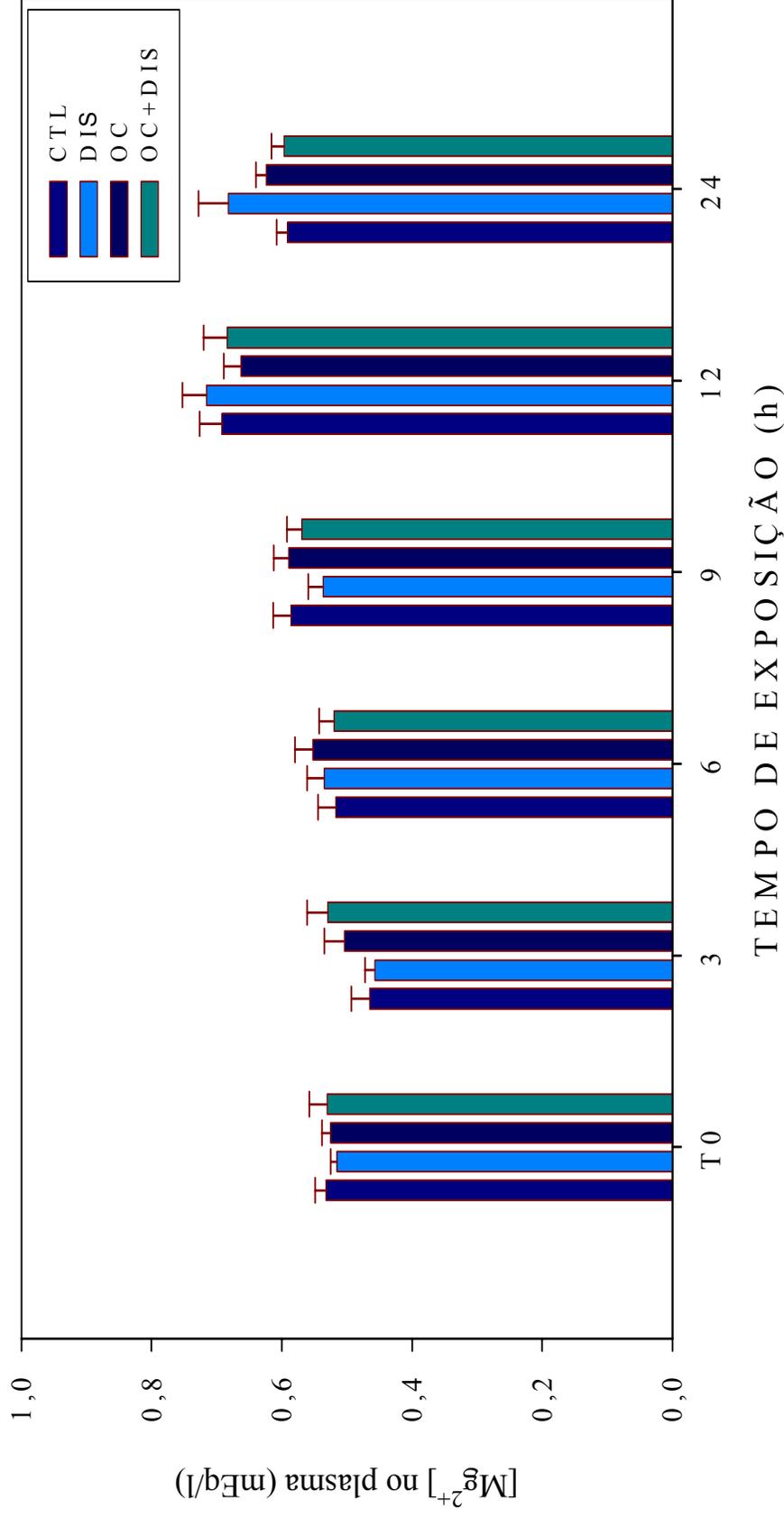


Figura 10. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre a concentração plasmática de Mg^{2+} em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% do Vol água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média \pm SEM. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo CTL, em cada tempo de exposição ($p < 0,05$).

CONCENTRAÇÃO DE CI PLASMÁTICO

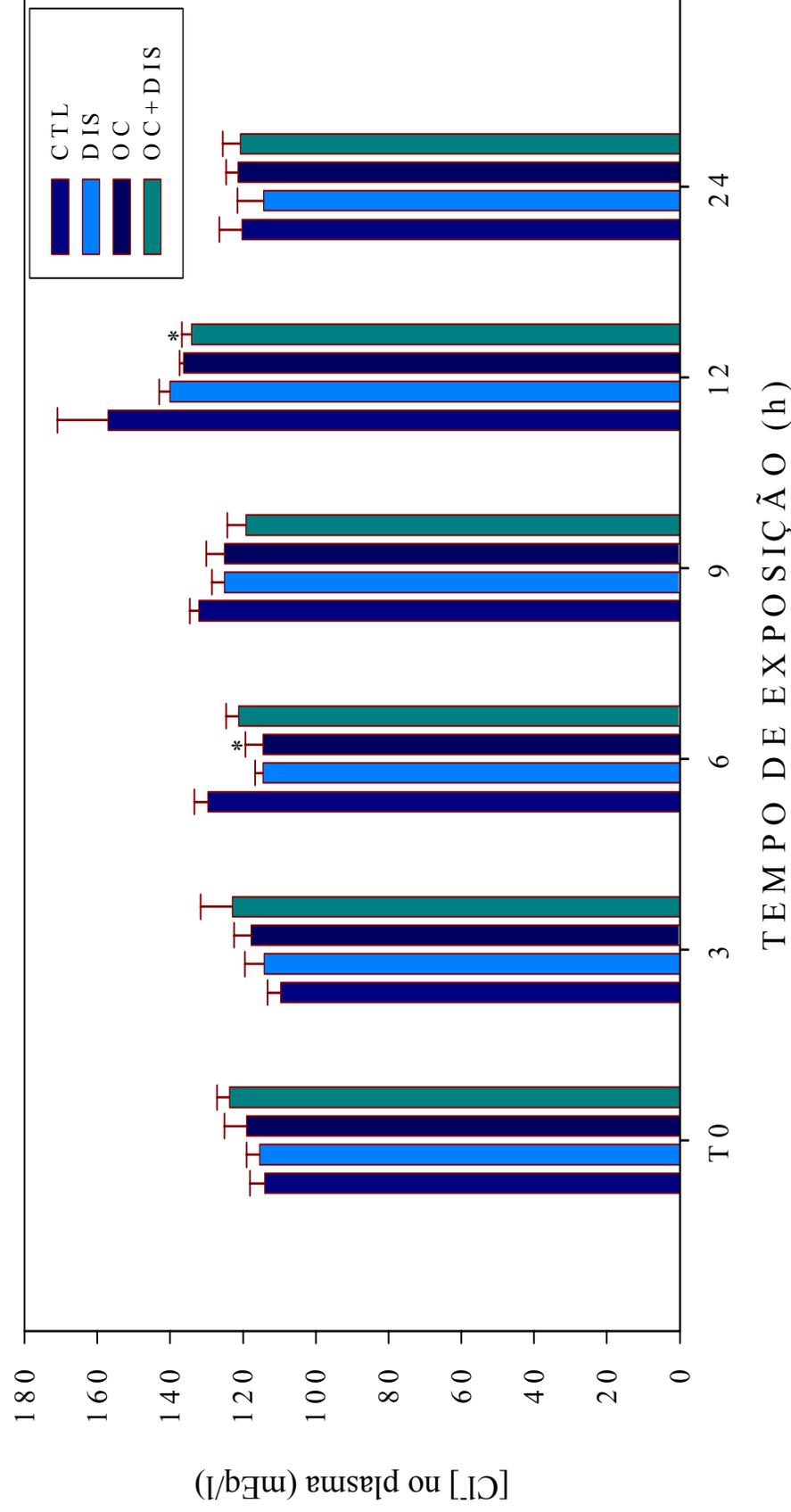


Figura 11. Efeito do dispersante Corexit 9500® (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre a concentração plasmática de CI em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% do Vol água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média ± SEM. (*) indica diferença significativa em relação grupo CTL, em cada tempo de exposição ($p < 0,05$).

HEMATÓCRITO

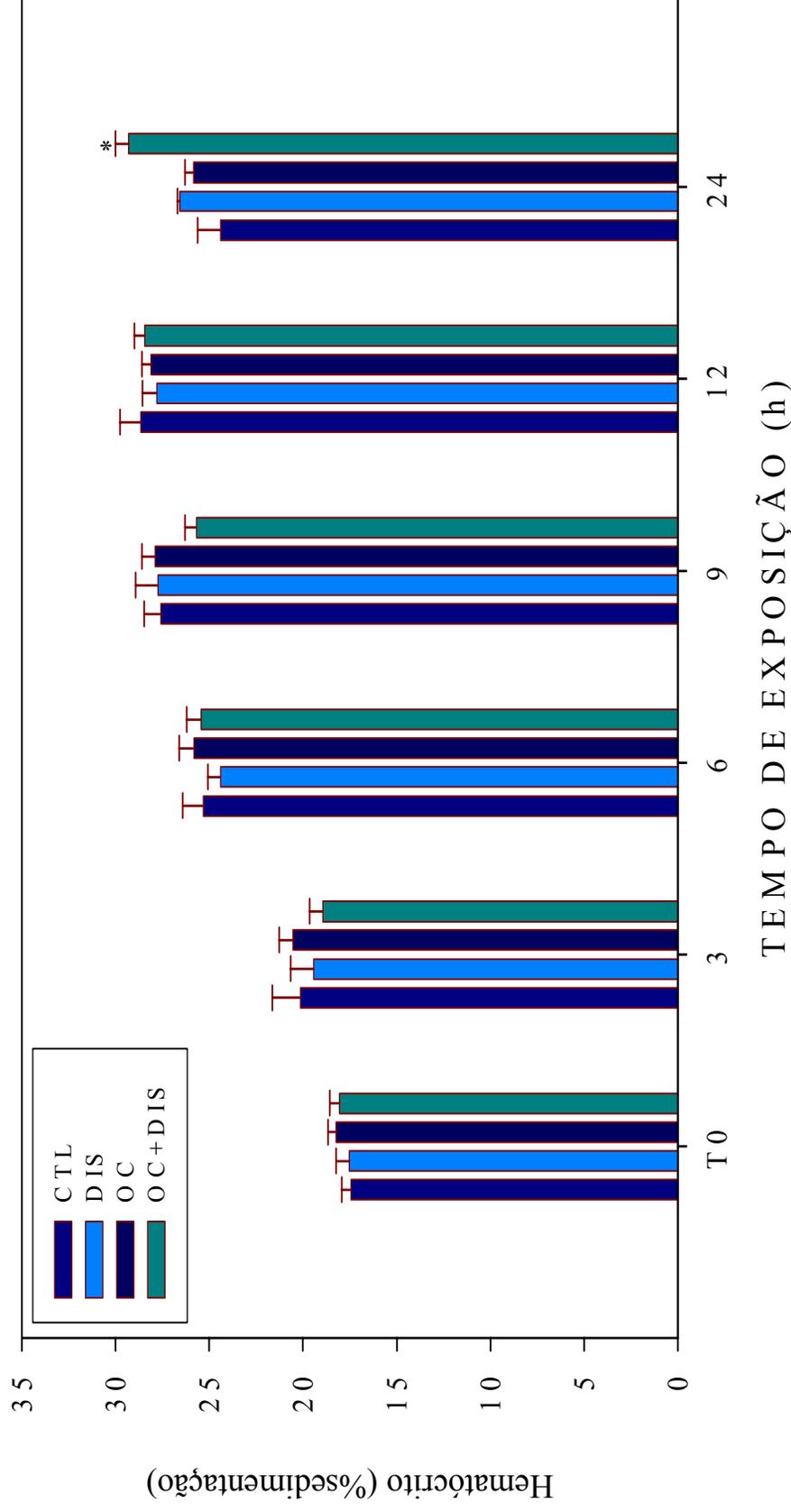


Figura 12. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre o valor do hematócrito (Ht) em juvenis de tambaqui (*C.a macropomum*). OC – 2% do Vol água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média \pm SEM. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo CTL, em cada tempo de exposição ($p < 0,05$).

CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA

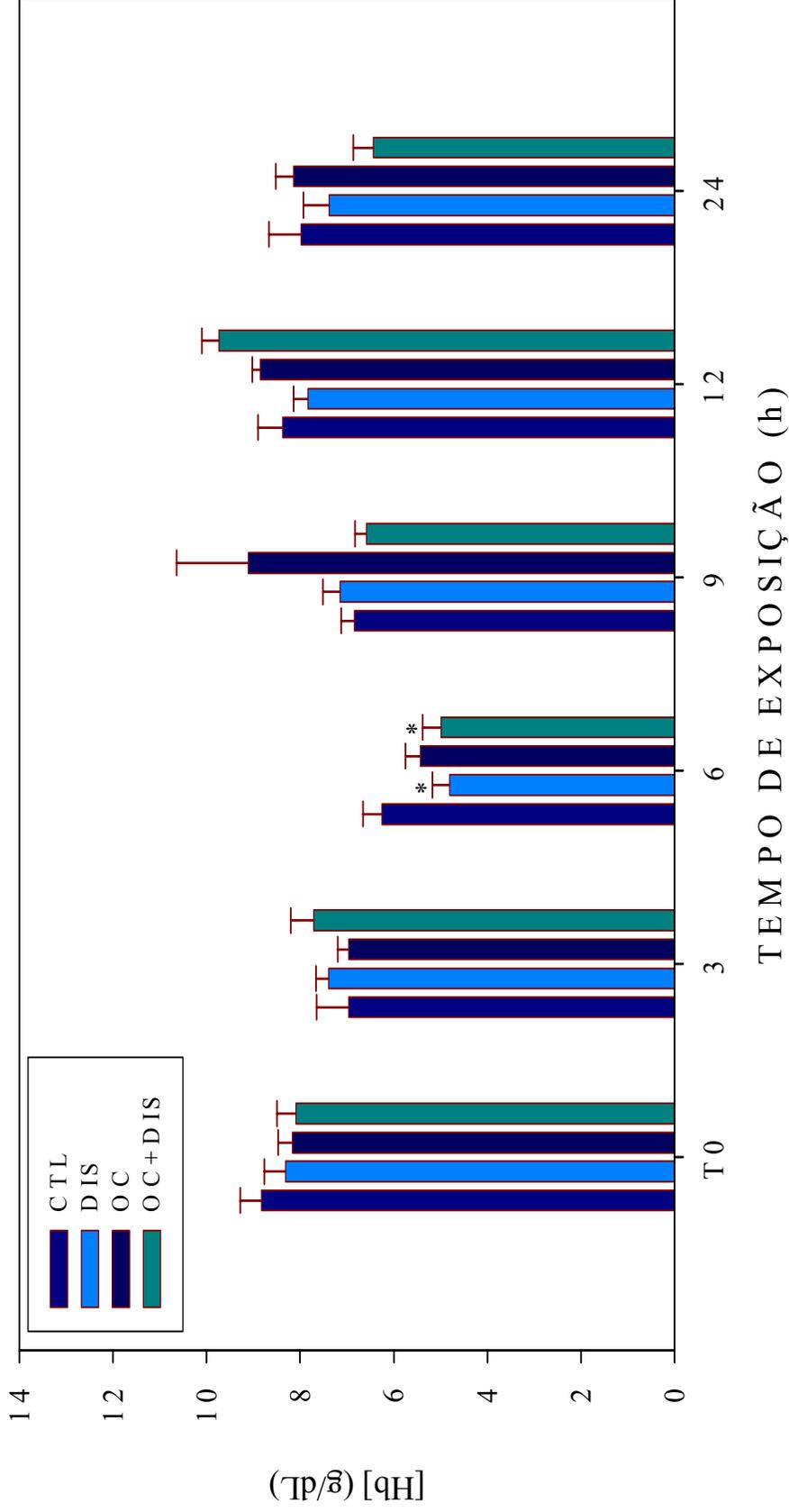


Figura 13. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre a concentração de hemoglobina ([Hb]) em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% do Vol água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média \pm SEM. (*) indica diferença significativa em relação grupo CTL, em cada tempo de exposição ($p < 0,05$).

CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SANGÜÍNEA

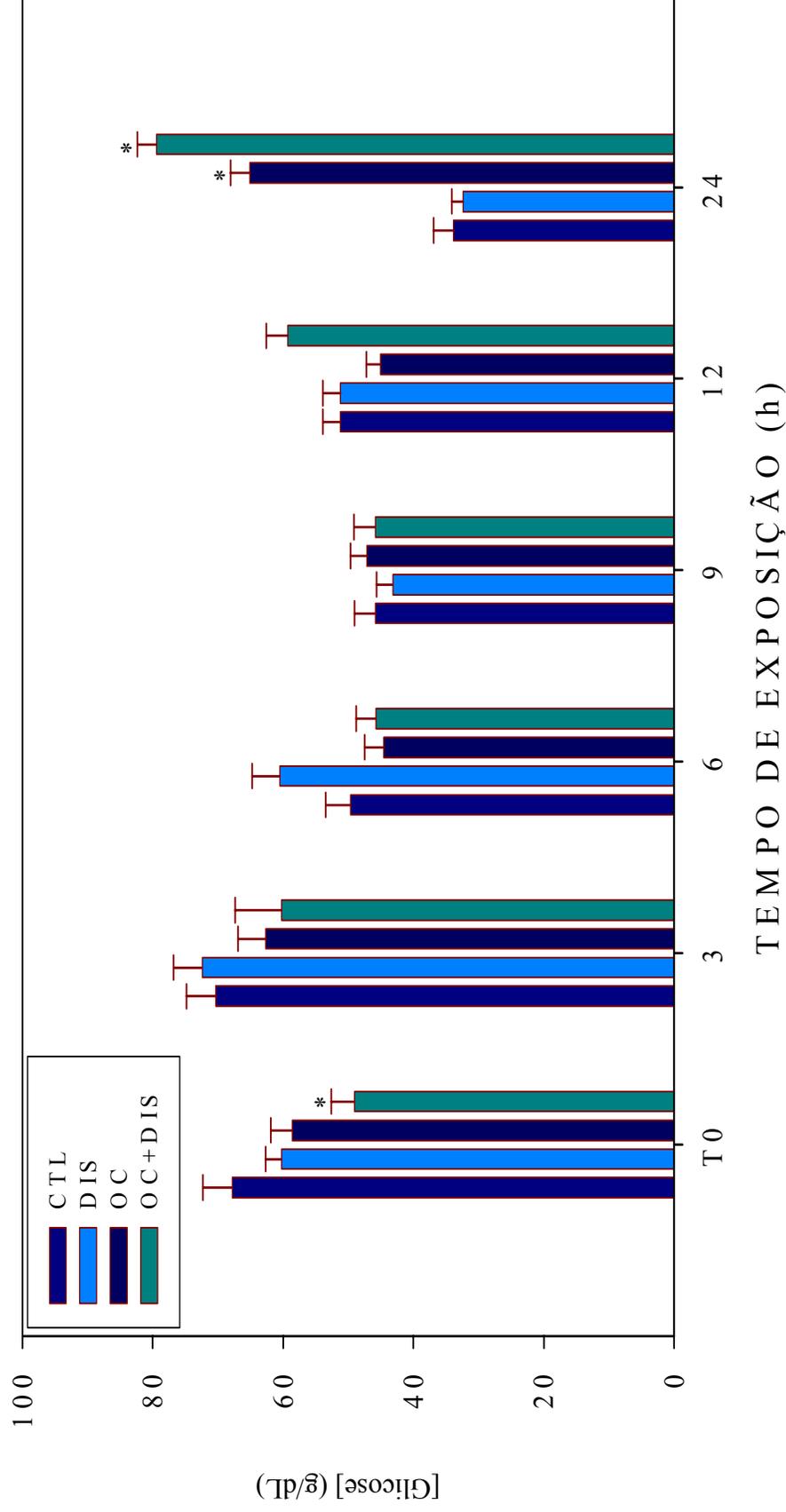


Figura 14. Efeito do dispersante Corexit 9500[®] (DIS), do óleo cru (OC) e da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre a concentração sanguínea de glicose em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). OC – 2% do Vol água; DIS – 1:1200 (dispersante: óleo cru). Resultados expressos em Média ± SEM. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo CTL, em cada tempo de exposição ($p < 0,05$).

4. Discussão

4.1. Fluxo unidirecional de Na⁺

As alterações no equilíbrio iônico apresentadas pelos peixes quando expostos a situações extremas de pH (Wilkie & Wood, 1994; Portela *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1999), temperatura (Baldisserotto & Val, 2002), hipercapnia ambiental (Goss *et al.*, 1998), salinidade (Morgan & Iwama, 1998), ou em função da exposição, aguda ou crônica, a contaminantes ambientais, como os metais Al (Keinanen *et al.*, 1998), Zn, Cd, Cu (Wood, 1992; Mazon *et al.*, 1999; McGeer *et al.*, 2000; Grossel *et al.*, 2004) e Cr (Van der Putte & Van Eijk, 1982), desinfetantes (Powell & Perry, 1998), pesticidas (Sancho *et al.*, 1997) e petróleo (Engelhardt *et al.*, 1981; Alkindi *et al.*, 1996; Brauner *et al.*, 1999; Matsuo, 2004) são resultantes de perturbações no funcionamento do epitélio branquial, causando modificações nos processos de regulação iônica principalmente em função de alterações nas taxas de transporte paracelular (efluxo difusivo/ J_{out}) e transcelular (influxo/ J_{in}).

O aumento do efluxo difusivo (J_{out}) de Na⁺ observado nos animais submetidos a situações estressantes ocorre principalmente por meio de modificações na permeabilidade da membrana branquial, associadas ao deslocamento dos íons Ca²⁺ das junções paracelulares (McDonald, 1983), causando alterações na integridade do epitélio. No entanto, substâncias orgânicas, como o petróleo, parecem não competir pelos sítios de Ca²⁺ na membrana branquial (Matsuo, 2004), apresentando, provavelmente, efeito tóxico direto sobre a permeabilidade da membrana estimulando perdas líquidas dos principais íons plasmáticos.

A dispersão química do óleo cru (OC+DIS) demonstrou um marcado efeito sobre a permeabilidade das membranas branquiais, nas duas concentrações testadas (1:1000 e 1:1200), representada por elevadas perdas difusivas (J_{out}) de Na^+ , particularmente, durante o período de 0-3 horas de exposição (Figs. 1 e 2). Esse aumento da permeabilidade da membrana branquial parece estar relacionado à ação do óleo sobre a integridade do epitélio branquial, uma vez que os dispersantes atuam sobre os hidrocarbonetos presentes na camada de óleo aumentando a sua concentração na coluna d'água. Ramachandran *et al.* (2004), estudando o uso de dispersantes no tratamento a contaminação por petróleo, observaram o aumento da exposição de peixes a PAHs, principalmente o naftaleno, verificado pela indução da atividade da enzima CYP1A. Esta enzima compõe o sistema mediador das reações metabólicas (Citocromo P-450) responsáveis pela biotransformação de compostos xenobióticos no organismo (Azevedo & Lima, 2003). Apesar das elevadas perdas difusivas encontradas no tambaqui nas duas proporções de dispersante testadas, os animais apresentaram após seis horas de exposição ao tratamento OC+DIS, a capacidade de reduzir a permeabilidade da membrana branquial, fazendo com que as perdas difusivas retornassem para níveis próximos àqueles observado para os tambaquis do grupo controle.

Já o efeito da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre o transporte transcelular (J_{in}) de Na^+ apresentou respostas distintas, dependendo da concentração de dispersante utilizada nos testes. A maior concentração de dispersante (1:1000), estimulou o influxo de Na^+ em aproximadamente 200% no período entre 3-6 horas de exposição ao tratamento, enquanto na concentração de 1:1200, o tratamento OC+DIS provocou inibição do influxo de Na^+ nos exemplares tambaqui (~25%) em relação ao grupo

controle. Entretanto, os exemplares de tambaqui expostos aos demais tratamentos (CTL, DIS e OC) também apresentaram altas taxas de J_{in} de Na^+ nas primeiras 3 horas de exposição, com progressiva redução ao longo das 24 horas de exposição, provavelmente, indicando a não aclimatação dos animais às condições experimentais. Contudo, inibições significativas nas taxas de influxo de Na^+ têm sido documentadas para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) durante exposição a pH ácido (4,8) por mais de 80 dias, ao Zn (0,8 mg/L) durante 48 horas de exposição, e ao Cu^{2+} em água leve e com baixa alcalinidade (Wood, 1992). Enguias (*Anguilla anguilla*) expostas ao pesticida Fenitrothion também tem apresentado inibição da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, sugerindo perturbações na regulação iônica e na tomada de sais do meio ambiente (Sancho *et al.*, 1997)

Elevações significativas nas taxas de influxo foram documentadas por Matsuo (2004) ao expor o tambaqui a diferentes frações de óleo cru da Província de Urucu (1,4 a 11,2% do volume de água). Altas taxas de influxo de Na^+ fazem parte do mecanismo adaptativo do peixe amazônico cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*) e de outros caracídeos (*Paracheirodon innesi* e *Gymnocorymbus ternetzi*) que vivem em águas ácidas, extremamente diluídas e com baixa concentração de Ca^{2+} (Gonzalez & Wilson, 2001). As elevadas taxas de influxo, mesmo em situações estressantes, são possíveis graças à manutenção da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, que sustenta um papel central nos mecanismos de osmorregulação nos animais, fornecendo a energia necessária para gerar o potencial eletroquímico que proporciona o movimento de Na^+ e K^+ através das membranas celulares, participando também do movimento transepitelial de cátions na brânquia (Baldisserotto, 2002; Kirschner, 2004). Dessa forma, o principal mecanismo de

resistência à toxicidade dos xenobióticos (particularmente aos metais, pH ácido, e a diferentes frações do petróleo) no tabaqui parece estar relacionado à insensibilidade do transporte transcelular de íons (sobretudo de Na^+) a estes agentes estressores, verificado por elevações nas taxas de influxo dos animais expostos a essas situações.

Os efeitos pronunciados da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre a dinâmica de transporte ($J_{\text{out}}/J_{\text{in}}$) de Na^+ refletiram no balanço osmorregulatório final dos animais, sendo observadas perdas líquidas (J_{net}) deste cátion nas duas proporções de dispersante testadas (1:1000 e 1:1200). No entanto, o tabaqui foi hábil em reduzir a permeabilidade da membrana branquial que, em conjunto com as taxas de influxo, contribuíram para restabelecer o equilíbrio iônico de Na^+ dos animais. A análise quantitativa (J_{net}) dos efeitos do OC+DIS sobre o fluxo de Na^+ evidencia o efeito da dispersão química sobre a toxicidade do óleo cru, particularmente durante as primeiras horas de exposição, com perdas líquidas maiores ($p < 0,05$ – teste de Tukey) do que as apresentadas pelo tratamento OC nos períodos de 0-3hs na proporção de 1:1200 e de 3-6hs na proporção de 1:100, e no tratamento DIS no período de 0-3hs na proporção de 1:1200 e nas primeiras 6 horas de exposição à proporção de 1:100.

Estudos sobre o movimento dos agentes químicos nos organismos (toxicocinética), e da ação destes agentes nos órgãos-alvos (toxicodinâmica) têm demonstrado que numa mistura de xenobióticos podem ocorrer modificações nos efeitos deletérios ao organismo devido a prováveis interferências no modo de ação dos agentes químicos, sendo que diversos xenobióticos são reconhecidos por promoverem um efeito tóxico sinérgico, ou seja, o efeito deletério final da mistura é maior que a soma dos efeitos deletérios individuais dos xenobióticos (Paoliello & Silva, 2003).

4.2 Fluxos líquidos de K^+ e Cl^-

Assim como para o fluxo de Na^+ , o balanço ionoregulatório dos íons K^+ e Cl^- dos animais submetidos a situações estressantes está fortemente relacionado com a ação do agente estressante sobre a integridade do epitélio branquial (Wilkie & Wood, 1994; Portela *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1999; Mazon *et al.*, 1999; Matsuo & Val, 2002), particularmente pelo deslocamento dos íons Ca^{2+} das junções paracelulares, diminuindo assim a permeabilidade da membrana branquial (McDonald, 1983).

As perdas líquidas de K^+ apresentadas pelo tambaqui no experimento com a menor concentração de dispersante (1:1200) foram observadas apenas para os animais submetidos aos tratamentos DIS e OC nas primeiras três horas e entre os períodos de 9-12 e 12-24 horas de exposição, respectivamente. As perdas líquidas de K^+ evidenciaram um efeito distinto em função do tratamento aplicado, sendo que o DIS estimulou as perdas líquidas, enquanto o OC estimulou os ganhos (9-12h) e reduziu as perdas (12-24h) de K^+ pelos animais. Dispersantes, ou surfactantes, são reconhecidos pelo marcado efeito biológico sobre membranas lipoproteicas (Abel, 1974; Mittal & Garg, 1994; Rosety-Rodriguez *et al.*, 2002; Cserháti *et al.*, 2002) alterando a sua permeabilidade. O aumento das perdas de K^+ nos animais expostos ao DIS deve-se, provavelmente, aos danos do dispersante Corexit 9500[®] sobre as células da membrana branquial, liberando o conteúdo citoplasmático celular para o meio externo.

No experimento com a maior concentração de dispersante (1:1000) os efeitos da dispersão química do óleo cru (OC+DIS) sobre o fluxo de K^+ foram mais pronunciados com perdas líquidas contínuas, significativamente maiores do que as perdas encontradas nos animais do grupo controle (Fig. 3). As perdas líquidas dos animais submetidos ao

OC+DIS também foram maiores que as J_{net} encontradas para os tratamentos DIS e OC, particularmente nos períodos de 3- 6 e 12-24 hs de exposição ($p < 0,05$ – teste de Tukey). Perdas líquidas de K^+ da magnitude das encontradas no tambaqui quando expostos ao OC+DIS (-186,47 nmol/g/h / 6-9 horas experimento) foram reportadas para exemplares da espécie *Corydoras adolfoi* quando expostos ao pH ácido (pH 3.5) por seis horas (Matsuo & Val, 2002). No entanto, exemplares de tambaqui expostos à mesma condição (pH 3,5) apresentaram perdas líquidas bem mais modestas e apenas durante a primeira hora de exposição (Wilson *et al.*, 1999), demonstrando a resistência que o tambaqui apresenta a alterações na permeabilidade da membrana branquial.

Apesar do estreito limiar de concentrações onde é evidente a toxicidade da mistura OC+DIS sobre os processos de troca de K^+ , a dispersão química do óleo cru parece afetar a integridade das membranas branquiais, desequilibrando o balanço osmótico de K^+ por meio de distúrbios nos processos de transporte transcelular e paracelular, verificado pela falta de habilidade dos animais em retornar a uma situação de equilíbrio osmótico após 24 horas de exposição ao OC+DIS (1:1000).

O transporte do ânion Cl^- através das brânquias ocorre na membrana basolateral das células ricas em mitocôndrias (ou células de cloreto / CC), encontradas na base dos filamentos das brânquias (Schmidt-Nielsen, 1999; Goss *et al.*, 1998; Baldisserotto, 2002). Desse modo, a ação tóxica direta de xenobióticos sobre a integridade do epitélio branquial alterando a sua morfologia e, conseqüentemente, a sua permeabilidade, pode vir a causar distúrbios no equilíbrio osmótico de Cl^- . A abundância, posição e morfologia das CC são dependentes de um controle endócrino mediado pelo cortisol, sendo que peixes tratados com este hormônio apresentaram aumento no número e na superfície de

contato das CC com o meio (Goss *et al.*, 1998; Pelis & McCormick, 2001), estimulando o transporte de Cl⁻.

De uma maneira geral, peixes submetidos a situações estressantes, como a exposição ao petróleo, apresentam um aumento na concentração de cortisol no sangue muitas vezes acompanhados de distúrbios no equilíbrio ácido-base dos animais (Engelhardt *et al.*, 1981; Alkindi *et al.*, 1996; Stephens *et al.*, 1997, Braunner *et al.*, 1999). Nos experimentos realizados, apenas na bateria com a maior concentração de dispersante (1:1000), o OC demonstrou efeito sobre a permeabilidade da membrana branquial, verificado pelo aumento das perdas líquidas (J_{net}) de Cl⁻ durante as primeiras três horas (-348,72 nmol/g/h), e redução das perdas durante o período de 9-12 e de 12-24 horas exposição (-88,59 e -46,69 nmol/g/h, respectivamente), sendo que a dispersão química do óleo cru (OC+DIS) também apresentou esse padrão de alterações, só que com perdas e reduções mais pronunciadas (-756,07 e -40,36 nmol/g/h, durante 0-3 e 9-12 h, respectivamente), mas não estaticamente diferentes ($p > 0,05$ – teste de Tukey).

No entanto, somente o tratamento OC+DIS provocou perdas líquidas significativas (J_{net}), em relação ao grupo controle, no tambaqui nas duas concentrações testadas de dispersante (1:1000 e 1:1200). Contudo, na concentração de 1:1200 o tratamento OC+DIS apresentou diferenças nas perdas líquidas (J_{net}) de Cl⁻ ($p < 0,05$ – teste de Tukey), em relação aos tratamentos DIS e OC, nos períodos de 0-3 e 6-9 horas de exposição, enquanto que na maior concentração de dispersante testada (1:1000) não foram observadas diferenças entre as perdas líquidas (J_{net}) de Cl⁻ entre os tratamentos experimentais (DIS, OC e OC+DIS) ($p > 0,05$ – teste de Tukey).

Perdas líquidas de Cl^- tão severas como as observadas nos tambaquis expostos ao OC+DIS nas duas concentrações testadas (1:1000 e 1:1200) foram reportadas para a espécie amazônica *Hoplosternum littorale* exposta a pH 3,5 por uma hora, sendo que os indivíduos desta espécie não suportaram e pereceram no decorrer do experimento. Situações extremas de pH alteram os processos ionoregulatórios por meio de distúrbios no transporte paracelular (J_{in}) e transcelular (J_{out}), modificando o balanço iônico (J_{net}) dos animais (Wilkie & Wood, 1994; Wilson *et al.*, 1999). No entanto, o tambaqui exposto à mesma situação (pH 3,5) apresentou perdas líquidas bem mais modestas (Wilson *et al.*, 1999). Assim como para os outros íons analisados, o OC+DIS causou perdas líquidas de Cl^- maiores ($p < 0,05$ – teste de Tukey) do que as encontradas para os animais expostos ao OC e DIS, durante as 12 primeiras horas de exposição, particularmente na concentração de 1:1200, indicando o efeito sinérgico da mistura dispersante e óleo sobre a integridade e permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, sobre o equilíbrio ácido-base e homeostase iônica dos animais. No entanto, como já abordado anteriormente, o tambaqui é hábil em reduzir a permeabilidade branquial aos íons, indicada pela recuperação do equilíbrio osmótico dos animais durante as primeiras 24 horas de exposição ao OC+DIS.

4.3. Parâmetros hematológicos e íons plasmáticos

Os efeitos mais documentados da ação de contaminantes ambientais, como surfactantes e petróleo, sobre os peixes ocorrem em nível branquial com severas alterações histopatológicas e histoquímicas do epitélio respiratório (Abel, 1974; Abel, 1976; Engelhardt *et al.*, 1981; Mittal & Garg, 1994; Rosety-Rodriguez *et al.*, 2002), afetando o funcionamento do principal órgão de troca gasosa e iônica com o meio (Schmidt-Nielsen, 1999), ocasionando distúrbios respiratórios e osmoregulatórios (Heath,

1995; Val & Almeida-Val, 1999), comprometendo assim o equilíbrio ácido-base dos animais.

Surfactantes e petróleo são reconhecidos por causar alterações na composição iônica sanguínea (Engelhardt *et al.*, 1981; Heath, 1995; Alkindi *et al.*, 1996; Brauner *et al.*, 1999), com particular efeito sobre os íons monovalentes. No entanto, na série experimental para determinar o efeito à exposição aguda ao DIS, OC, e OC+DIS sobre a concentração plasmática dos principais íons no tambaqui (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), somente a concentração de K^+ apresentou respostas significativas, sendo que o OC também causou distúrbios nos níveis de Cl^- no plasma dos animais. A dispersão química do óleo cru (OC+DIS) provocou modestos distúrbios na concentração dos principais íons plasmáticos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), exceto para o Mg^{2+} que não apresentou nenhuma variação significativa.

De uma maneira geral, o OC+DIS causou a diminuição da concentração plasmática dos principais íons nos tambaquis (K^+ , Na^+ , Cl^- , e Ca^{2+} , após 3, 6, 12, e 24 horas de exposição ao tratamento, respectivamente). No entanto, as alterações não foram progressivas e os distúrbios iônicos reportados não são tão severos quanto aqueles observados nos processos de transporte iônico, corroborando o descrito por Wood (1992), que demonstrou a maior sensibilidade encontrada nas medidas de fluxo em relação às medidas feitas diretamente no plasma, uma vez que, as medidas de fluxo são capazes de detectar efeitos tóxicos de contaminantes muito antes dos animais apresentarem alterações internas na concentração iônica plasmática.

Contudo, os exemplares de tambaqui expostos ao OC e OC+DIS apresentaram um aumento na concentração de K^+ plasmático em relação ao grupo controle ($\sim 8\text{mEq/L}$)

em ambos os tratamentos, após 6 horas de exposição, sendo que o OC+DIS provocou novas elevações na concentração plasmática de K^+ ao final das 24 horas de experimento ($\sim 7\text{mEq/L}$). O aumento da concentração de K^+ plasmático nos animais expostos ao OC+DIS, provavelmente, é decorrente da ação tóxica dos hidrocarbonetos do petróleo sobre a integridade dos eritrócitos, alterando a permeabilidade e ocasionado distúrbios osmóticos nestas células. Dessa forma, alterações nos mecanismos homeostáticos dos eritrócitos podem promover hemólise, fazendo com que o K^+ intraeritrocitário seja liberado para o plasma. O efeito nocivo do OC+DIS sobre a integridade da membrana eritrocitária, foi confirmado pelo aumento do valor do hematócrito (Ht) ($\sim 30\%$ sedimentação) nos exemplares de tambaqui após 24 horas de exposição, indicando o aumento do volume dos eritrócitos e sugerindo a perda da capacidade de manutenção da homeostase destas células. Exemplares de linguado (*Pleuronectes flesus* L.) expostos a 50% da fração solúvel do petróleo (WSF) por três horas também apresentaram aumento na concentração de K^+ plasmático e do Ht (Alkindi *et al.*, 1996).

A concentração plasmática dos íons Na^+ e Cl^- é bastante elevada nos peixes (cerca de 140 e 120 mEq/L, respectivamente; Evans, 1993) em relação a concentração destes íons dissolvidos na água doce, particularmente nas águas extremamente ácidas e ionicamente pobres encontradas na região amazônica (Furch *et al.*, 1982). A exposição de exemplares de tambaqui a baixo pH (3,0) tende a reduzir os níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- . No entanto, o tambaqui apresenta mecanismos para suportar a acidificação gradual até níveis tão baixos de pH quanto pH 3,5 (Wood *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1999).

Peixes expostos ao petróleo têm apresentado reduções nas concentrações de Na^+ e Cl^- plasmático, assim como diversas alterações na morfologia e histoquímica do epitélio

branquial (Engelhardt *et al.*, 1981). O OC+DIS não provocou marcado efeito sobre a concentração de Na^+ e Cl^- no plasma do tambaqui. Entretanto, as reduções encontradas (após 6 e 12 horas de exposição, respectivamente) provavelmente resultam dos distúrbios nos processos de regulação iônica, decorrentes de alterações na permeabilidade da membrana, particularmente durante as primeiras 6 horas de exposição. Distúrbios na concentração iônica plasmática, particularmente de Na^+ e Cl^- , resultantes das primeiras respostas do organismo ao estresse, geralmente são mediados pelo aumento da concentração de adrenalina no sangue, que determina o aumento da pressão sangüínea, aumentando a perfusão e o influxo de água nas brânquias, levando ao efluxo difusivo (J_{out}) dos eletrólitos através da membrana branquial (McDonald & Milligan, 1997). Desse modo, fica evidente que os distúrbios no nível branquial nos processos de troca entre o animal e o meio podem vir a modificar a concentração plasmática, principalmente, dos íons monovalentes.

Nos cátions divalentes, somente a concentração plasmática de Ca^{2+} apresentou reduções ($p < 0,05$) quando os animais foram expostos ao tratamento OC+DIS, enquanto o Mg^{2+} não sofreu alterações significativas em relação ao grupo controle. Como as concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} no plasma são extremamente reduzidas, quando comparada aos demais íons analisados (~ 2 e 1 mEq/L, respectivamente) (Evans, 1993) e, sendo estes íons extremamente importantes nos processos bioquímicos dos animais (Stryer, 1996) alterações na concentração plasmática destes íons não eram esperadas, mesmo face ao rigoroso impacto da mistura OC+DIS sobre a permeabilidade da membrana braquial.

A análise de alguns parâmetros hematológicos ligados ao transporte de O_2 sugere um moderado efeito da dispersão química do óleo cru sobre a concentração de

hemoglobina ([Hb]) e o hematócrito (Ht), sendo observados aumento do Ht após 24 horas, e reduções na [Hb] após 6 horas de exposição. Interessante notar que DIS também provocou a redução dos níveis de hemoglobina no tambaqui após seis horas, comprovando o marcado efeito biológico dessas substâncias que possuem a capacidade de se ligar a proteínas, peptídeos, DNA e a membranas fosfolipídicas (para detalhes ver Cserhádi *et al.*, 2002).

O efeito do óleo cru da província de Urucu sobre parâmetros sanguíneos e respiratórios tem sido previamente documentado para algumas espécies de peixes Amazônicos (Mendes & Val, 1996; Oliveira *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1996; Val, 1997; Val & Almeida-Val, 1999), sendo documentados ajustes fisiológicos com a finalidade de maximizar o transporte de O₂ para os tecidos. Exemplares de tambaqui expostos a uma camada de óleo de 0,08 mm não apresentaram alterações no Ht e na [Hb]. Entretanto, os níveis de Na⁺ e glicose plasmática estiveram elevados após 24 e 72 horas de exposição (Costa *et al.*, 1996). Por outro, os valores de Ht e [Hb] foram reduzidos em exemplares de tambaqui e tamoatá (*Hoplosternum littorale*) expostos a uma lamina de óleo de 2,56 mm (Oliveira *et al.*, 1996).

Os ajustes fisiológicos encontrados nos peixes expostos ao petróleo são característicos de animais submetidos à situação de hipóxia (Val, 1997), uma vez que a presença de óleo na interface ar-água reduz as taxas de fotossíntese e de troca de gases entre o ar e a água, diminuindo assim a concentração de O₂ dissolvido na coluna d'água. Contudo, a utilização de dispersantes no caso de derrames retira o óleo da camada mais superior da coluna d'água, aumentando a concentração e a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos do petróleo (Wolfe *et al.*, 2001; Ramachandran *et al.*, 2004). Dessa

forma, as alterações observadas no Ht e na [Hb] nos exemplares de tambaqui expostos ao OC+DIS são, provável e unicamente, decorrentes da maior toxicidade dos hidrocarbonetos quando estes são dispersos quimicamente.

A utilização da concentração de glicose sanguínea como indicador fisiológico de estresse em peixes tem sido bem documentada (Morgan & Iwama, 1997; Vijayan *et al.*, 1997), sendo que a glicose é empregada como substrato para obtenção de energia na maioria dos vertebrados, podendo ser consumida pelo metabolismo oxidativo (aeróbico) ou na ausência de O₂ (anaeróbico) (Stryer, 1996). Peixes expostos ao petróleo e à dispersão química do petróleo apresentam alterações no metabolismo de carboidratos, apresentando distúrbios na capacidade aeróbica de tecidos como as brânquias, fígado e músculo branco, evidenciado por alterações na atividade de enzimas do metabolismo oxidativo, tais como a citrato sintase (CS) e a citocromo C oxidase (CCO), e do metabolismo aeróbico, como a lactato desidrogenase (LDH) (Gagnon & Holdway, 1999; Cohen *et al.*, 2001).

Nos exemplares de tambaqui, a dispersão química do óleo cru (OC+DIS) provocou efeitos distintos sobre a concentração de glicose sanguínea ao longo da exposição. Os níveis de glicose sofreram redução após rápida exposição ao tratamento (T0), indicando a utilização das reservas energéticas do animal, na forma de glicose disponível no sangue, para a manutenção das atividades vitais do animal frente ao efeito dos xenobióticos sobre a integridade e permeabilidade da membrana branquial, levando a acentuadas perdas líquidas dos principais íons plasmáticos (Na⁺, K⁺, Cl⁻). Dessa forma, se uma fração da energia armazenada pelo animal para a manutenção de suas atividades vitais for utilizada para enfrentar uma situação de estresse, como a exposição a

xenobióticos, é esperado que menos energia estará disponível para outros processos bioquímicos, metabólicos e fisiológicos do organismo (Barton, 1997), como os mecanismos de transporte através da membrana branquial.

Somente após 24 horas de exposição os níveis de glicose dos animais submetidos ao OC+DIS apresentaram valores significativamente mais elevados que o grupo CTL, sendo que os animais expostos ao OC também apresentaram aumento da concentração de glicose ao final do experimento. O aumento da concentração de glicose ao final das 24 horas de exposição ao OC e OC+DIS sugere uma mobilização de carboidratos para restabelecer o balanço energético, utilizando suas reservas hepáticas armazenadas na forma de glicogênio (Vijayan *et al.*, 1994; Vijayan & Iwama, 1997), face à demanda por energia imposta, provavelmente, pelos marcados distúrbios ionoregulatórios decorrentes da exposição aos hidrocarbonetos do petróleo.

5. Conclusões

- A dispersão química do óleo cru provocou alterações, dependentes da concentração de dispersante Corexit 9500[®] utilizada, no mecanismo de transporte transcelular de Na^+ (J_{in}) através da membrana nos exemplares de tambaqui.
- A permeabilidade da membrana branquial parece ser afetada pela dispersão química do óleo cru, verificado pelo acentuado efeito sobre o efluxo difusivo de Na^+ (J_{out}), com implicações sobre as perdas líquidas (J_{net}) de Na^+ nos exemplares de tambaqui.
- A maior concentração de dispersante Corexit 9500[®] (1:1000) utilizada nos testes da dispersão química do óleo cru causou distúrbios acentuados sobre o fluxo líquido (J_{net}) dos íons K^+ e Cl^- , evidenciado pela falta de habilidade dos animais em restabelecer o equilíbrio osmótico após 24 horas de experimento (particularmente para o K^+).
- O tambaqui apresenta enorme capacidade de regular a permeabilidade branquial aos íons frente ao estresse provocado pelo OC+DIS, confirmado pelas reduções nas perdas líquidas (J_{net}) dos três íons analisados (Na^+ , K^+ , Cl^-).
- O efeito da dispersão química do óleo cru sobre os parâmetros sanguíneos analisados (respiratórios e iônicos) não foi tão marcante como aqueles observados sobre o transporte de íons através da membrana branquial.

6. Referências bibliográficas

Abel, P.D., 1974. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *Journal of Fish Biology* 6: 279-298.

Abel, P.D., 1976. Toxic action of several lethal concentration of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). *Journal of Fish Biology* 9: 441-446.

Ab'Sáber, A.N., 2004. *Amazônia – do discurso à práxis*. EdUSP, São Paulo, SP, 319 p.

Alkindi, A.Y.A., Brown, J.A., Waring, C.P., Collins, J.E., 1996. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. *Journal of Fish Biology* 49: 1291-1305.

Azevedo, F.A., Lima, I.V., 2003. Toxicocinética. In: Azevedo, F.A., Chasin, A.A.M (eds.). *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia*. InterTox, São Paulo, SP, pp. 27-91.

Baird, C., 2002. *Química Ambiental*. Bookman, Porto Alegre, RS, Brasil, 622p.

Baldisserotto, B., 2002. *Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura*. Ed. UFSM, Santa Maria, RS, Brasil, 212p.

Baldisserotto, B., Val, A.L., 2002. Ion fluxes of *Meynis hypsauchen* a teleost from the Rio Negro, Amazon, exposed to an increase of temperature. *Brazilian Journal of Biology* 62: 749-752.

Barton, B.A., 1997. Stress in finfish: past, present and future - a historical perspective. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Society of Experimental Biology, Inglaterra, pp. 1-34.

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* C 123: 127-134.

Castelões, L., 2003. Bacia sedimentar do Amazonas é a terceira em produção de petróleo. *ComCiência*. (<http://www.comciencia.br/reportagens/petróleo>)

Cetesb, 2005. Vazamento de óleo. *Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental*. (<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergência/acidentes/vazamento>)

Cohen, A.M., Nuggeoda, D., 2000. Toxicity of three oil spill remediation techniques to the Australian bass *Maquaria novemaculeata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47: 178-185.

Cohen, A., Nuggeoda, D., Gagnon, M.M., 2001. Metabolic responses of fish following exposure to two different oil spill remediation techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48: 306-310.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2000. Resolução nº 269 – 14 de setembro de 2000. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasília, DF.

Costa, O.T.F., Pedreça, E.B., Val, A.L., 1996. Efeito do petróleo sobre o consumo de oxigênio tissular e níveis de eletrólitos plasmáticos de *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalmidæ). *Revista da Universidade do Amazonas* 1: 85-95.

Cserhádi, T., Forgács, E., Oros, G., 2002. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International* 28: 337-348.

Daborn, K., Cozzi, R.R.F., Marshall, W.S., 2001. Dynamics of pavement cell – chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology* 204: 1889-1899.

Delvigne, G.A.L., 2002. Physical appearance of oil in oil-contaminated sediment. *Spill Science & Technology Bulletin* 8: 55-63.

Douglas, G.S., Owens, E.H., Hardenstine, J., Prince, R.C., 2002. The OSSA II pipeline oil spill: the character and weathering of spilled oil. *Spill Science & Technology Bulletin* 7: 135-148.

Engelhardt, F.R., Wong, M.P., Duey, M.E., 1981. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water, as affected by petroleum exposure. *Aquatic Toxicology* 1: 175-186.

Evans, D.H., 1993. Osmotic and ionic regulation. In: Evans, D.H. (ed), *The physiology of fishes*. CRC Press Inc, Boca Raton, pp. 315-342.

Fittkau, E.J., 1964. Remarks on the Limnology of Central Amazon Rain-Forest Streams. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, pp. 1092-1096.

Freedman, B., 1989. *Environmental Ecology. The Impacts of Pollution and Stressors on Ecosystem Structure and Function*. Academic Press, San Diego, CA.

Furch, K.; Junk, W. J.; Klinge, H., 1982. Unusual chemistry of natural waters from the Amazon region. *Acta Cientifica Venezolana* 33: 269-273.

Gagnon, M.M., Holdway, D.A., 1999. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbon. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 92-99.

George-Ares, A., Clark, J.R., 2000. Aquatic toxicity of two Corexit[®] dispersants. *Chemosphere* 40: 897-906.

Gonzalez, R.J., Dalton, V.M., Patrick, M.L., 1997. Ion regulation in ion-poor, acidic water by the blackskirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*), a fish native to the Amazon River. *Physiological Zoology* 70: 428-435.

Gonzalez, R.J., Prest, M., 1999. Mechanisms for exceptional tolerance of ion-poor, acidic waters in the neon tetra (*Paracheirodon innesi*). *Physiological and Biochemical Zoology* 72: 156-163.

Gonzalez, R.J., Wilson, R.W., 2001. Patterns of ion regulation in acidophilic fish native to the ion-poor, acidic Rio Negro. *Journal of Fish Biology* 58: 1680-1690.

Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 119: 107-115.

Grossel, M., McDonald, M.D., Wood, C.M., Walsh, P.J., 2004. Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toad (*Opsanus beta*) I. Hydromineral balance and plasma nitrogenous waste products. *Aquatic toxicology* 68: 249-262.

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

Heisler, N., 1993. Acid-base regulation. In: Evans, D.H. (ed), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, pp. 343-378.

Johansson, S.U., Larsson, U., Boehm, P.D., 1980. The tsesis oil spill impact on the pelagic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin* 11: 284-293. In: Payne, J.R., Clayton Jr, J.R., Kirstein, B.E., 2003. Oil/suspended particulate material interactions and sedimentation. *Spill Science & Technology Bulletin* 8: 201-221.

Kampen, E.J., Zilstra, W.G., 1964. Standardization of hemoglobinometry: II. The hemoglobincyanide method. *Clinica Chimica Acta* 6: 538-544

Keinanen, M., Peuranen, S., Tigerstedt, C., Vuorinen, P., 1998. Ion regulation in whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) yolk-sac fry exposed to low pH and aluminum and moderate ionic strength. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40: 166-172.

Khelifa, A., Stoffyn-Egli, P., Hill, P.S., Lee, K., 2002. Characteristics of oil droplets stabilized by mineral particles: effects of oil type and temperature. *Spill Science & Technology Bulletin* 8: 19-30.

Kingston, P.F., 2002. Long-term environment impact of oil spills. *Spill Science & Technology Bulletin* 7: 53-61.

Kirschner, L.B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *The Journal of Experimental Biology* 207: 1439-1452.

Lewis, M.A., 1992. The effects of mixture and others environmental modifying factors on the toxicities of surfactants to freshwater and marine life. *Water Research* 26: 1013-1023.

Lin, H., Randall, D.J., 1993. H⁺-ATPase activity in crude homogenate of fish gill tissue: inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. *Journal of Experimental Biology* 180: 163-174.

Lockhart, W.L., Duncan, D.A., Billeck, B.N., Danell, R.A., Ryan, M.J., 1996. Chronic toxicity of the water-soluble fraction of Norman Wells crude oil to juvenile fish. *Spill Science & Technology Bulletin* 3: 259-262.

Mastroi, R., 1997. Toxicidade e biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar. Dissertação de Mestrado, Instituto Oceanográfico, Universidade São Paulo, São Paulo, SP. 111p.

Matsuo, A.Y.O., Val, A.L., 2002. Low pH and calcium effects on net Na⁺ and K⁺ fluxes in two catfish species from the Amazon River (*Corydoras*: Callichthyidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35: 361-367.

Matsuo, A.Y.O., 2004. Aspectos ecofisiológicos e ecotoxicológicos em espécies da ictiofauna do Rio Negro, Amazônia, com ênfase na regulação iônica. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 204 p.

Mazon, A.F., Cerqueira, C.C.C., Monteiro, E.A.S., Fernandes, M.N., 1999. Acute copper exposure in freshwater fish: morphological and physiological effects. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. (eds.), *Biology of Tropical Fishes*, Editora do INPA, Manaus, pp. 263-275.

McDonald, D.G., 1983. The effects of H⁺ upon the gills of freshwater fish. *Canadian Journal of Zoology* 61: 691-673.

McDonald, D.G., Milligan, L., 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Society of Experimental Biology, Inglaterra, pp. 119-144.

McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology* 50: 231-243.

Meniconi, M.F.G., Gabardo, I.T., Carneiro, M.E.R., Barbanti, S.M., Silva, G.C., Massone, C.G., 2002. Brazilian oil spills chemical characterization-Case studies. *Environmental Forensics* 3: 303-321.

Mendes, F.A., Val, A.L., 1996. Efeito do petróleo sobre aspectos respiratórios de *Lipossarcus pardalis* (Siluriformes). Resumos da V Jornada de Iniciação Científica do Estado do Amazonas, p. 125.

Mittal, A.K., Garg, T.K., 1994. Effects of an anionic detergent – sodium dodecyl sulphate exposure on the club cells in the epidermis of *Clarias batrachus*. *Journal of Fish Biology* 44: 857-875.

Morgan, J.D., Iwama, G.K., 1997. Measurements of stressed states in the field. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Screck, C.B. (eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Society of Experimental Biology, Grã-Bretanha, pp. 247-268.

Morgan, J.D., Iwama, G.K., 1998. Salinity effects on oxygen consumption, gill Na⁺,K⁺-ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon. *Journal of Fish Biology* 53: 1110-1119.

National Research Council, 1989. *Using oil spill dispersants on the sea*. National Academy Press, Washington, D.C. Apud: George-Ares, A., Clark, J.R., 2000. Aquatic toxicity of two Corexit[®] dispersants. *Chemosphere* 40: 897-906.

Nikinmaa, M., 1990. *Vertebrate Red Blood Cells*. Springer-Verlag, Berlim, 262 p.

Neff, J.M., 1979. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. Applied Science Publishers, London, 262 p.

Oliveira, M.I.S., Val, A.L., 1996. Efeito do petróleo sobre a série branca e série vermelha do sangue do tambaqui (*Colossoma macropomum*) acari-bodó (*Lipossarcus pardalis*) e tamoatá (*Hoplosternum littorale*). Resumos da V Jornada de Iniciação Científica do Estado do Amazonas, p.129.

Pace, C.B., Clark, J.R., Bragin, G.E., 1995. *Comparing crude oil toxicity under standart and environment realistic exposure*. Proceedings of the 1995 International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington, D.C. Apud: George-Ares, A., Clark, J.R., 2000. Aquatic toxicity of two Corexit® dispersants. *Chemosphere* 40: 897-906.

Paine, R.T., Ruessink, J.L., Sun, A., Soulanille, E.L., Wonham, M.J., Harley, C.D.G., Brumbaugh, D.R., Secord, D.L., 1996. Trouble on oiled waters: Lessons from *Exxon Valdez* oil spill. *Annual Review Ecological System* 27: 197-235.

Paoliello, M.M.B., Silva, E.S., 2003. Toxicodinâmica. In: Azevedo, F.A., Chasin, A.A.M (eds.). *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. InterTox, São Paulo, SP, pp. 93-114.

Pavanelli, G.C., Eiras, J.C., Takemoto, R.M., 1998. *Doenças em Peixes. Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*. Ed. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil, 264 p.

Payne, J.R., Calyton Jr, J.R., Kirstein, B.E., 2003. Oil/suspended particulate material interactions and sedimentation. *Spill Science and Technology Bulletin* 8: 2001.221.

Pelis, R.M., McCormick, S.D., 2001. Effects of growth hormone and cortisol on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic Salmon. *General and Comparative Endocrinology* 124: 134-143.

Pollino, C.A., Holdway, D.A., 2002. Toxicity testing of crude oil related compounds using early stages of the crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52: 180-189.

Pontes, L.A., Val, A.L. 1996. Efeito do petróleo em peixes da Amazônia: intoxicação hepática em *Hoplosternum littorale* (tamoatá), *Lipossarcus pardalis* (bodó) e *Colossoma*

macropomum (tambaqui). Resumos da V Jornada de Iniciação Científica do Estado do Amazonas, p. 128.

Portela, J.M., Aride, P.H.R., Val, A.L., 1997. Effects of water pH and calcium on ion fluxes of tambaqui (*Colossoma macropomum*). International Symposium Biology of Tropical Fishes, p. 190.

Powell, M.D., Perry, S.F., 1999. Acid-base and ionic fluxes in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) during exposure to chloramine-T. *Aquatic Toxicology* 43: 13-24.

Prince, R.C., Garret, R.M., Bare, R.E., Grosman, M.J., Townsend, T., Suflita, J.M., Lee, K., Owns, E.H., Sergy, G.A., Braddock, J.F., Lindstrom, J.E., Lessard, R.R., 2003. The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils. *Spill Science & Technology Bulletin* 8: 145-156.

Ramachandran, S.D., Hodson, P.V., Khan, C.W., Lee, K., 2004. Oil dispersante increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 300-308.

Rosety-Rodriguez, M., Ordoñez, F.J., Rosety, M., Rosety, J.M., Rosety, I., Ribelles, A., Carrasco, C., 2002. Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus L.*, induced by sodium dodecyl sulfate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 223-228.

Sancho, E., Ferrando, E., Andreu, E., 1997. Inhibition of gill Na⁺,K⁺-ATPase activity in the eel, *Anguilla anguilla*, by fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38: 132-136.

Sauer, T.C., Boehm, P.D., 1995. *Hydrocarbon chemistry analytical methods for oil spill assessments*. Marine Spill Response Corporation, Washington, D.C., MSRC Technical Report Series 95-032, 114p.

Schmidt-Nielsen, K. 1999. *Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente*. Editora Livaria Santos, São Paulo, SP, 600p.

Singer, M.M., George, S., Jacobson, S., Lee, I., Weetman, L.L., Tjeerdema, R.S., Sowby, M.L., 1995. Acute toxicity of the oil dispersant Corexit 9554 to marine organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32: 81-86.

Stephens, S.M., Alkindi, A.Y.A., Waring, C.P., Brown, J.A., 1997. Corticosteroid and thyroid responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Journal of Fish Biology* 50: 953-964.

Stryer, L., 1996. *Bioquímica*. Ed. Guanabara Koogan, RJ, 1000p.

Val, A.L., 1996. Surviving low oxygen levels: Lessons from fishes of the Amazon. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., & Randall, D.J. (eds.), *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. Editora do INPA, Manaus, pp. 59-74.

Val, A.L., 1997. Efeito do petróleo sobre a respiração de peixes da Amazônia. In: . *Indicadores Ambientais*. .pp. 109-119.

Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 1995. Fishes of the Amazon and their environments. *Physiological and Biochemical Features*. Springer Verlag, Heidelberg.

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., Almeida-Val, V.M.F. (eds.), *Biology of Tropical Fishes*, Editora do INPA, Manaus, pp. 277-291.

Van der Putte, H.B.H.M.L., Van Eijk, G.J.M., 1982. Respiration and osmoregulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to hexavalent chromium at different pH values. *Aquatic Toxicology* 2: 99-112.

Vijayan, M.M., Reddy, P.K., Leatherland, J.F., Moon, T.W., 1994. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. *General and Comparative Endocrinology* 96: 75-84.

Vijayan, M.M., Iwama, G.K., 1997. Metabolic adjustments to stress in a tropical fish, the tilapia. *International Symposium Biology of Tropical Fishes*, p. 82.

Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., Iwama, G.K., 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology* 116: 89-95.

Wiese, A.M., Nalewajko, C., Lee, K., 1999. Oil-mineral fine interactions facilitate oil biodegradation in sea water. *Environmental Technology* 20: 811-824.

Wilkie, M.P., Wood, C.M., 1994. The effects of extremely alkaline water (pH 9,5) on rainbow trout gill function and morphology. *Journal of Fish Biology* 45: 87-98.

Wilson, R.D., Wood, C.M., Gonzalez, R.J., Patrick, M.L., Bergman, H.L., Narahara, A., Val, A.L., 1999. *Physiological and Biochemical Zoology* 72: 277-285.

Wood, C.M., 1992. Flux measurements as indices of H⁺ and metal effects on freshwater fish. *Aquatic Toxicology* 22: 239-264.

Wood, C.M., Wilson, R.D., Gonzalez, R.J., Patrick, M.L., Bergman, H.L., Narahara, A., Val, A.L., 1998. Responses of an amazonian teleost, the Tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water. *Physiological Zoology* 71: 658-670.

Wolfe, M.F., Schwartz, G.J.B., Singaram, S., Mielbrecht, E.E., Tjeerdema, R.S., Sowby, M.L., 2001. Influence of dispersants on the bioavailability and trophic transfer of

petroleum hydrocarbon to larval topsmelt (*Atherinops affinis*). *Aquatic Toxicology* 52: 49-60.

Zall, D.M., Fisher, D., Garner, M.Q., 1956. Photometric determination of chloride in water. *Analytical Chemistry* 28: 1665-1668.

Zar, J. H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice – Hall, Inc. New Jersey, 718p.

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](#)