



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

**Impactos do fenantreno sobre o tambaqui *Colossoma
macropomum* Cuvier, 1818: CL₅₀, crescimento e
hematologia.**

CARLOS ALBERTO CHÁVEZ VEINTEMILLA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para Obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Ecologia.

**Manaus-AM
2006**



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

**Impactos do fenantreno sobre o tabaqui *Colossoma
macropomum* Cuvier, 1818: CL₅₀, crescimento e
hematologia.**

CARLOS ALBERTO CHÁVEZ VEINTEMILLA

Orientador: Dr. Adalberto Luis Val

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para Obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Ecologia.

Fontes Financiadoras: Programa Pronex/FAPEAM e CNPq.

Bolsista da Cooperação Técnica Belga (CTB) - Embaixada na República do Perú.

**Manaus-AM
2006**

A meu pequeno filho Carlos Marcelo, a meus pais Francisco Misael e Graciela Elizabeth, assim como a todos meus irmãos, por sua compreensão e apoio durante o tempo que fiquei longe deles.

FICHA CATALOGRAFICA

Chávez Veintemilla, Carlos Alberto

Impactos do fenantreno sobre o tambaqui *Colossoma macropomum*

Cuvier, 1818: CL₅₀, crescimento e hematologia/ Carlos Alberto Chávez

Veintemilla – 2006. Manaus, AM., ix + 49p: il.

Dissertação de Mestrado (INPA/UFAM)

1. Fenantreno 2. Amazônia 3. *Colossoma macropomum* 4. Petróleo 5. CL₅₀

SINOPSE

Neste trabalho foram avaliados os principais impactos do fenantreno sobre o tambaqui. Foram determinadas a concentração letal media (CL₅₀) e bio-índices (fator de condição, ganho de peso final, ganho de peso percentual, taxa de crescimento específico, eficiência alimentar, conversão alimentar e índice hepatossomático). Parâmetros hematológicos como glicose, lactato, hemoglobina, metahemoglobina, número de células vermelhas, hematócrito e constantes corpusculares também foram analisados.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Adalberto Luís Val, pela orientação, amizade e apoio em tudo momento para chegar ao bom final deste trabalho e a força para me superar muito mais.

A Dra. Adriana Chippari Gomes, pela amizade e orientação das minhas dúvidas em relação às técnicas empregadas no laboratório.

A Dra. Vera Val, pelo apoio moral e sugestões no presente trabalho.

Ao Dr. Manoel Pereira Filho, M.Sc. Augusto Leão e demais orientandos do CPAQ do INPA, pela doação de parte dos exemplares de peixes utilizados nos experimentos de crescimento e hematologia.

Ao Senador da República João Thomé Mestrinho, da Agropecuária Thirá Ltda. (Novo Airão), pela doação de parte dos exemplares de peixes utilizados nos experimentos de CL₅₀.

A Dra. Débora Oliveira Rodrigues, Dra. Antonia Gomes Neta Pinto da Área de Química Ambiental e Dr. Ezio Sargentini Jr. da Área de Fitoquímica do INPA.

A MSc. Otirlene Marinho Ribeiro pela ajuda e correção do meu português no meu plano.

A Luciano Ricardo Braga Pinheiro, Marcio Soares Ferreira, Rafael Mendonça Duarte companheiros do LEEM.

A meus amigos e compatriotas peruanos Jorge Gallardo, Daniel Villasis, Santiago Ferreyra, Tony Vizcarra, Manuel Rios, Christian Castro e Katherine López que me apoiaram e brindaram sua amizade neste período longe da minha família.

A Nazaré, Angélica e Raquel por resolverem os problemas administrativos, burocráticos, físicos e estruturais encontrados ao longo da condução deste trabalho.

A Eternal Ltda., empresa que transportou a água contaminada desde o LEEM até a Refinaria Isaac Sabbá.

Ao Sr. Paulo Gustavo da Petrobras, pela ajuda brindada em diferentes momentos para a realização deste trabalho.

A todos do LEEM/INPA pela convivência discussões, aprendizado e estímulo para seguir adiante.

Ao Governo de Bélgica (Oficina de Cooperação Técnica Belga), através da sua embaixada na República do Perú, pela bolsa de estudo durante os dois anos de mestrado no Inpa.

Ao Projeto “Peixes da Amazônia: Biomarcadores para a qualidade ambiental em cenários envolvendo aspectos sociais e econômicos. Programa PRONEX. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Amazonas/FAPEAM e Conselho Nacional de Pesquisa CNPq” pelo apoio financeiro.

A todos que direta o indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ABSTRACT

Impacts of phenanthrene on tambaqui *Colossoma macropomum*: LC₅₀, growth and hematology.

Acute and sublethal toxicities of phenanthrene were tested on freshwater fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). Trimmed Spearman-Kärber method was used to calculate the LC₅₀. Median lethal concentration (LC₅₀) was 0,94 mg/L (0,91-0,97) for 96 hours. Tambaqui was exposed to 5, 25 and 50% of CL₅₀ of phenanthrene for 4 weeks to test their effects on growth and hematological properties. Regular methods were used to calculate growth and analyze hematological parameters. The final weight gain (WG), average weight gain (WG%), specific growth rate (SGR), feed efficiency (FE), condition factor (CF) and hemoglobin (Hb) were significantly decreased in fish exposed to phenanthrene, whereas plasma glucose (Glu), lactate (Lac) and methemoglobin (MetHb) levels were increased significantly. However, hepatosomatic index (HSI), feed conversion (FC), red blood cell (RBC) count, hematocrit (Ht), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and mean corpuscular volume (MCV) levels of tambaqui were not significantly affected by phenanthrene exposure. The central finding from these data is that tambaqui exposed to phenanthrene at more than 5% of CL₅₀ are likely to experience negative impacts on fish health and basic physiological functions. Funded by Pronex Program /FAPEAM and CNPq and Belgian Embassy in Peru.

RESUMO

Impactos do fenantreno sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818: CL₅₀, crescimento e hematologia

As toxicidades aguda e crônica do fenantreno foram avaliadas para o tambaqui *Colossoma macropomum*. O método Trimmed Spearman-Kärber foi usado para calcular a concentração letal média CL₅₀ ($0,94 \pm 0,03$ mg/L) durante 96 horas. O tambaqui foi exposto a 5, 25 e 50% da CL₅₀ do fenantreno por 4 semanas para testar seus efeitos sobre o crescimento e as propriedades hematológicas. Métodos regulares foram usados para calcular os bio-índices e os parâmetros hematológicos. O ganho de peso final (WG), ganho de peso percentual (WG%), taxa de crescimento específico (SGR), eficiência alimentar (FE), fator de condição (CF) e hemoglobina foram significativamente menores nos peixes expostos ao fenantreno, entretanto, os níveis de glicose, lactato e metahemoglobina foram significativamente maiores. O índice hepatosomático (HSI), conversão alimentar (FC), número de células vermelhas (RBC), hematocrito (Ht), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e volume corpuscular médio (MCV) do tambaqui não foram significativamente afetados pela exposição ao fenantreno. O principal achado deste trabalho é que o tambaqui exposto a concentrações maiores que 5% da CL₅₀ experimenta impactos negativos sobre a saúde e suas funções fisiológicas básicas. Financiado pelo Programa Pronex/FAPEAM e CNPq e Embaixada Belga no Peru.

ÍNDICE

1.	Introdução	
1.1.	A Amazônia e o Petróleo	1
1.2.	Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs)	2
1.3.	O Fenantreno	3
1.4.	Os Bioensaios e Hematologia	3
1.5.	A Concentração Letal Média (CL ₅₀)	4
1.6.	A espécie <i>Colossoma macropomum</i>	5
1.7.	Justificativa	5
1.7.	Objetivos e Hipótese	
1.7.1.	Objetivo Geral	6
1.7.2.	Objetivos Específicos	6
1.7.3.	Hipótese	6
2.	Metodologia	
2.1.	Animais Experimentais	7
2.2.	Determinação da Concentração Letal Média (CL ₅₀)	8
2.3.	Determinação de Crescimento e Bio-índices	10
2.4.	Ensaio Hematológicos	12
2.5.	Análise Estatística	15
3.	Resultados	
3.1.	Concentração Letal Média (CL ₅₀)	
3.1.1.	Determinação do Comprimento de onda para o fenantreno	17
3.1.2.	Determinação da Curva de calibração	18
3.1.3.	Determinação da CL ₅₀	19
3.1.4.	Parâmetros Físico-Químicos	20
3.2.	Crescimento e Bio-índices	22
4.	Discussão	
4.1.	Determinação da CL ₅₀	28
4.2.	Crescimento e Hematologia	32
5.	Conclusões	37
6.	Recomendações	37
7.	Referências	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Amazônia e o Petróleo

A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo, abrangendo nove países na América do Sul. Com cerca de 6,5 milhões de quilômetros quadrados, maior do que a Europa inteira, a Amazônia contém um quinto de toda a água doce da Terra e a maior biodiversidade de plantas e animais do planeta. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004), a Amazônia brasileira ocupa aproximadamente 60% da Amazônia continental, 49,29% do território brasileiro e possui 21'056,532 milhões de habitantes. Nas últimas décadas têm sido encontradas reservas de petróleo na região Amazônica e têm sido tomadas medidas de segurança para prevenir derramamentos de petróleo. No entanto, sempre há risco de um acidente podendo afetar não só a flora e a fauna em geral, mas, também, a população humana (NJDHSS, 1999; Speer *et al.*, 2002).

Existem muitos trabalhos sobre os efeitos do petróleo e seus derivados sobre a fisiologia de microrganismos (Atlas & Cerniglia, 1995), plantas (DeLaune *et al.*, 2003; Cruz-Orea *et al.*, 2004; Wilcke *et al.*, 2004) e animais marinhos como peixes, répteis, mamíferos, equinodermos, entre outros (Ogata & Miyake, 1979; Parke, 1981; Stegeman *et al.*, 1981; Rowe *et al.*, 1983a; 1983b; McKee *et al.*, 1983; Meador *et al.*, 1995; Lotufo & Fleeger, 1996; Swartz *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1999; Hawkins *et al.*, 2002; De Solla *et al.*, 2003; Lamy-Enrici *et al.*, 2003; Bergquist *et al.*, 2004; Danis *et al.*, 2004; Giessing & Mayer, 2004; Mckinney *et al.*, 2004). Entretanto, existem poucos trabalhos realizados com peixes de água doce, que podem ser bioindicadores para o monitoramento da poluição nesse meio ambiente (Adham *et al.*, 2002; Chaty *et al.*, 2004; López-Vásquez *et al.*, 2004; Matsuo *et al.*, 2004a).

As águas de pobre qualidade ambiental podem afetar a homeostase orgânica dos peixes. Por exemplo, peixes que são expostos ao petróleo sofrem doenças no fígado e são afetados em sua reprodução e crescimento (Lafferty & Holt, 2003).

1.2. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs)

Os efeitos tóxicos do petróleo cru sobre organismos aquáticos são causados principalmente por sua fração hidrossolúvel (WSF), que contém hidrocarbonetos aromáticos como benzeno, tolueno, xileno, etc.. O petróleo cru inclui hidrocarbonetos voláteis de cadeia curta, os quais apresentam pouco tempo de permanência no meio ambiente, além de hidrocarbonetos de cadeia longa, os quais são persistentes no tempo e formam uma película na interface água – ar, observada como uma mancha oleosa, diminuindo a fotossíntese e a quantidade de oxigênio dissolvido (Val & Almeida-Val, 1999; Almeida-Val *et al.*, 2002).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos recebem este nome, aromáticos, pelo cheiro intenso que emitem. Existem centenas de compostos classificados como PAHs (Cavret & Feidt, 2005). Estes podem ter mais de dois anéis aromáticos, os quais são relativamente resistentes à biodegradação. Os PAHs podem persistir no meio ambiente por meses ou anos e são encontrados no ar, na água e no solo. São considerados cancerígenos com alto potencial de risco à saúde animal (Clemente *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2002). Os PAHs, geralmente, são menos sensíveis à foto-oxidação e, portanto, são mais persistentes na água. Porém, são rapidamente acumulados pelos organismos aquáticos, resultando em níveis elevados de concentração que afetam a fisiologia dos mesmos. Em peixes marinhos, o fígado e a bile acumulam os maiores níveis de PAHs (Meador *et al.*, 1995). Alguns PAHs, como o naftaleno, têm frações diaromáticas tanto no petróleo cru como no petróleo refinado.

Um dos primeiros órgãos dos peixes afetados por esses poluentes são as brânquias, porque elas estão em contato direto com o poluente (Engelhardt *et al.*, 1981; Sabourin, 1982;

Poirier *et al.*, 1986; Meador *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2004). Sob condições tóxicas a produção de muco, a principal defesa das brânquias dos peixes contra parasitas, é prejudicada (Lafferty & Holt, 2003).

1.3. O Fenantreno

O fenantreno é um PAH com três anéis aromáticos, com a fórmula química $C_{14}H_{10}$ e um peso molecular de 178,22 g/mol. Existe como um sólido cristalino sem cor e tem caráter hidrofóbico e lipofílico. Está comprovado que a toxicidade aumenta com o incremento do peso molecular e o caráter lipofílico do composto, e que os organismos aquáticos são os mais afetados (Antón & Lisazo, 2001). No meio aquático, estes poluentes químico-orgânicos hidrofóbicos são rapidamente associados com partículas e se tornam disponíveis para os organismos aquáticos em geral. Pode entrar no organismo por meio da dieta e ser metabolizado pelo intestino (Jahan *et al.*, 1997; Antón & Lisazo, 2001; Talley *et al.*, 2001; Jee *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004; Cavret & Feidt, 2005).

1.4. Bioensaios e Hematologia

Pesquisas fisiológicas e hematológicas têm sido ferramentas sensíveis para detectar efeitos de compostos químicos em peixes (Adham *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2004). A química do sangue tem sido ferramenta útil em testes patológicos, toxicológicos e clínicos em geral (Adham *et al.*, 2002).

Os bioensaios são testes que envolvem organismos vivos, ou métodos por meio dos quais algumas propriedades de uma substância ou material, são medidas em termos da resposta biológica que produz (Morea, 1997; Sima-Alvarez *et al.*, 2001). Mudanças em certos parâmetros bioquímicos no sangue de peixes são potencialmente úteis, porque permitem detectar danos agudos ou crônicos induzidos por poluentes. Nas últimas duas décadas, seu uso

tem crescido e muitas técnicas já foram introduzidas no estudo da toxicologia aquática (Adham *et al.*, 2002; Chaty *et al.*, 2004). Os bioensaios, atualmente são considerados os métodos mais adequados para os estudos toxicológicos (Brown *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2004; Jee *et al.*, 2004; Matsuo *et al.*, 2004a; 2004b).

1.5. A Concentração Letal Média (CL₅₀)

Para determinar a toxicidade de uma determinada substância na água na qual os organismos estão expostos, inicialmente é feito um teste de toxicidade aguda para estimar a concentração letal média (CL₅₀) ou dose letal média (DL₅₀) (Sprague, 1990; Morea, 1997). A CL₅₀ fornece informações rápidas sobre os efeitos da toxicidade de um determinado elemento, porque geralmente é um teste de curta duração o qual deve ser especificado (24, 48, 72 ou 96 horas) (Goldstein *et al.*, 1983; Morea, 1997; Oliveira, 2003).

A CL₅₀ tem sido usada de forma intensa na avaliação da qualidade da água e na medição dos possíveis impactos ambientais (Goldstein *et al.*, 1983; Sima-Álvarez *et al.*, 2001). Refere-se basicamente à determinação da concentração de uma substância que causa a mortalidade da metade dos indivíduos de uma população sob estudo, normalmente, num período de tempo de 96 h (Thurston *et al.*, 1978; 1983; Sprague, 1990; Morea, 1997).

Alguns PAHs, como o metileno e o naftaleno, são considerados perigosos pela sua toxicidade e por afetar principalmente os organismos aquáticos (Sabourin, 1982; McKee *et al.*, 1983; Schwartz *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2004). Sabendo que o fenantreno possui maior peso molecular que os compostos retro mencionados, é preciso estudar seus efeitos sobre os peixes já que a toxicidade aumenta com o aumento do peso molecular (Antón & Lisazo, 2001).

1.5. A Espécie *Colossoma macropomum*

Na Amazônia brasileira existem cerca de 3000 espécies de peixes de água doce. Entretanto, apenas três espécies (o tambaqui, o matrinxã, e o jaraqui) representam mais de 70% de toda a produção de pescado desembarcado no Estado do Amazonas (INPA, 2004). O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Ordem Characiformes, Família Characidae), está amplamente distribuído nos corpos de água branca e preta da região, alcançando até 90 cm de comprimento total. Antigamente eram capturados exemplares com até 45 Kg de peso. Seu dorso é cinza-escuro, os flancos são prateados e o ventre esbranquiçado. É uma espécie de alto valor comercial e muito apreciada pela qualidade e quantidade de sua carne. Alimenta-se de larvas, camarões, insetos e frutas, sendo de fácil adaptação às condições de laboratório. Na aquicultura, é de fácil manejo (Alcántara *et al.*, 2003). Esta espécie já foi usada em bioensaios com petróleo e pode ser considerada como uma espécie útil para o monitoramento ambiental (López-Vásquez *et al.*, 2004; Matsuo *et al.*, 2004b; Val & Almeida-Val, 2004).

1.6. Justificativa

Em 1976, 16 PAHs, entre eles o fenantreno foram considerados como contaminantes prioritários pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Comunidade Econômica Européia (CEE) em função de seus efeitos carcinogênicos (Cavret & Feidt, 2005).

PAHs como o fenantreno podem resultar em contaminação da cadeia alimentar, e são bio-acumuláveis, tóxicos e potencialmente cancerígenos. Essas razões são suficientes para seu estudo (Meador *et al.*, 1995; Van Hoof *et al.*, 2001; Talley *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2002; Chaty *et al.*, 2004; Giessing & Mayer, 2004; Jee *et al.*, 2004; Matsuo *et al.*, 2004; Mckinney *et al.*, 2004; Cavret & Feidt, 2005). Considerando a importância da região amazônica e os perigos

que envolvem a produção de petróleo e seus derivados, foi importante estudar seu efeito no crescimento e fisiologia do tambaqui, já que poderia afetar os níveis populacionais desta espécie. Adicionalmente, por ser uma das principais espécies de peixes consumidas na região, poderia também, afetar o homem.

1.7. Objetivos e Hipótese

1.7.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do fenantreno sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818.

1.7.2. Objetivos Especificos

- Determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) do fenantreno para o tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818.
- Avaliar o efeito do fenantreno sobre o crescimento e a hematologia do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818.

1.7.3. Hipótese

HO: O fenantreno não reduz o crescimento e não altera a hematologia do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818.

H1: O fenantreno reduz o crescimento e altera a hematologia do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais Experimentais

Os peixes usados no experimento da CL₅₀ foram obtidos da Agropecuária Thirá Ltda, Município de Novo Airão, região central da Amazônia e tinham em média $31,88 \pm 1,97$ g de peso e $12,38 \pm 0,12$ cm de comprimento total. Os animais foram transportados ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde passaram por um tratamento profilático com sal, segundo Pavanelli e colaboradores (1998), onde foram mantidos em solução 0,3 % de NaCl por 24 h, em tanques de 500 L com aeração constante e adaptados às condições locais.

Para os experimentos de crescimento e hematologia os peixes foram obtidos da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ) do INPA e tinham em média $22,64 \pm 5,54$ g de peso e $11,10 \pm 0,87$ cm de comprimento total. Foram transportados ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), onde também passaram por um tratamento profilático similar ao anterior experimento.

No laboratório, os peixes foram aclimatados em tanques de 500 litros, durante duas semanas antes dos experimentos, usando água do poço artesiano referido como “controle (INPA)”. A água do poço artesiano apresenta concentrações iônicas baixas, semelhantes às do rio Negro, ambiente natural da espécie pesquisada, embora seja praticamente desprovida de substâncias húmicas (SH) (Tabela 1).

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (2% da biomassa por administração) com ração comercial granulada (Nutripeixe, Brasil, proteína bruta 36%, fibra 7%, extrato etéreo 4%, umidade 13%, matéria mineral 14%, cálcio 2,5% e fósforo 0,6%). A alimentação foi aproximadamente às 8h30 min. e às 16h, durante o período de aclimação e nos experimentos de crescimento. Para o experimento de CL₅₀ a alimentação dos peixes foi

suspensa 48 horas antes do início do teste e durante o mesmo. As características físico-químicas da água (pH, temperatura e oxigênio dissolvido) foram avaliadas diariamente.

Tabela 1. Características físico-químicas da água proveniente de poço artesiano referido como “controle (INPA)” nas quais os experimentos foram realizados. Os valores são expressos como média \pm SEM de cinco amostras.

Parâmetro	Controle (INPA)
Na ⁺	34,00 \pm 1,00 μ mol
Cl ⁻	28,00 \pm 1,00 μ mol
Ca ²⁺	11,50 \pm 0,90 μ mol
Mg ²⁺	0,80 \pm 0,10 μ mol
K ⁺	15,50 \pm 0,40 μ mol
pH	6,32 \pm 0,04
SH	0,99 \pm 0,19 mg C.L ⁻¹
O ₂ Dissolvido *	5,91 \pm 0,07mg.L ⁻¹
Temperatura	28,00 \pm 1,00°C

* Após aeração para remoção de CO₂

2.2. Determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀)

Os PAHs são pouco solúveis em água e, em geral, sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis. Além disso, a volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular e, conseqüentemente, PAHs de pesos moleculares mais baixos são mais voláteis (Netto *et al.*, 2000). Por tanto, foi preciso quantificar a volatilização do fenantreno no tempo, com a finalidade de se repor essa quantidade e manter constante a sua concentração durante o período experimental.

Para quantificar a fração volátil do fenantreno foi preciso saber qual era o comprimento de onda de máxima absorbância nas condições e equipamentos disponíveis no laboratório. Para isto foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu UV-240 (Shimadzu Corporation, Japan). A água utilizada na fase experimental foi do poço artesiano, referida como “controle (INPA)”, a qual foi usada como “branco” para determinar a concentração de fenantreno dissolvida nela.

Para a determinação do comprimento de onda usou-se uma faixa de 220 a 300 nm, com intervalos de 10 nm e diferentes concentrações de fenantreno na água, de 1 até 10 mg/L, para determinar se a absorbância estava relacionada com a concentração. Após ter determinado o comprimento de onda para trabalhar com o fenantreno, precisou-se determinar a quantidade do tóxico que era volatilizada. Para isto foi medida a diferença da absorbância em diferentes tempos conhecendo a concentração inicial. A curva de calibração foi feita com uma concentração de fenantreno de 1 mg/L, lida em 250 nm e durante 48 h, com intervalos de 12 horas entre cada medição da absorbância. Os dados foram tratados com uma regressão linear para se obter uma equação que permitia determinar a quantidade de fenantreno que era volatilizada no tempo (hora). Toda esta parte experimental foi realizada com ensaios em triplicata.

Antes de trabalhar com as concentrações finais de fenantreno para determinar a CL_{50} , foi preciso encontrar uma concentração na qual havia alguma sobrevivência. As concentrações iniciais de fenantreno sem encontrar sobrevivência em 96 h, foram de 10 mg/L; 5 mg/L e 2,5 mg/L. Para esta fase pré-experimental usou-se aquários de 50 litros com 10 peixes em um volume de 20 litros de água (2 litros de água por peixe), aeração constante e homogênea e reposição à concentração inicial do fenantreno a cada 12 h.

Na concentração de 1,5 mg/L observou-se uma sobrevivência de 10% em 96 h. A partir desse novo dado, foram estabelecidas as dez concentrações de fenantreno, observando o

critério de progressão geométrica, de acordo com Sprague (1990), com a razão de 0,9. Para os testes foram usados 20 peixes (2 litros de água por peixe) para cada uma das diferentes concentrações do poluente, que resultaram em mortalidades entre 0 e 100%, e só uma vez para cada concentração (Hamilton *et al.*, 1977). O fenantreno (96% pureza, Sigma Chemical Co.) foi inicialmente dissolvido em etanol (96% pureza, Merck) para obter a solução estoque inicial.

Ao final dos testes de determinação da CL_{50} toda a água foi transferida para tambores de 225 litros (50 UK galões), que, posteriormente, foram transportados pela empresa Eternal Ltda. do LEEM para a Refinaria Isaac Sabbá, para o adequado tratamento.

2.3. Determinação de Crescimento e Bio-índices

Quarenta peixes foram selecionados considerando a mínima variação em peso. Após a seleção, dois peixes foram colocados em cada um de 20 aquários de plástico com 4 litros de água do poço “controle (INPA)”, considerando-se o comportamento social que apresenta o tambaqui. Após 24 horas de aclimatação nos aquários, foi adicionada a estes, quantidade suficiente de fenantreno obtendo-se soluções com concentrações de 5%, 25% e 50 % do valor da CL_{50} que constituíram, assim, nossas soluções de trabalho. Para o controle e para cada uma das três concentrações foram utilizadas cinco repetições, durante quatro semanas.

As doses de fenantreno foram renovadas da seguinte maneira: 1) a cada 12 horas, para reposição da quantidade de fenantreno volatilizada (similar à fase de determinação da CL_{50}); 2) a cada 48 horas, para renovação de 25% (1 litro) da solução total de cada aquário. Isto foi feito com ajuda de uma bomba de vácuo manual (Peters & Russell Inc., USA), retirando todos os resíduos do fundo do aquário (produto do metabolismo dos peixes), para evitar a formação de nitrito e outros produtos resultantes da decomposição da matéria orgânica.

A quantidade de alimento administrada diariamente foi reajustada após duas semanas do início do experimento, de acordo com o incremento de peso dos peixes. O ganho de peso dos peixes foi calculado subtraindo o peso dos peixes no início do experimento do peso obtido após duas semanas de exposição. O peso final foi obtido ao final das quatro semanas de experimento.

O peso intermediário, após duas semanas, foi feito de forma indireta, pesando-se o aquário mais o peixe. Para a amostragem final, os peixes foram anestesiados com ácido 3-amino benzóico etil éster. A anestesia, medição e amostragem normalmente duraram cerca de 3 min/peixe.

O alimento consumido foi calculado por meio da subtração do alimento não consumido após 30 minutos, do total oferecido. Os grânulos não consumidos foram contados e multiplicados pelo seu peso médio seco (50 grânulos foram pesados em triplicata para obter o seu peso médio).

Foram calculados os seguintes bio-índices, de acordo com as fórmulas abaixo.

*Ganho de peso (WG) = [(peso final – peso inicial)]

*Fator de condição (CF) = [peso úmido (g)/comprimento total (cm)³] x 100

*Índice hepatossomático (HSI) = [peso do fígado (g)/peso de corpo (g)] x 100

*Ganho de peso porcentual (WG) = [(peso final – peso inicial)/peso inicial] x 100

*Crescimento Específico (SGR) = [(ln W_t - ln W_0)/t] x 100

*Conversão alimentar aparente = peso seco alimento consumido/peso úmido adquirido

*Eficiência alimentar (FE) = peso úmido adquirido/peso seco alimento consumido x 100

onde W_t e W_0 são os pesos final e inicial, respectivamente, por aquário e t é o tempo dado em dias.

2.4. Ensaio Hematológicos

Ao final da quarta semana experimental, foram feitos os ensaios hematológicos para os peixes de cada tratamento e do controle. O sangue foi tomado da veia caudal dos peixes previamente anestesiados, usando seringas heparinizadas. Os parâmetros hematológicos foram medidos utilizando técnicas já desenvolvidas pelo Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do INPA, como segue:

a) Nível de glicose: Determinado por meio do sistema enzimático colorimétrico produzido pela Doles S.A. (“kit” Glucox 500), cujo princípio consiste em adicionar o plasma em uma solução contendo tampão fosfato, aminoantipirina p-hidroxibenzoato e as enzimas glicose oxidase e peroxidase na proporção de 1:100 (v:v). A mistura foi, então, incubada em “banho-térmico” a 37 °C durante 10 minutos. Ao final deste tempo, aparece uma coloração avermelhada cuja intensidade final é diretamente proporcional à concentração de glicose existente na amostra de plasma. A absorvância, em 510 nm, foi medida em um espectrofotômetro Genesys 2 (Spectronic Instruments Inc., Korea), dentro dos primeiros 10 minutos de retirado do banho-maria. Os valores de glicose no plasma foram referenciados a partir de uma solução padrão de glicose (100 mg/100 ml) e foram expressos em mg/dl.

$$\text{Glicose (mg/dl)} = (\text{Abs. da amostra após ensaio} / \text{Abs. do padrão}) \times 100$$

onde 100 = Fator de diluição

b) Nível de lactato: Determinado pelo procedimento técnico da Sigma Chemical Co. (“kit” n°. 826 UV). Para isso, 100 µl de plasma foram adicionados em 100 µl de ácido perclórico (PCA) e posterior neutralização com KOH. O extrato neutralizado do plasma foi adicionado a uma solução contendo a enzima lactato desidrogenase (LDH, 100 UI/ml), a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), hidrazina e tampão glicina (0,6 mol/L, pH 9,2). Neste método, a enzima converte o lactato, presente no extrato de plasma, a piruvato

o qual é complexado a piruvato-hidrazina, evitando a reconversão do piruvato para lactato. A reação ocorre com redução simultânea da coenzima NAD^+ e é seguida por meio do decréscimo da absorvância em 340 nm, decréscimo este proporcional à concentração original de lactato na amostra.

Após 15 minutos, quando a reação processa-se completamente a 37 °C, os valores de lactato plasmáticos foram obtidos. As leituras foram feitas em 340 nm em um espectrofotômetro Genesys 2 (Spectronic Instruments Inc., Korea), dentro dos primeiros 10 minutos e foram expressas em mg/L plasma.

$$\text{Lactato mg/litro} = \text{Abs.}_{340} \times 72,50$$

c) Valor do hematócrito (Ht): Determinado por meio da técnica do microhematócrito. As amostras de sangue coletadas foram colocadas em tubos capilares, fechados a fogo em uma lamparina de álcool e centrifugados numa centrífuga (FANEM 211N, Brasil), a 12000 rpm, durante 10 min. A leitura da porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi feita em um cartão padronizado.

d) Concentração de hemoglobina [Hb]: Determinada pelo método da cianometahemoglobina (Kampen & Zijlstra, 1964; apud Chagas & Val, 2003), que consiste em diluir 10 μl de sangue em 2 ml da solução Drabkin (KCN 0,5g; KH_2PO_4 1,4g; $\text{K}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 2,0g em 1000 ml de água destilada). A absorvância foi determinada em 540 nm em um espectrofotômetro Genesys 2 (Spectronic Instruments Inc., Korea), após 10 minutos de repouso. A solução de Drabkin foi usada como “branco”. A concentração de Hb foi determinada pela fórmula:

Hb (g/dL)= ABS (540nm) x 0,146 x diluição da amostra

e) Taxa de metahemoglobina (MetaHb): Determinada segundo o método de Benesch *et al.* (1973). O método consiste na mistura de 25 µl de uma amostra de sangue em 1,5 ml de tampão fosfato 35 mM, pH 7,3, na proporção de 1:60 (volume sanguíneo: volume diluente). A mistura foi agitada em um agitador automático para tubos e depois centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm. As amostras foram lidas em um espectrofotômetro Genesys 2 (Spectronic Instruments Inc., Korea) em três diferentes comprimentos de onda 560, 576 e 630 nm. O branco foi o tampão fosfato. A taxa de metahemoglobina foi calculada a partir das seguintes formulas:

$$\text{OxiHb} = [(\text{Abs. } 576 \times 1,013) - (\text{Abs. } 630 \times 0,3269) - (\text{Abs. } 560 \times 0,7353)] \times 10^{-4}$$

$$\text{DeoxyHb} = [(\text{Abs. } 560 \times 1,373) - (\text{Abs. } 576 \times 0,747) - (\text{Abs. } 630 \times 0,737)] \times 10^{-4}$$

$$\text{FerriHb} = [(\text{Abs. } 630 \times 2,985) - (\text{Abs. } 576 \times 0,194) + (\text{Abs. } 560 \times 0,4023)] \times 10^{-4}$$

O valor encontrado foi corrigido relativamente à concentração total de hemoglobina; para isso, foi dividido a concentração da ferriHb pela somatória de oxi, desoxi e ferriHb, e multiplicando-se por 100. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

f) Número de células vermelhas (RBC): Determinado pela diluição do sangue em solução formol citrato (3.8 g de citrato de sódio; 2.0 ml de formol 40% e água destilada q.s.p. 100 ml) na proporção de 1:200. A contagem dos eritrócitos foi realizada na câmara de Neubauer sob objetiva de 40X em um microscópio Motic B5 Professional, (Motic Instruments Inc., Canada). Os resultados foram apresentados como número de eritrócitos/mm³.

g) Constantes corpusculares, que foram determinadas pelos métodos descritos por Brown (1976), como segue:

$$\text{Volume corpuscular médio (VCM; } \mu\text{m}^3) = \text{Ht} \times 10/\text{RBC}$$

$$\text{Hemoglobina corpuscular média (HCM; } \mu\text{g}) = [\text{Hb}] \times 10/\text{RBC}$$

$$\text{Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM; \%)} = [\text{Hb}] \times 100/\text{Ht}$$

2.5. Análise estatística

Os dados obtidos nos bioensaios foram avaliados usando a chamada estatística quântica, que se caracteriza pela resposta a um estímulo de n unidades experimentais, onde r unidades respondem e $n-r$ não respondem (Morea, 1997).

Para o cálculo da CL_{50} , os dados de mortalidade nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas foram tratados pelo programa computacional “ LC_{50} Programs JS Pear Test” baseado no método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977), o qual usa o número de concentrações, os valores dessas concentrações do agente estressor, o número de indivíduos usados por concentração, e a porcentagem da mortalidade por concentração. Este método foi usado tomando em consideração a razoável exatidão, precisão, facilidade de informatizar e robustez da informação em comparação com o modelo integrado normal “**Probit**” e o modelo logístico “**Logit**” (Hamilton *et al.* 1977; Thurston *et al.*, 1978; 1983).

Os resultados de crescimento e hematologia, avaliados sob exposição às três concentrações de fenantreno e o controle, foram expressos na forma de média e erro padrão da média (SEM). Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os tratamentos em nível de 5%, foi aplicado o Teste de Tukey para a discriminação das diferenças, usando o programa estatístico

Jandel Sigma Stat versão 2.0 para Windows. Os gráficos foram feitos com o Programa SigmaPlot 2002 versão 8,02 para Windows.

3. RESULTADOS

3.1. Concentração Letal Média (CL₅₀)

3.1.1. Determinação do Comprimento de onda para o fenantreno

Observou-se que para as diferentes concentrações de fenantreno as absorvâncias tinham sempre seu pico mais alto em 250 nm, quando comparadas com os demais comprimentos de onda (Figura 1).

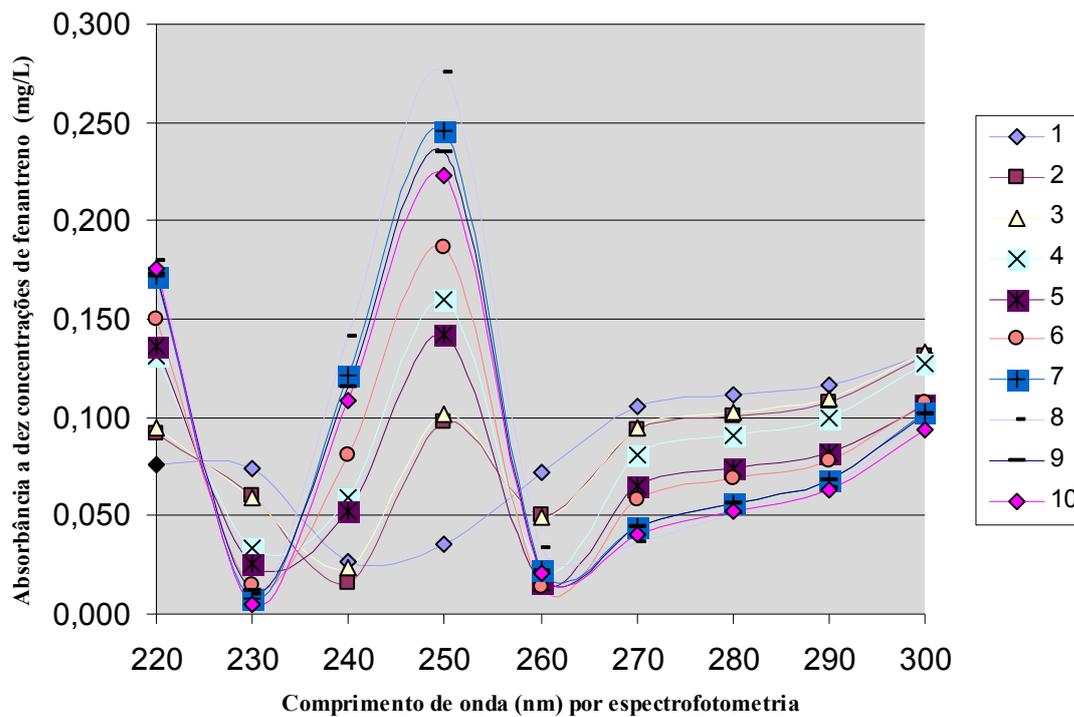


Figura 1. Valores para densidade óptica nas diferentes concentrações de fenantreno. Os números e símbolos em cores representam as concentrações de fenantreno (mg/L).

3.1.2. Determinação da Curva de Calibração

Os dados da curva de calibração, tratados com a regressão não linear, apresentaram a seguinte equação e gráfico (Figura 2).

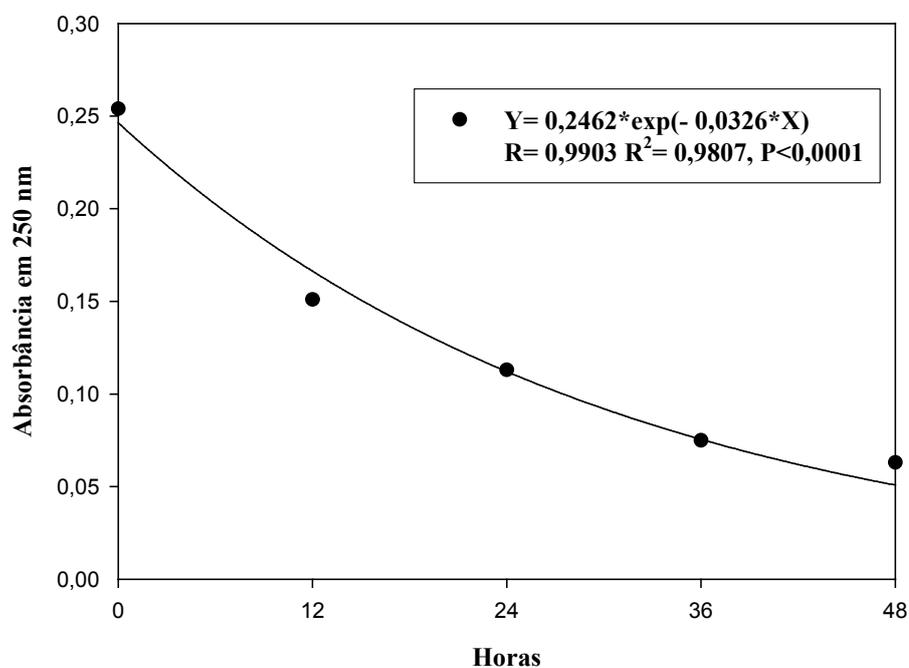


Figura 2. Absorbância do fenantreno (1 mg/L) em 250 nm durante 48 horas e a equação exponencial resultante.

Com a equação resultante determinou-se a quantidade de fenantreno que era volatilizada após 12 horas. A taxa de reposição necessária para manter a concentração inicial de fenantreno após 12 h foi calculada como 205,27 $\mu\text{g/L}$.

3.1.3. Determinação da CL₅₀

A concentração de fenantreno que resultou em 10% de sobrevivência de tambaquis foi 1,50 mg/L. A partir deste dado, foram determinadas as demais concentrações, segundo o método de Sprague (1990). As duas primeiras concentrações tiveram 0% de mortalidade e as últimas cinco concentrações 100% de mortalidade (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade de *Colossoma macropomum* expostos às dez concentrações de fenantreno para determinação da CL₅₀ em 96 horas.

Nº de concentrações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentração (mg/L)	0,65	0,72	0,80	0,89	0,98	1,09	1,22	1,35	1,50	1,67
Nº de peixes expostos	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Nº de peixes mortos (96 h)	0	0	1	10	8	20	20	20	20	20

A CL₅₀ para 96 horas do fenantreno para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) estimada pelo método Trimmed Spearman-Kärber foi 0,94 mg/L, com um intervalo de confiança de 95% de 0,91 mg/L até 0,97 mg/L. O programa computacional “LC₅₀ Programs JS Pear Test” também calculou os valores da CL₅₀ do fenantreno a cada 24 horas (Figura 3). O maior valor registrado foi às 24 horas sendo 1,09 mg/L variando de 1,05 a 1,13 mg/L.

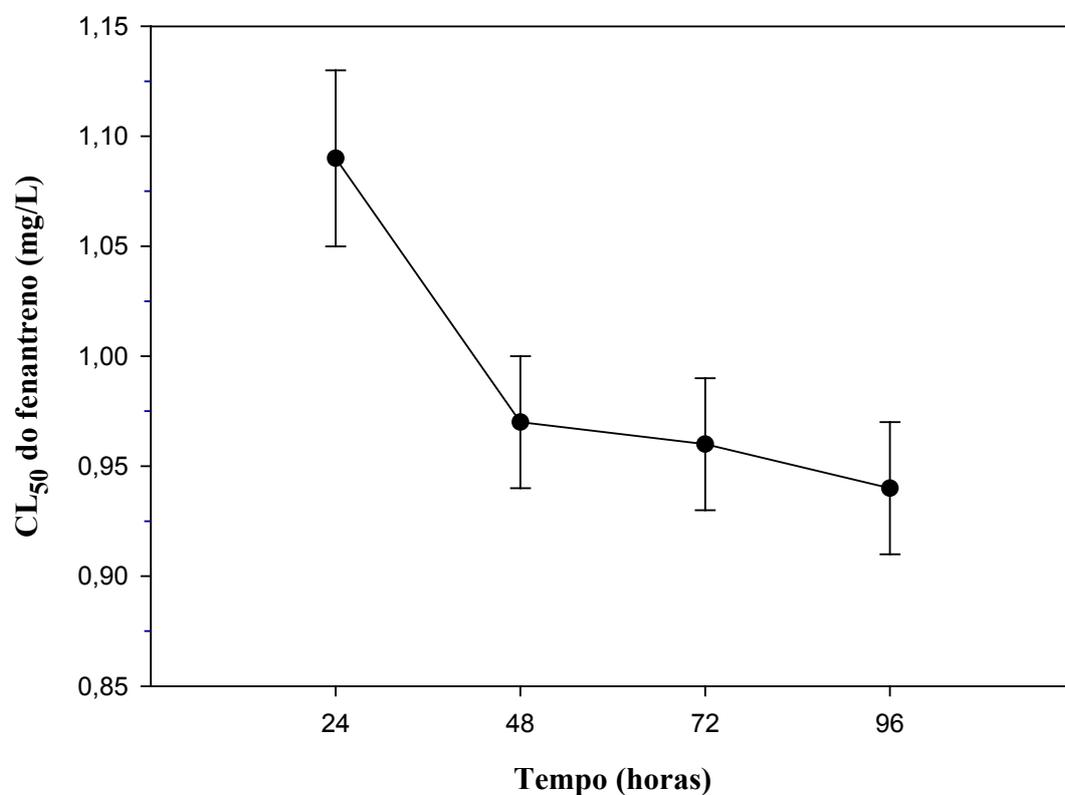


Figura 3. Valores de toxicidade (CL₅₀) em função do tempo de exposição ao fenantreno para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber.

Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físico-químicos registrados no aquário controle e nos aquários experimentais mantiveram-se sem variações significativas, o que reduz a possibilidade de mortalidade causada por variações bruscas desses parâmetros, durante as 96 horas de experimento (Tabela 3).

Tabela 3. Características físico-químicas da água dos aquários experimentais utilizadas durante os experimentos da CL₅₀. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle.

Concentrações (mg/L)	Parâmetros físico-químicos		
	pH	O ₂ (mg/L)	T° (°C)
Controle	6,74 ± 0,12	6,16 ± 0,17	27,20 ± 0,09
0,65	7,02 ± 0,13	6,04 ± 0,09	26,96 ± 0,07
0,72	7,06 ± 0,05	6,16 ± 0,09	27,06 ± 0,11
0,8	6,88 ± 0,16	5,94 ± 0,13	26,92 ± 0,10
0,89	7,12 ± 0,06	6,04 ± 0,05	27,00 ± 0,05
0,98	6,96 ± 0,05	6,14 ± 0,09	26,98 ± 0,07
1,09	7,13 ± 0,07	6,13 ± 0,09	27,00 ± 0,10
1,22	7,03 ± 0,03	6,13 ± 0,12	26,90 ± 0,06
1,35	7,10 ± 0,10	6,10 ± 0,10	27,00 ± 0,00
1,5	7,00 ± 0,06	6,00 ± 0,06	26,93 ± 0,03
1,67	6,90 ± 0,20	6,10 ± 0,06	27,00 ± 0,06

Também foi observada elevada produção de muco, expansão do lábio inferior, perda do equilíbrio hidrodinâmico e movimentos desordenados (sobretudo nos primeiros vinte minutos). A expansão do lábio inferior é uma característica sintomática de hipoxia, apesar dos níveis de oxigênio apresentarem-se normais. Situação similar foi descrita por Oliveira (2003), que trabalhou com metais de transição presentes na água de formação do petróleo.

3.2. Crescimento e Bio-índices

Observou-se que o fator de condição (CF) dos peixes apresentou mudança significativa em relação à variável tempo de exposição ($p < 0,001$), expressada pelas letras maiúsculas. Nas primeiras duas semanas as médias de todos os tratamentos incluindo o controle levaram a um incremento significativo no fator de condição quando comparado com o início; nas últimas duas semanas mostraram um decréscimo significativo do mesmo fator, que assumiu inclusive valores menores que os iniciais, exceto o controle. A comparação inicial dos CF entre grupos, expressada pelas letras minúsculas não teve diferença significativa, eliminando desta forma uma possível influência da diferença de tamanhos entre grupos. Após 4 semanas de exposição observou-se um CF significativamente menor para todos os tratamentos quando comparados ao controle ($p < 0,05$). O índice hepatossômático, ao final das quatro semanas, não foi afetado significativamente. Ao final das quatro semanas, observou-se para todos os tratamentos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do ganho de peso em comparação com o controle (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito das diferentes concentrações de fenantreno sobre o fator de condição, o índice hepatossomático e o ganho de peso de *Collossoma macropomum* durante 4 semanas. Os valores representam as médias de 5 réplicas \pm SEM. Letras minúsculas comparam diferenças das médias entre todos os grupos. Letras maiúsculas comparam o fator de condição em relação ao tempo.

<i>Parâmetros</i>	<i>Período de exposição (semanas)</i>	<i>Concentração de fenantreno (%CL₅₀)</i>			
		<i>Controle</i>	<i>5</i>	<i>25</i>	<i>50</i>
Fator de condição	0 ^A	1,65 \pm 0,03 ^a	1,58 \pm 0,05 ^a	1,61 \pm 0,04 ^a	1,69 \pm 0,02 ^a
	2 ^B	1,71 \pm 0,03 ^a	1,67 \pm 0,04 ^a	1,73 \pm 0,05 ^a	1,79 \pm 0,05 ^a
	4 ^A	1,71 \pm 0,05 ^a	1,52 \pm 0,02 ^b	1,58 \pm 0,02 ^b	1,58 \pm 0,04 ^b
Índice hepatossomático	4	2,56 \pm 0,13 ^a	2,40 \pm 0,07 ^a	2,31 \pm 0,14 ^a	2,31 \pm 0,17 ^a
Ganho de peso (g)	4	13,44 \pm 1,83 ^a	7,17 \pm 1,39 ^b	6,99 \pm 1,80 ^b	7,08 \pm 1,13 ^b

O ganho de peso percentual e o crescimento específico também apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao controle (Figura 5).

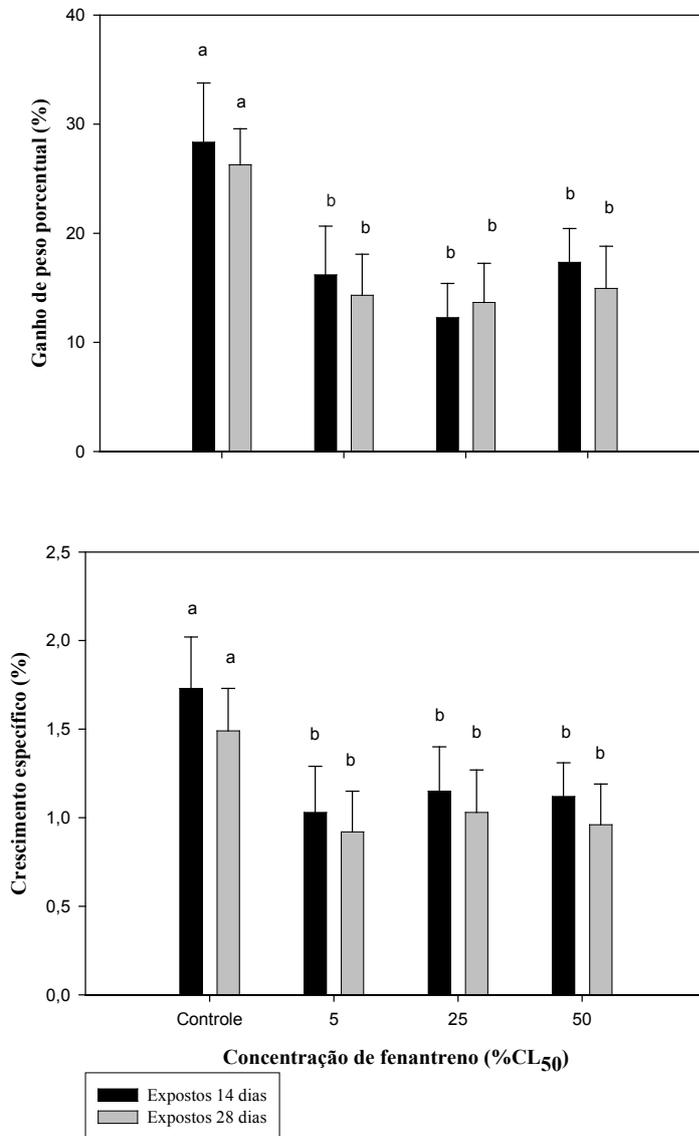


Figura 5. Efeito das diferentes concentrações de fenantreno sobre o ganho de peso percentual e o crescimento específico de *Colossoma macropomum* durante 4 semanas. As colunas e barras verticais representam as médias de 5 réplicas \pm SEM. Letras minúsculas comparam diferenças das médias entre todos os grupos.

A conversão alimentar aparente não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos; tampouco houve diferenças entre os períodos de exposição. A eficiência alimentar (FE) indicou uma redução significativa ($p < 0,05$) nas últimas duas semanas quando comparados com as primeiras duas semanas de exposição. Além disso, a FE para todos os tratamentos foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparados ao controle (Figura 6).

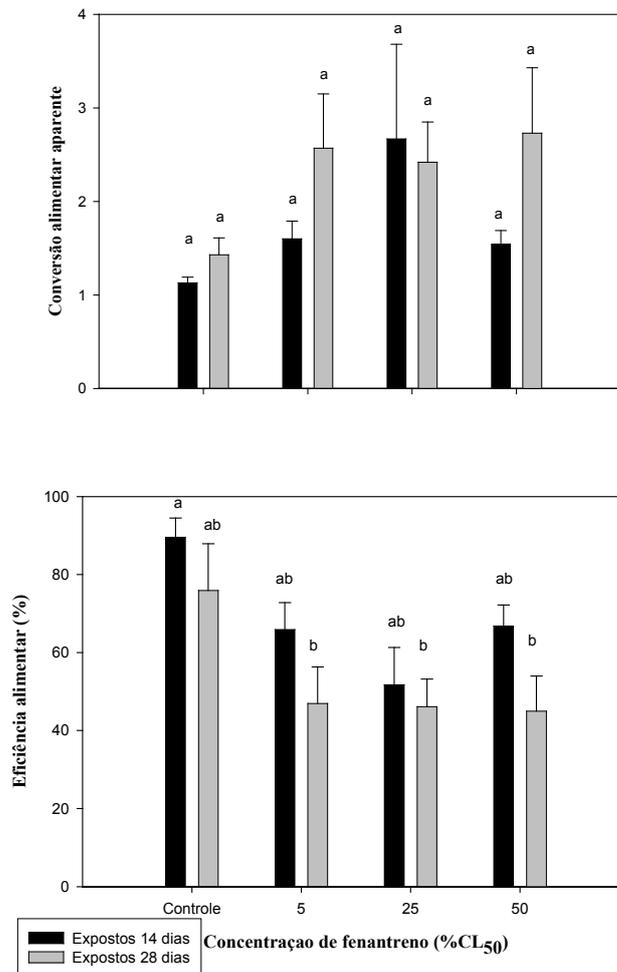


Figura 6. Efeito das diferentes concentrações de fenantreno sobre a conversão alimentar aparente e a eficiência alimentar de *Collossoma macropomum* durante 4 semanas. As colunas e barras verticais representam as médias de 5 réplicas \pm SEM. Letras minúsculas comparam diferenças das médias entre todos os grupos.

A concentração de hemoglobina (Hb) foi significativamente menor ($p < 0,05$) para os tratamentos a 5% ($6,08 \pm 0,21$) e 25% ($6,09 \pm 0,10$), em comparação com o controle ($6,91 \pm 0,11$), embora não tenha sido observada diferença significativa entre o tratamento a 50% e o controle. As porcentagens de metahemoglobina (MetaHb) foram maiores significativamente ($p < 0,05$) para os tratamentos a 25% ($48,59 \pm 1,83$) e 50% ($48,80 \pm 1,95$), quando comparados ao controle ($39,91 \pm 1,13$); não houve diferenças significativas entre o tratamento a 5% e o controle. A glicose plasmática foi maior significativamente ($p < 0,05$) para o tratamento a 50% ($63,15 \pm 3,36$), diferenças significativas não foram observadas entre os tratamentos a 5 e 25%, quando comparados ao controle ($45,50 \pm 0,77$). O lactato plasmático também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), sendo o tratamento a 25% ($53,36 \pm 2,76$ mg/L) maior que o tratamento a 5% e o controle; não houve diferenças significativas entre o tratamento a 25% e o 50% ($43,92 \pm 2,91$). Outros parâmetros hematológicos como RBC, Ht, VCM, HCM e MCHM indicaram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos e o controle (Tabela 5).

Tabela 5. Mudanças nos parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* após quatro semanas de exposição a diferentes concentrações de fenantreno. Os valores representam as médias de 5 replicas \pm SEM. Letras minúsculas comparam diferenças das médias entre todos os grupos.

<i>Parâmetros</i>	<i>Concentração de fenantreno (%CL₅₀)</i>			
	<i>Controle</i>	<i>5</i>	<i>25</i>	<i>50</i>
RBC (10 ⁶ cél/mm ³)	2,32 \pm 0,09 ^a	2,26 \pm 0,05 ^a	2,08 \pm 0,10 ^a	2,25 \pm 0,02 ^a
Hb (g/dL)	6,91 \pm 0,11 ^a	6,08 \pm 0,21 ^b	6,09 \pm 0,10 ^b	6,33 \pm 0,19 ^{ab}
Ht (%)	27,60 \pm 0,68 ^a	27,00 \pm 0,89 ^a	26,20 \pm 1,15 ^a	26,40 \pm 0,75 ^a
MetaHb (%)	39,91 \pm 1,13 ^a	40,01 \pm 2,49 ^a	48,59 \pm 1,83 ^b	48,80 \pm 1,95 ^b
Glicose (mg/dL)	45,50 \pm 0,77 ^a	55,48 \pm 3,69 ^{ab}	57,90 \pm 6,20 ^{ab}	63,15 \pm 3,36 ^b
Lactato (mg/L)	39,06 \pm 1,41 ^a	34,74 \pm 4,25 ^a	53,36 \pm 2,76 ^b	43,92 \pm 2,91 ^{ab}
HCM (μm^3)	29,92 \pm 0,99 ^a	26,86 \pm 1,00 ^a	29,51 \pm 1,35 ^a	28,15 \pm 0,89 ^a
VCM (μg)	119,43 \pm 3,96 ^a	119,31 \pm 4,25 ^a	126,52 \pm 4,61 ^a	117,31 \pm 2,96 ^a
MCHC (%)	25,10 \pm 0,85 ^a	22,57 \pm 0,80 ^a	23,34 \pm 0,75 ^a	24,05 \pm 0,93 ^a

4. DISCUSSÃO

4.1. Determinação da CL_{50}

Yang e colaboradores (2002) encontraram o comprimento de onda de 254 nm como limite para detecção de fenantreno 4,9 $\mu\text{g/L}$, em comparação com 220 nm, onde o limite de detecção foi 13 $\mu\text{g/L}$. Além disso, Yang e colaboradores (2002) recomendam trabalhar entre 200 e 254 nm para detecção de PAHs, porque as suas sensibilidades são relativamente maiores, entre estes comprimentos de onda. Segundo a Toyohashi University of Technology do Japão (2001), o comprimento de onda de 251 nm do espectro UV permitiu ter 100% da função espectral máxima, comparado com 293 nm, onde a função espectral máxima foi de 15,9% (Figura 7). Tendo como referência esses trabalhos, e considerando que foi medida a absorbância para o fenantreno entre 220 e 300 nm, sendo o pico de maior absorbância em 250 nm, a eleição desse comprimento de onda foi quase similar aos estudos anteriores, permitindo uma boa detecção da absorbância do fenantreno para fazer a curva de calibração.

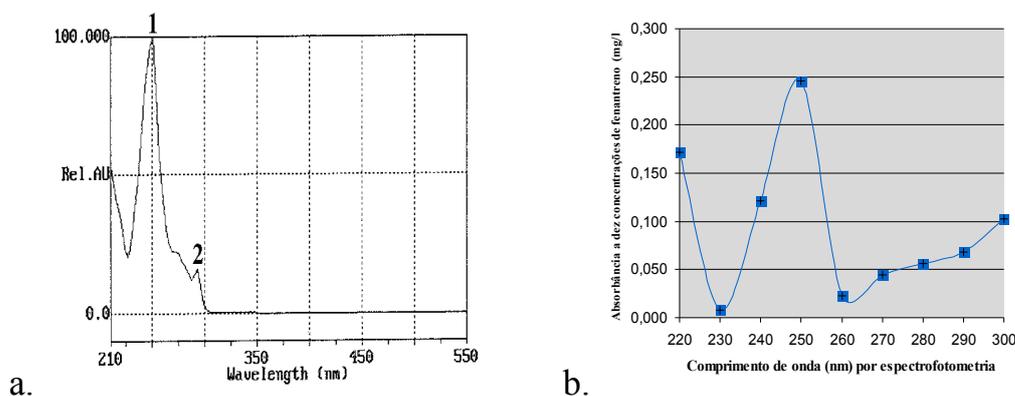


Figura 7. (a) Gráfico encontrado pela Toyohashi University of Technology do Japão para trabalhos com fenantreno. [1: $f_{\text{Émax}} = 251 \text{ nm}$ (100.0), 2: $f_{\text{Émax}} = 293 \text{ nm}$ (15.9)] (b). Gráfico encontrado neste trabalho.

Lotufo & Fleeger (1996) determinaram durante 10 dias uma toxicidade aguda causada por altas concentrações de fenantreno em sedimentos para *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: tubificidae), sendo a CL₅₀ 297,5 µg/g e o intervalo de confiança a 95% (252,2 – 348,3 µg/g). Nesse estudo com oligoquetos o fenantreno foi mais tóxico do que o pireno, que a concentrações de 841 µg g⁻¹ de pireno ainda não mostrava toxicidade aguda para *L. hoffmeisteri*. Swartz e colaboradores (1997) também usaram 10 dias de exposição para determinar a CL₅₀ do fenantreno sobre o anfípodo marinho *Rhepoxynius abronius*. Este trabalho permitiu determinar a toxicidade aguda causada pelo fenantreno para *C. macropomum* durante 4 dias (96 horas), considerado tempo suficiente para determinar a CL₅₀ e reforçado por outros estudos com tempos similares para determinar a toxicidade aguda de outros compostos como: amônia e nitrito para *Salmo clarki* (Salmonidae, Pisces) por Thurston *et al.* (1978); amônia para *Pimephales promelas* (Cyprinidae, Pisces) por Thurston *et al.* (1983); fenantreno e zinco para *Cyprinodon variegatus* (Cyprinodontidae, Pisces) por Moreau *et al.* (1999); petróleo para *C. macropomum* (Characidae, Pisces) por Paula-Silva *et al.* (2002); óleo diesel de motores para *Salmo gairdneri* (Salmonidae, Pisces) por Poirier *et al.* (1986); entre outros.

Neste estudo utilizou-se a iluminação das lâmpadas fluorescentes durante a noite, por quanto não existe foto-indução da luz sobre o fenantreno. Swartz e colaboradores (1997) estudaram a toxicidade direta e a toxicidade fotoinduzida do fenantreno sobre o anfípodo marinho *Rhepoxynius abronius*. A CL₅₀ foi determinada em 2,2 mg de fenantreno/g carbono orgânico. Depois de 10 dias de exposição em sedimentos contaminados e baixa iluminação fluorescente, os sobreviventes foram expostos a uma hora de radiação UV. Após este período, foram testadas as suas habilidades para se enterrar em sedimentos não contaminados, evidenciando que a exposição à radiação UV não afetou a toxicidade do fenantreno.

Neste trabalho foi empregado o fenantreno sem ser misturado com alguma outra substância que não seja a água “controle (INPA)” e durante 96 horas, embora se acredite que os metais não afetam a captura de fenantreno, os quais estão praticamente ausentes na água utilizada para os experimentos. Moreau e colaboradores (1999) estudaram a interação entre fenantreno e zinco e suas toxicidades para *Cyprinodon variegatus* (Cyprinodontidae, Pisces) com bioensaios de 96 horas para taxas fixas, assim como, com proporções variadas de zinco e fenantreno. Os estudos indicaram uma interação antagônica entre fenantreno e zinco. A captura do zinco foi significativamente menor na presença do fenantreno que em sua ausência. Em contraste, o zinco parece não afetar a captura do fenantreno.

Segundo Lamy-Enrici e colaboradores (2003), *Chironomus riparius* (Chironomidae, Díptera) após 10 dias e *Hyalella azteca* (Hyalellidae, Crustácea) após 14 dias de exposição ao fenantreno, influenciados pela disponibilidade de matéria orgânica tiveram taxas de sobrevivência abaixo dos 44% a 300 mg Kg⁻¹ de fenantreno (peso seco). Neste trabalho, a água “controle (INPA)” praticamente está desprovida de substâncias orgânicas como é indicado na tabela 1, reduzindo, dessa forma, a influência da matéria orgânica dissolvida na água para a determinação da CL₅₀.

Black e colaboradores (1983) usaram estágios embrio-larvais de truta arco íris *Salmo gairdneri* (Salmonidae, Pisces) e achigã *Micropterus salmoides* (Centrarchidae, Pisces) comparando, mediante testes de fluxo contínuo, a toxicidade de seis hidrocarbonetos aromáticos, sendo alguns hidroxilados (fenol, beta-naftol), azarenos ou nitrogenados (quinoleno, acridine) e PAHs (naftaleno e fenantreno). A exposição foi iniciada na fertilização e mantida durante 4 dias após a eclosão. A CL₅₀ para o fenantreno foi 0,04 mg/L para *S. gairdneri* e 0,18 mg/L para *M. salmoides*. Neste trabalho os resultados foram obtidos usando testes de fluxo semi-estático. Foi encontrado que a CL₅₀ do fenantreno para *C. macropomum*,

durante 96 horas, foi de 0,94 mg/L, podendo se explicar o maior valor da CL₅₀ pelo fato de ter usado indivíduos juvenis em comparação com os indivíduos embrio-larvais que tem maior sensibilidade. Claramente, as respostas dos organismos aos diversos tóxicos também variam com o estágio de desenvolvimento ontogênico, ou seja, quanto menor a superfície corporal, maior a exposição ao contaminante (Walker & Peterson, 1991, Walker *et al.*, 1992).

Segundo Antón & Lizaso (2001), os valores de CL₅₀ do fenantreno para peixes marinhos, durante 96 horas, variam de 0,04 a 0,60 mg/L, cujo intervalo superior está abaixo do valor da CL₅₀ encontrado neste trabalho para *C. macropomum* (0,94 mg/L). Devem-se considerar, sem dúvida, as diferenças biológicas que existem entre as espécies marinhas e as de água doce, como concentrações mais expressivas de ácidos graxos polinsaturados em peixes marinhos, os quais são alvos para os PAHs como o fenantreno.

Segundo Oliveira (2003), decréscimos no valor da CL₅₀ com o aumento do tempo de exposição são esperados, uma vez que para causar a mortalidade da metade da população em um menor período de tempo é necessário que a concentração seja mais elevada. Os dados obtidos neste trabalho corroboram essa afirmação, já que o valor da CL₅₀ do fenantreno foi decrescendo a cada 24 horas (1,09; 0,97; 0,96 e 0,94 mg/L).

Segundo Hawkins e colaboradores (2002), o fenantreno e o reteno (7 isopropil-1- metil fenantreno) são letais para as larvas da truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), durante exposições crônicas. Assim mesmo, o fenantreno possui uma baixa toxicidade para ser indutor do citocromo P4501A (CYP1A), gene que se manifesta nos tecidos dos peixes durante exposições a concentrações letais de tóxicos na água. Contudo, neste trabalho embora não tenha sido avaliada a expressão do gene CYP1A, foi importante determinar a CL₅₀ e seus efeitos no crescimento e na hematologia de juvenis de tambaqui expostos cronicamente a este contaminante.

4.2. Crescimento e Hematologia

Nos testes de toxicidade crônica, os organismos sofrem exposições por um longo período de tempo a concentrações sub-letais de determinados poluentes para avaliação de seus efeitos (Sprague, 1990). Testes de toxicidade crônica são considerados muito importantes para entender as respostas de um organismo a uma perturbação ambiental (Oliveira, 2003). É importante indicar que os efeitos fisiológicos podem ter resultado devido à exposição a altas concentrações de poluente ou a um longo período de exposição a concentrações sub-letais (Paula-Silva *et al*, 2002).

Neste trabalho, o tempo usado foi de 28 dias para testar a toxicidade crônica do fenantreno sobre *Colossoma macropomum*. Lotufo & Fleeger (1996) usaram também 28 dias para estimar os efeitos de toxicidade subletal do fenantreno sobre o comportamento e a reprodução do oligoqueto *Limnodrilus hoffmeisteri*, encontrando uma redução na sua atividade de escavação e na sua atividade reprodutiva. Outro tempo similar foi empregado por Jee e colaboradores (2004), que estudaram os efeitos do fenantreno sobre o crescimento e as funções básicas de *Paralichthys olivaceus* (Paralichthyidae, Pisces), encontrando uma redução do seu crescimento e mudanças na sua fisiologia.

O peso e o comprimento do corpo usados no fator de condição são as medidas de crescimento mais comuns para os peixes. É comum notar que peixes forçados a se adaptar a ambientes tóxicos, são menos capazes de usar a energia para seu crescimento corpóreo (Mommsen, 1998). Para a análise da relação existente entre a alimentação e o crescimento dos peixes durante diversas etapas do seu desenvolvimento tem se utilizado o fator de condição (Gallardo & Gual, 1983). Os resultados do presente trabalho indicam que o crescimento de *C. macropomum* é afetado adversamente pela exposição continuada ao fenantreno, considerando a redução de seu fator de condição, ao final das quatro semanas de exposição. Estes dados

diferem dos resultados encontrados em avaliações similares com *P. olivaceus*, realizados por Jee e colaboradores (2004), que não encontraram diferenças significativas para o fator de condição. A exposição continuada ao fenantreno tem um impacto negativo sobre o fator de condição à medida que a capacidade biológica dos peixes para se adaptar a condições tóxicas vai se esgotando.

Estudos de laboratório indicam redução das taxas de crescimento para *Pleuronectes vetulus* (Pleuronectidae, Pisces) exposto a PAHs em sedimentos ou ração contaminada (Jee *et al.*, 2004). A taxa de crescimento reduzido tem sido associada com incrementos de mortalidade de juvenis em muitas espécies de peixes (Lorenzen, 1996). Neste experimento o ganho de peso final, ganho de peso percentual, crescimento específico e eficiência alimentar dos peixes se reduziram significativamente em função do tempo de exposição. Os dados obtidos neste trabalho coincidem com os de Jee e colaboradores (2004), que também encontraram diferenças significativas para estes bio-índices em *Paralychthys olivaceus* exposto ao fenantreno por 4 semanas.

Experimentos realizados por Jee e colaboradores (2004) não evidenciaram diferenças significativas para o índice hepatossômico em *P. olivaceus*, exposto a diferentes concentrações de fenantreno por 4 semanas, quando comparados com o grupo controle. Neste estudo, ainda a pesar de uma tendência a diminuição do índice hepatossômico nos diferentes tratamentos, comparados com o controle, também não foi demonstrada variação significativa. O fígado dos peixes serve também como órgão de armazenamento de gorduras e carboidratos, como o glicogênio. A relação entre o peso do corpo e o peso do fígado pode ser um indicador do seu estado nutricional (Mori, 1999). Considerando estas informações, poderia ser que os peixes dos diferentes tratamentos começaram a entrar em fase de aproveitamento das reservas

acumuladas no fígado, visto que a eficiência alimentar apresentou uma diminuição, explicada pela diminuição de aproveitamento da ração, provavelmente ocasionada pelo poluente.

Rowe e colaboradores (1983b) avaliaram trutas arco íris *S. gairdneri* (Salmonidae, Pisces) expostas a 30% de efluentes de tratamento de uma refinaria durante 44 dias, tendo observado uma forte redução no crescimento. Experimentos com *C. riparius* (Chironomidae, Díptera) após 28 dias de exposição ao fenantreno não foram suficientes para observar diferenças significativas no crescimento dos sobreviventes, de quaisquer das concentrações (Lamy-Enrici *et al.*, 2003). Neste experimento de 28 dias, já começaram a se notar diferenças no crescimento dos peixes, os quais poderiam ter sido mais notórios, com um maior tempo de exposição ao fenantreno.

As principais respostas hematológicas nesta avaliação foram dadas pela concentração de hemoglobina que foi significativamente menor nos tratamentos de 5% e 25%, em relação ao controle. Dados similares foram encontrados por Jee e colaboradores (2004), que observaram um decréscimo da concentração de hemoglobina entre diferentes tratamentos com fenantreno quando comparados com o grupo controle. Dede e colaboradores (2002) inocularam amostras de petróleo cru, querosene e gasolina em ratos e, após 3 meses, observaram uma significativa redução na concentração de hemoglobina, quando comparados com o grupo controle. Estes trabalhos coincidem com os resultados aqui obtidos, o que nos leva a supor que o fenantreno ocasiona anemia nos peixes devida a uma redução dos níveis de hemoglobina. De acordo com Jee e colaboradores (2004) a baixa taxa de hemoglobina poderia ser causada por um incremento na taxa de destruição da hemoglobina ou por um decréscimo na sua taxa de síntese. Com relação ao efeito da maior exposição ao fenantreno sobre a concentração de hemoglobina, há indícios da necessidade de ampliação do número amostral.

Experimentos realizados em *Hoplosternum littorale* (Callichthyidae, Pisces) e *C. macropomum* por Almeida-Val e colaboradores (2002) encontraram um aumento nos níveis de metahemoglobina, como resultado da exposição por 24 horas ao petróleo cru e sua fração solúvel na água. Paula-Silva e colaboradores (2002) também reportam um incremento nos níveis de metahemoglobina de *Arapaima gigas* (Arapaimidae, Pisces) quando exposto ao petróleo cru por 24 horas. Estes dados coincidem com os resultados aqui apresentados, onde as taxas de metahemoglobina apresentaram um incremento significativo entre os tratamentos com as concentrações mais altas de fenantreno (25% e 50%), quando comparados com o controle e com o tratamento de 5%. É possível sugerir que o fenantreno induz à aparição de metahemoglobina, que poderia afetar seriamente a homeostase e a troca gasosa dos peixes (Almeida-Val *et al.*, 2002). Val (1997) ressalta que o incremento de RBC e dos níveis de Hb não são compensados pelos altos níveis de metahemoglobina circulante, quando os peixes são expostos ao petróleo.

A glicose é considerada um clássico indicador de estresse (Rogers *et al.*, 2003). Observou-se um incremento nos níveis de glicose para *C. macropomum* exposto a 50% do valor da CL₅₀ do fenantreno. Os resultados aqui encontrados coincidem com os experimentos realizados por Paula-Silva e colaboradores (2002) com tambaqui exposto a petróleo cru, durante 24 horas. Araújo e colaboradores (2005), que trabalharam com *C. macropomum* exposto ao petróleo, dispersante e uma combinação deles, durante 48 horas, também encontraram diferenças significativas para glicose quando comparados com o grupo controle. Estes dados permitem supor que o fenantreno se comporta como um agente estressor.

Neste trabalho há também um incremento nos níveis de lactato plasmático para o tratamento a 25%. Este resultado também foi encontrado por Almeida-Val e colaboradores (2002) em *C. macropomum* exposto a petróleo cru durante 24 horas. Pode-se supor então, que

este aumento seria causado pela fração solúvel, incluindo o fenantreno, que poderia induzir um incremento do metabolismo anaeróbio, por reduzir a troca gasosa do peixe com seu ambiente dado o incremento nos níveis de metahemoglobina.

O tambaqui é uma espécie altamente tolerante à exposição ao petróleo, não mostrando mudanças significativas nos parâmetros hematológicos por 96 horas e ainda em altos níveis de petróleo (2,262 mm de lamina superficial), embora apresentasse um incremento nos níveis de glicose, indicando algum grau de estresse (Silva *et al.*, 2002). Trabalhos com chumbo usando concentrações próximas ao do valor da CL₅₀ por um tempo até 120 horas com trutas arco íris *Oncorhynchus mykiss* tampouco evidenciaram mudanças significativas nos parâmetros hematológicos (Rogers *et al.*, 2003). Mendes & Val (1997) encontraram que hematócrito, RBC, Hb, MCV, MCH e MCHC foram constantes em *Liposarcus pardalis* (Loricariidae, Pisces) expostos por 24 horas a 0,04 e 0,16 mm da capa de petróleo superficial. Trabalhos com petróleo e dispersantes, realizados por Araújo e colaboradores (2005) com *C. macropomum* durante 48 horas, tampouco encontraram diferenças significativas para RBC e as constantes corpusculares. Esses dados são similares aos resultados aqui apresentados, permitindo supor que um maior tempo de exposição ao fenantreno poderia determinar diferenças significativas nesses parâmetros, como foi reportado por Dede e colaboradores (2002), que encontraram diferenças significativas para RBC após 3 meses de exposição a produtos tóxicos relacionados com o petróleo.

O acúmulo de PAHs ocorre em todos os organismos, embora exista uma grande escala para sua concentração nos tecidos, que depende das variadas concentrações ambientais, nível e tempo de exposição e, sobretudo, da habilidade das espécies para metabolizar estes compostos (Meador *et al.*, 1995).

5. CONCLUSÕES

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é considerado uma espécie altamente tolerante ao petróleo. O valor de CL₅₀ para o fenantreno, durante 96 horas foi estabelecido em **0,94 ± 0,03 mg/L**, valor superior aos detectados para peixes marinhos. Não há valores descritos para peixes de água doce.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) pode suportar exposição ao fenantreno até duas semanas sem prejudicar o seu fator de condição, após esse tempo, este bio-índice é reduzido drasticamente.

Após 4 semanas de exposição ao fenantreno, a partir da concentração 5% do valor da CL₅₀, os bio-índices como ganho de peso final e percentual, crescimento específico e eficiência alimentar podem ser significativamente afetados.

O fenantreno, a partir da concentração 5% do valor da CL₅₀, causa anemia, já que reduz significativamente a concentração de hemoglobina do tambaqui (*Colossoma macropomum*) após 4 semanas de exposição.

O fenantreno age como agente estressor, já que incrementa os níveis de glicose e lactato plasmático no sangue do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

O fenantreno induz a formação de metahemoglobina em tambaqui (*Colossoma macropomum*) após 4 semanas de exposição, o que pode afetar a sensibilidade desta espécie de grande interesse na Amazônia.

6. RECOMENDAÇÕES

Realizar maior número de testes com tempos maiores de exposição para determinar efeitos crônicos do fenantreno no tambaqui e em outros peixes da Amazônia.

Alertar a comunidade científica dos perigos que representa o fenantreno para o tambaqui e outros peixes de água doce.

Monitorar os corpos de água doce para este poluente em áreas com maior atividade petrolífera.

6. REFERÊNCIAS

- Almeida-Val, V.M.F., Duncan, W.P. & Val, A.L., 2002. Crude oil effects on fish of the Amazon: Current status. In: Tropical Fish. News and Reviews; Proceedings of the International Congress on the Biology of Fish, Vancouver, B.C. Canada, Julho 22-25, Val, A. & Mac Kinlay, D. (Eds), pp 49-59.
- Adham, K.G., Ibrahim, H.M., Hamed, S.S. & Saleh, R.A., 2002. Blood chemistry of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) under the impact of water pollution. *Aquatic Ecology* 36: 549-557.
- Alcántara, F.B., Chávez, C.V., Kohler, C.C., Rodriguez, L.C. & Camargo, W.N., 2003. Gamitana (*Colossoma macropomum*) and paco (*Piaractus brachypomus*) culture in floating cages in the Peruvian Amazon. *World Aquaculture Magazine* 34 (4):22-24.
- Antón, A. & Lizaso, J. 2001. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. www.fundisa.org/articulos/fhaps.pdf. acessado em 15/05/2004.
- Araujo, J.O., Lopes, Jr., H.O., Brust, S.M.A., Pinto, L.R., Oliveira, A.M., Duarte, R.M., Araujo, R.M., Chippari-Gomes, A.R., Paula-Silva, M.N., Almeida-Val, V.M.F. & Val, A.L., 2005. Alterações hematológicas em juvenil de tambaqui expostos ao petróleo e ao dispersante. *Anais I Congresso Internacional Piatam: Ambiente, Homem, Gás e Petróleo*. UFAM, Manaus, Brasil, Dez. 11-15. pp.42.
- Atlas, R.M. & Cerniglia, C.E., 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *Bioscience* 45: 332-338.
- Benesch, R.E., Benesch, R. & Yung, S., 1973. Equation for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.* 55: 215-218.

- Bergquist, D.C., Fleckenstein, C., Szalai, E.B., Knisel, J. & Fisher, C.R., 2004. Environment drives physiological variability in the cold seep mussel *Bathymodiolus childressi*. *Limnology and Oceanography* 49 (3): 706-715.
- Black, J.A., Birge, W.J., Westerman, A.G. & Francis, P.C., 1983. Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. *Fundam. Appl. Toxicol.* 3 (5): 353-358.
- Brown, B.A., 1976. *Hematology: Principles and Procedures*. Lea & Febiger, 2da. Edição, Philadelphia.
- Brown, J.A., Stephens, S.M. & Stagg R.M., 1998. Oil produced water: Chronic impacts on juvenile turbot. In: *Fish response to toxic environments. Proceedings of the Congress on the Biology of fish*, Baltimore, MD, July 27-30, Kennedy, C. & MacKinlay, D. (Eds), pp 121-126.
- Cavret, S. & Feidt, C., 2005. Intestinal metabolism of PAH: in vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. *Environmental Research* 98: 22-32.
- Chagas E.C. & Val, A.L., 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesq. Agrop. Bras.* 38 (3): 397-402.
- Chaty, S., Rodius, F. & Vasseur, P., 2004. A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology* 69: 81-94.
- Clemente, A.R., Anazawa, T.A. & Durrant, L.R., 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 32 (4): 255-261.

- Cruz-Orea, A., Tomás, S.A., Guerrero-Zuñiga, A. & Rodríguez-Dorantes, A., 2004. Detection of an aromatic compound at the roots of *Cyperus hermaphroditus* by photoacoustic techniques. *International Journal of Thermophysics* 25 (2): 603-610.
- Danis, B., Goriely, S., Dubois, P., Fowler, S.W., Flamand, V. & Warnau, M., 2004. Contrasting effects of coplanar versus non-coplanar PCB congeners on immunomodulation and CYP1A levels (determined using an adapted ELISA method) in the common sea star *Asterias rubens* L. *Aquatic toxicology* 69 (4): 371-383.
- Dede, E.B., Igboh, N.M. & Ayalogu, O.A., 2002. Chronic toxicity study of the effect of crude petroleum (Bonny light), kerosene and gasoline on rats using haematological parameters. *Journal of applied sciences & environmental management* 6(1): 60-63.
- DeLaune, R.D., Pezeshki, S.R., Jugsujinda, A. & Lindau, C.W., 2003. Sensitivity of US Gulf of Mexico coastal marsh vegetation to crude oil: Comparison of greenhouse and field responses. *Aquatic Ecology* 37: 351-360.
- De Solla, S.R., Fletcher, M.L. & Bishop, C.A., 2003. Relative contributions of Organochlorine contaminants, Parasitism, and Predation to Reproductive Success of Eastern Spiny Softshell Turtles (*Apalone spiniferus spiniferus*) from Southern Ontario, Canada. *Ecotoxicology* 12: 261-270.
- 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 (3-4): 175-186.
- Giessing, A.M.B. & Mayer, L.M., 2004. Oxidative coupling during gut passage in marine deposit-feeding invertebrates. *Limnology and Oceanography* 49 (3): 716-726.

- Goldstein, E.G., Zagatto, P.A., Araujo, R.P.A. & Bertoletti, E., 1983. Avaliação da toxicidade dos principais despejos industriais da região de ERQ-Suzano, Travis de ensaios biológicos. *Revista Dae* 132: 42-47.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C. & Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Sciences & Technology* 11(7): 714-719.
- Hawkins, S.A., Billiard, S.M., Tabash, S.P., Brown, R.S. & Hodson, P.V., 2002. Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (9): 1845-1853.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2004. [www.ibge.gov.br/espanhol/presidencia/noticias/images/mapa de biomassas e vegetación](http://www.ibge.gov.br/espanhol/presidencia/noticias/images/mapa_de_biomassas_e_vegetacao) acessado em 07/05/2006
- INPA, 2004. www.inpa.gov.br/em_evidencia acessado em 04/11/2004
- Gallardo, C.M. & Gual, F.A., 1983. Consideraciones bioecológicas durante el crecimiento de *Phycis blennoides* (Brunich, 1768), em el mediterráneo occidental (Pisces: Gadidae). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML)*, Universidad Autónoma de México.
- Jahan, K., Ahmed, T. & Maier, W.J., 1997. Factors affecting the nonionic surfactant-enhanced biodegradation of phenanthrene. *Water Environment Research* 69: 317-325.
- Jee, J.H., Kim, S.G. & Kang, J.C., 2004. Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 304: 123-136.

- Lafferty, K.D. & Holt, R.D., 2003. How should environmental stress affect the population dynamics of disease? *Ecology Letters* 6 (7): 654-664.
- Lamy-Enrici, M.H., Dondeyne, A. & Thybaud, E. 2003. Influence of the organic matter on the bioavailability of phenanthrene for benthic organisms. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 6 (4): 391-396.
- López-Vásquez, K., Oliveira, S.S., Cunha, L.K.H., Nozawa, S.R., Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F., 2004. Differential gene expression on tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 exposed to crude oil. In: Behavior, physiology and toxicology interactions in fish; Proceedings of VI International Congress on the Biology of Fish, Manaus, Brasil, August 1-6, Sloman, K., Wood, C. & MacKinlay, D. (Eds), pp 13-17.
- Lorenzen, K., 1996. The relationship between body weight and natural mortality in juvenile and adult fish: a comparison of natural ecosystems and aquaculture. *Journal of Fish Biology* 49 (4): 627-647.
- Lotufo, G.R. & Fleeger, J.W., 1996. Toxicity of sediment associated pyrene and phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: tubificidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (9): 1508-1516.
- Matsuo, A.Y.O., Duarte, R.M., Wooding, B.R., Stegeman, J.J. & Val, A.L., 2004a. Unidirectional Na⁺ flux and CYP1A immunohistochemistry in *Hyphessobrycon erythrostigma* exposed to a surfactant and to crude oil. In: Behavior, physiology and toxicology interactions in fish; Proceedings of VI International Congress on the Biology of Fish, Manaus, Brasil, August 1-6, Sloman, K., Wood, C. & MacKinlay, D. (Eds), pp 19-23.
- Matsuo, A.Y.O., Wooding, B.R., Stegeman, J.J. & Val, A.L., 2004b. CYP1A induction in tambaqui exposed to petroleum hydrocarbons and dissolved organic matter. In:

- Behavior, physiology and toxicology interactions in fish; Proceedings of VI International Congress on the Biology of Fish, Manaus, Brasil, August 1-6, Sloman, K., Wood, C. & MacKinlay, D. (Eds), pp 7-11.
- Mckee, M.J., Hendricks, A.C. & Ebel, R.E., 1983. Effects of naphthalene on benzo[a]pyrene hydroxylase and cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic toxicology* 3 (2): 103-114.
- McKinney, M.A., Arukwe, A., De Guise, S., Martineau, D., Béland, P., Dallaire, A., Lair, S., Lebeuf, M. & Letcher, R.J., 2004. Characterization and profiling of hepatic cytochromes P450 and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence River Estuary and the Canadian Arctic. *Aquatic Toxicology* 69: 35-49.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L. & Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 143: 79-165.
- Mendes, F.A. & Val, A.L., 1997. Effect of crude oil on the hematological parameters and on ionic imbalance in *Lipossarcus pardalis* (Siluriformes, Loricariidae). In: *Biology for Tropical Fishes. International Symposium. Manaus, Brasil, Outubro 6-9*, pp 119.
- Mommsen, T.P., 1998. Growth and Metabolism. In: Evans, D.H. (Ed.). *The physiology of fishes*. 2 Ed. CRC. Florida, pp. 65-97.
- Morea, L., 1997. Análisis del procedimiento para la determinación de la dl50 dosis letal media) a través del método de Probit en un bioensayo. www.monografias.com/trabajos14/dosis-letal/dosis-letal.shtml. acessado em 24/11/2004.

- Moreau, C.J., Klerks, P.L. & Haas, C.N., 1999. Interaction between phenanthrene and zinc in their toxicity to the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). Arch. Environ. Contamin. Toxicol. 37 (2): 251-257.
- Mori, P.L.A., 1999. Determinação das exigências protéico-calóricas de alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae). Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus – Amazonas. 152p.
- Netto, A.D.P., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira, A.S. & Barck, J., 2000, Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): Uma revisão metodológica. Química Nova 23 (6): 765-773.
- NJDHSS (New Jersey Department of Health and Senior Services), 1999. Hoja informativa sobre substancias peligrosas. Fenantreno. www.state.nj.us/health/eoh/odisweb/.
- Ogata, M. & Miyake, Y. 1979. Disappearance of aromatic hydrocarbons and organic sulfur compounds from fish flesh reared in crude oil suspension. Water Research 13: 75-78.
- Oliveira, C.P.F., 2003. Efeito de dois metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am. Sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus – Amazonas. 67p.
- Paula-Silva, M.N., Chagas, C.D., Costa, C.O.N., Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F., 2002. The effects of petroleum on three species of the Amazon: pirarucu, tambaqui and boari. In: Tropical Fish. News and Reviews; Proceedings of the International Congress on the

- Biology of Fish, Vancouver, B.C. Canada, Julho 22-25, Val, A. & Mac Kinlay, D. (Eds), pp 61-64.
- 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, 264p.
- Parke, D.V., 1981. Cythochrome P-450 and the detoxication of environmental chemicals. *Aquatic toxicology* 1 (5-6): 367-376.
- Poirier, A., Baudin L., F., Bodennec, G. & Quentel, C., 1986. Experimental poisoning of the rainbow trout, (*Salmo gairdneri*) Richardson, by engine diesel-oil: mortalities, haematological changes, histology. *Aquaculture* 55 (2), 115-137.
- Rogers, J.T., Richards, J.G. & Wood, C.M., 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 64 (2): 215-234.
- Rowe, D.W., Sprague, J.B. & Heming, T.A., 1983a. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery. I. Chronic toxicity to flagfish. *Aquatic Toxicology* 3 (2): 149-159.
- Rowe, D.W., Sprague, J.B. Heming, T.A., & Brown, I.T., 1983b. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery. II. Growth of rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 3 (2): 161-169.
- Sabourin, T.D., 1982. Respiratory and circulatory responses of the blue crab to naphthalene and the effect of the acclimation salinity. *Aquatic Toxicology* 2 (5-6): 301-318.
- Santos, T.C.A., Ngan, P.V., Gomes V., Passos, M.J. & Campos D.Y.F., 2004. Histological alterations in the gills of *Trachinotus carolinus* (Carangidae) exposed to naphthalene. In: Behavior, physiology and toxicology interactions in fish; Proceedings of VI

- International Congress on the Biology of Fish, Manaus, Brasil, August 1-6, Sloman, K., Wood, C. & MacKinlay, D. (Eds), pp 31-40.
- Schwartz, E., Trinh, S.V. & Scow, K.M., 2002. Impact of methylene chloride on microorganisms and phenanthrene mineralization in soil. *Journal of Environmental Quality* 31: 144-149.
- Sima-Álvarez, R., Mejía-Muñoz, M., Rodríguez-Serna, M. & Güemez-Ricalde, J., 2001. Determinación de la concentración letal media (CL50) y efecto histopatológico del permanganato de Potasio, en renacuajos de rana toro *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). *Universidad y Ciencia* 17 (34): 65-72.
- Speer, S.A., Semenza, J.C. & Kurosaki, T., 2002. Risk factors for acute myeloid leukemia and multiple myeloma: a combination of GIS and case-control studies. *Journal of environmental health* 64 (7): 9-16.
- Sprague, J.B., 1990. Aquatic toxicology. In: Schrech, C.B., Moyle, P.B. (Eds). *Methods for fish biology*. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA. pp 491-528.
- Stegeman, J.J., Klotz, A.V., Woodin, B.R. & Pajor, A. M., 1981. Induction of hepatic cytochrome P-450 in fish and the indication of environmental induction in scup (*Stenotomus chrysops*). *Aquatic toxicology* 1 (3-4): 197-212.
- Swartz, R.C., Ferraro, S.P., Lamberson, J.O., Cole, F.A., Ozretich, R.J., Boese, B.L., Schults, D.W., Donald, W., Berenfeld, M. & Ankley, G.T., 1997. Photoactivation and toxicity of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons compounds in marine sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (10): 2151-2157.
- Talley, J., Ghosh, U. & Luthy, R., 2001. Availability and biotreatment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. In: *Advances in bioremediation of contaminants*

- sediments-I. Abstracts of the 17th Annual International Conference on Soils, Sediments and Water. University of Massachusetts. Amherst, October, 22-24.
- Thurston, R., Russo, R. & Smith, C., 1978. Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat trout fry. *Transactions of the American Fisheries Society* 107 (2): 361-368.
- Thurston, R., Russo, R. & Phillips, G., 1983. Acute toxicity of ammonia to fathead minnows. *Transactions of the American Fisheries Society* 112: 705-711.
- Toyohashi University of Technology/ Japan. 2001. Phenanthrene. Jinno Laboratory, School of Materials Science. www.chrom.tutms.tut.ac.jp/jinno/database/05phenanthrene.html.
Acessado em 12/01/2006.
- Val, A.L., 1997. The effects of Urucu crude oil on respiratory aspects of fish of the Amazon. In: *Biology for Tropical Fishes. International Simposium. Manaus, Brasil, Outubro 6-9*, pp 107.
- 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. Inpa. Manaus*, pp. 277-291.
- Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F., 2004. Crude oil, copper and fish of the Amazon. In: *Behavior, physiology and toxicology interactions in fish; Proceedings of VI International Congress on the Biology of Fish, Manaus, Brasil, August 1-6*, Sloman, K., Wood, C. & MacKinlay, D. (Eds.), pp 1-6.
- Van Hoof, P.L., Kukkonen, J.V. & Landrum, P.F., 2001. Impact of sediment manipulation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons from field-contaminated and laboratory-dosed sediments by an oligochaeta. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (8): 1752-1761.

- Walker, M.K. & Peterson, R.E., 1991. Potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners, relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 21 (3-4): 219-237.
- Walker, M.K., Hufnagle, L.C.Jr., Clayton, M.K. & Peterson, R.E., 1992. An egg injection method for assessing early life stage mortality of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 22 (1): 15-37.
- Wilcke, W., Krauss, M. & Lilienfein, J., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage in a typical cerrado of the Brazilian savanna. *Journal of Environmental Quality* 33 (3): 946-955.
- Yang, Y., Zhang, X.X. & Korenaga, T., 2002. Distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in the soil of Tokushima, Japan. *Water, Air and Pollution* 138: 51-60.
- Zhu, D., Herbert, B.E. & Schautman, M.A., 2004. Cation- π bonding: a new perspective on the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to mineral surfaces. *Journal of Environmental Quality* 33 (4): 1322-1330.