



**Universidade Federal do Amazonas**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Departamento de Apoio à Pesquisa**  
**Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica**

---



**Estudo dos mecanismos osmorregulatórios da arraia de água doce, *Potamotrygon* sp. durante o transporte**

Bolsista: Tatiane Ribeiro Teixeira, CNPq.

**Manaus**  
**2010**



**Universidade Federal do Amazonas**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Departamento de Apoio à Pesquisa**  
**Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica**



---

**RELATÓRIO FINAL**  
**PIB-B/0021/2009**

**Estudo dos mecanismos osmorregulatórios da arraia de água doce,**  
***Potamotrygon* sp. durante o transporte**

---

Bolsista: Tatiane Ribeiro Teixeira

---

Orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

**Manaus**  
**2010**

## RESUMO

As arraias de água doce da família Potamotrygonidae têm um papel singular no cenário internacional com finalidade ornamental. A espécie *Potamotrygon* sp. (arraia cururu, espécie nova) representa 35% do total comercializada. Um dos pontos críticos da exportação é a elevada taxa de mortalidade pós-captura devido ao estresse pelo transporte. Portanto, este estudo analisou os efeitos do transporte sobre as variáveis osmorregulatórias (concentração dos íons, uréia, proteínas totais e albumina plasmáticos, além da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase branquial e renal) da arraia cururu capturada em duas importantes áreas de pesca (Rio Itu e Rio Cuiuni). Esta arraia foi conduzida em monoblocos (com 10 litros de água) por meio de três procedimentos de transporte: com renovação parcial (2/3) da água, com adição de sal (5 g/l) e sem renovação da água. As arraias foram capturadas nos Rios Cuiuni e Itu, e, em seguida, transportadas por 6 e 12 horas, respectivamente, até ao município de Barcelos. Observou-se que os procedimentos realizados na água durante transporte não afetam os processos fisiológicos desta espécie. Porém, as principais alterações ocorreram em função do tempo de transporte (ou confinamento). As arraias capturadas no Rio Itu (12 horas) apresentaram uma redução significativa na [K<sup>+</sup>], [proteínas totais] e [globulinas totais] plasmáticos. Observou-se ainda um aumento significativo nas atividades da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase branquial e renal. Não foram observadas alterações fisiológicas significativas nas arraias transportadas a partir do Rio Cuiuni (6 horas). Animais mantidos por muito tempo (12 horas) nos monoblocos durante o transporte perdem eletrólitos, e, possivelmente apresentam um quadro de imunossupressão.

**Palavras-chave:** osmorregulação, mortalidade pós-captura, Potamotrygonidae, Rio Negro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A importância econômica e o problema da mortalidade pós-captura	1
1.2. Características fisiocológicas da arraia cururu ( <i>Potamotrygon</i> sp.)	2
1.3. Os efeitos do confinamento sobre fisiologia	3
2. OBJETIVOS	6
3. HIPÓTESES	7
4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	8
4.1. Locais de captura	8
4.2. Delineamento experimental	10
4.3. Coleta das amostras de tecido	11
4.4. Procedimentos analíticos	12
4.5. Análise da atividade específica da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase branquial e renal	13
4.6. Análises estatísticas	14
4. RESULTADOS	14
4.1. Características físicas e químicas da água	14
4.2. Composição química do plasma	17
4.3. Atividade da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	19
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
8. CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES	28

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de médias  $\pm$  erros padrão do peso (g), largura de disco (LD - cm) das arraiais *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) utilizadas nos grupos experimentais 6 horas (Rio Cuiuni) e 12 horas (Rio Itu). **12**
- Tabela 2.** Média $\pm$ desvio padrão das variáveis físicas e químicas (pH, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos -TDS, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, íon sódio - [Na<sup>+</sup>] e íon potássio - [K<sup>+</sup>]) da água entre os grupos experimentais (renovação, sal e sem renovação) utilizados para transportar as arraiais cururus (*Potamotrygon* sp.) das áreas de pesca (Rio Cuiuni, 6 horas e Rio Itu, 12 horas). **16**
- Tabela 3.** Valores médios $\pm$ desvio padrão de eletrólitos (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>+2</sup>) e uréia do plasma das arraiais dos grupos experimentais 6 e 12 horas, dos animais coletados no Rio Cuiuni e Itu, respectivamente do Médio Rio Negro. **17**

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Exemplar de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) da região de Barcelos, Médio Rio Negro. **8**
- Figura 2.** Representação das áreas de captura das arraias na região do Médio rio Negro, Arquipélago de Mariuá. Rio Itu (quadrado) e Rio Cuiuni (círculo escuro). O entreposto de comercialização das arraias é a cidade de Barcelos, AM (triângulo). **9**
- Figura 3.** Tanque-rede utilizado para aclimatização (24 a 48 horas) das arraias capturadas. **9**
- Figura 4.** Lesão ventral provocada pelo ferrão caudal (seta escura) e pelo abrasamento no substrato (seta clara) devido ao adensamento das arraias nos monoblocos. **15**
- Figura 5.** **A)** Valores médios ( $\pm$ erro padrão) da  $[K^+]$ , **B)** proteínas totais, **C)** albumina e **D)** concentração de globulinas totais plasmáticas nos exemplares de *Potamotrygon* sp. **18**
- Figura 6.** Percentual de aumento nos níveis de albumina plasmática em resposta ao confinamento/adensamento das arraias transportadas durante 6 (barras escuras) e 12 horas **19**
- Figura 7.** **A.** Níveis da atividade específica da  $Na^+/K^+$ -ATPase ( $\mu$ moles Pi/mg proteína/h) nas brânquias; e **B.** rins das arraias coletadas no Rio Cuiuni e Rio Itu **20**

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Grupo de Pesquisa em Microscopia Quantitativa da UFAM/CNPq e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Este trabalho foi financiado pelo Programa PIPT/FAPEAM (Proc. 022/2008) “*Avaliação dos processos osmorregulatórios nas arraias de água doce (Potamotrygonidae): procurando mecanismos para reduzir a mortalidade pós-captura*”, bem como pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas – PIBIC/UFAM.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A importância econômica e o problema da mortalidade pós-captura

As arraias de água doce da família Potamotrygonidae têm um papel singular no cenário internacional como peixes ornamentais. A demanda mundial gira em torno de 30.000 a 50.000 unidades/ano (ARAÚJO, 1998). De acordo com esta autora, países como o Brasil, Colômbia, Peru, Bolívia e Venezuela estão entre os principais países exportadores. Do outro lado, os Estados Unidos, a comunidade europeia e os países asiáticos como a China, Taiwan, Japão e Singapura figuram como os principais mercados internacionais. No Brasil, estima-se que foram exportados cerca de 130 mil exemplares vivos nos últimos dez anos. Somente em 2009, os Estados do Amazonas e Pará exportaram 20.600 arraias vivas (Instrução Normativa 204/2008 do IBAMA). Segundo Inomata *et al.* (2009), as espécies mais exportadas entre 1998 a 2008 foram: *Potamotrygon motoro* (37,5%), *Potamotrygon* sp., arraia cururu (34,2%), *P. schroederi* (12,8%) *P. orbignyi* (11,9%), *P. leopoldi* (2%) e *P. henlei* (1,6%). O Estado do Amazonas responde por 60% do total de espécies capturadas, sendo 95% delas capturadas no município de Barcelos. Nesta região, as arraias e vários teleósteos são capturados para fins de aquarofilia e servem como a única fonte de renda disponível para cerca de 1.000 famílias nas comunidades ribeirinhas (RINCÓN & CHARVET-ALMEIDA, 2006).

Em toda a cadeia produtiva as arraias são comercializadas por unidade (ARAÚJO, 1998). Nas áreas de pesca, o preço é único e independe da espécie. No mercado internacional, o preço depende do mercado, da procedência do animal, do risco de mortalidade durante o transporte e do padrão de coloração (DUNCAN, 2008). A mortalidade pós-captura é um dos pontos críticos da exportação. Os principais problemas visíveis devido ao estresse pelo transporte são: perda de coloração, lesões

ventrais e a morte dos animais. Nas áreas de pesca, a taxa de mortalidade pós-captura é extremamente alta. As estimativas feitas por Araújo (2004) relatam que 5% a 12% das arraias comercializadas no Rio Negro morrem durante o transporte (confinadas em monoblocos ou no fundo das canoas). Porém, a sensibilidade ao estresse é espécie-específica. Por exemplo, a arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) é a mais rústica (apenas 5% dos exemplares morrem), enquanto *P. schroederi* é a mais vulnerável (12% morrem durante o transporte).

Em geral, os elasmobrânquios são extremamente vulneráveis à exploração pesqueira em larga escala (COMPAGNO & COOK, 1995). A maioria dos potamotrigonídeos possui baixa fecundidade uterina (1-4 embriões). Além disso, os aspectos reprodutivos dos potamotrigonídeos estão intimamente relacionados ao ciclo hidrológico (CHARVET-ALMEIDA *et al.*, 2005). Indubitavelmente, a elevada taxa de mortalidade devido ao manejo inadequado representa um grande problema para as atividades conservacionistas do grupo, portanto, isto requer ações emergenciais para minimizar os impactos negativos sobre este valioso recurso biológico.

## **1.2. Características fisioecológicas da arraia cururu (*Potamotrygon* sp.)**

A arraia cururu (*Potamotrygon* sp., espécie nova) é uma espécie endêmica do Arquipélago de Mariuá, Médio Rio Negro na região Barcelos (Amazonas). Esta arraia é encontrada preferencialmente nas águas ácidas, estagnadas com foliços submersos nas áreas de igapó (ARAÚJO, 1998; DUNCAN, 2008). Este padrão de distribuição espacial pode ser o resultado das diferentes estratégias ecológicas (SHIBUYA *et al.*, 2009; DUNCAN & FERNANDES, no prelo *a*), dos processos osmorregulatórios (DUNCAN *et al.*, 2009) e organização morfológica do epitélio branquial nesta espécie (DUNCAN *et al.*, 2010). A arraia cururu possui uma organização incomum (estrutura folicular) das

células cloreto ricas em  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA-MRCs) responsáveis pelos mecanismos de tomada de íons da água (DUNCAN *et al.*, no prelo *b*). Os demais potamotrigonídeos do Rio Negro (por exemplo, *P. schroederi*, *P. motoro*, *P. orbignyi* e *Paratrygon aiereba*) possuem NKA-MRCs distribuídas isoladamente (porém, em alta densidade) na região lamelar das brânquias (DUNCAN *et al.*, 2010). Não se sabe se estas diferenças morfológicas estão relacionadas às diferentes sensibilidades (ou plasticidade fenotípica) de cada espécie para tolerar mudanças bruscas na qualidade da água. Como foi dito anteriormente, a arraia cururu é mais rústica que as demais espécies de potamotrigonídeos do Rio Negro.

### **1.3. Os efeitos do confinamento sobre fisiologia**

O estudo dos mecanismos da regulação iônica nas arraias é uma poderosa ferramenta para reduzir a taxa de mortalidade pós-captura. A retirada do peixe de seu habitat quebra o delicado equilíbrio entre o animal e o ambiente. Ao contrário das formas marinhas, os potamotrigonídeos possuem composição química do sangue e mecanismos osmorregulatórios similares aos teleósteos de água doce (GERST & THORSON, 1977; BITTNER & LANG, 1980; WOOD *et al.*, 2002; DUNCAN *et al.*, 2009). Além disso, estes animais são amoniotélicos e excretam 91% nitrogênio como amônia (WOOD *et al.*, 2002). Sob condições de confinamento, a amônia se acumula e alcaliniza a água. Na forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) penetra nas biomembranas e se acumula no sangue. No organismo, a amônia exerce efeitos neurotóxicos e compromete o metabolismo dos aminoácidos e neurotransmissores excitatórios (WRIGHT, 1995). Em pH ácido (a exemplo das águas do Rio Negro), a amônia existe principalmente como amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). O  $\text{NH}_4^+$  pode substituir tanto o  $\text{Na}^+$  quanto o  $\text{K}^+$  afetando a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (TOWLE & HOLLELAND, 1987), do  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (GOOD *et al.*,

1984) e do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (KINSELLA & ARONSON, 1981). Portanto, é provável que a renovação parcial da água durante o transporte possa evitar o acúmulo de amônia, e, conseqüentemente, reduzir os efeitos tóxicos diretos e indiretos deste composto.

Caso a água não seja renovada, as bactérias nitrificantes reduzem a amônia acarretando numa diminuição do teor de oxigênio dissolvido e acelerando o quadro de hipóxia ambiental (HARGREAVES, 1998). Além disso, a nitrificação poderá formar outro composto tóxico, o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). No Rio Negro, este processo pode ser agravado devido à elevada temperatura da água.

De acordo com Aucour *et al.* (2003), as águas do Rio Negro possuem baixo teor de  $\text{Cl}^-$  ( $<13\mu\text{moles/l}$ ). Baixas concentrações de  $\text{Cl}^-$  potencializam os efeitos do  $\text{NO}_2^-$ , pois o transporte de  $\text{NO}_2^-$  pelas brânquias segue a mesma rota de tomada de  $\text{Cl}^-$  (WILLIANS & EDDY, 1986). Segundo estes autores, espécies que apresentam baixo influxo de  $\text{Cl}^-$  são menos sensíveis ao envenenamento por nitrito. O influxo de  $\text{Cl}^-$  em *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) foi estimado em  $950\mu\text{mol/kg/h}$ , isto é, quase o dobro dos valores observados para teleósteos do Rio Negro (Wood *et al.*, 2002). Nesse contexto, as arraias podem ser mais sensíveis à intoxicação pelo nitrito acumulado na água que os teleósteos. Se o cloreto reduz a toxicidade do nitrito, a adição de NaCl na água poderá ser uma solução alternativa para minimizar a toxicidade do nitrito. É importante salientar que tal medida ainda é praticada por alguns pescadores da região de Barcelos para transportar peixes ornamentais. Entretanto, a quantidade de sal adicionada é determinada de maneira empírica. Segundo Alam & Frankel (2006), normalmente, 5 g/l de NaCl é adicionado na água durante as condições de transporte para reduzir o estresse pela amônia, bem como medida profilática. No entanto, estes mesmos autores relatam que a adição de NaCl 5 g/l provoca um aumento na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial em duas espécies de perca *Bidyanus bidyanus* e *Macquaria ambigua*

criadas em tanques de cultivo. A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) é uma bomba eletrogênica que impulsiona a maioria dos sistemas de transporte iônico branquial (MARSHAL & BRYSON, 1998). Como nos demais peixes, esta enzima exerce um papel crucial para os processos osmo-ionorregulatórios dos elasmobrânquios (EVANS *et al.*, 2004). A atividade da NKA renal dos potamotrigonídeos que vivem nas águas ácidas e diluídas do Rio Negro é relativamente elevada. Segundo DUNCAN *et al.* (2009), os rins dos potamotrigonídeos que vivem no Rio Negro possuem um alto potencial eletrogênico para reabsorver íons e evitar perdas excessivas para o meio.

As brânquias são os sítios de tomada de íons, transporte de gases e excreção de amônia. O papel dos hormônios de estresse na osmorregulação é complexo. Os corticoesteróides podem estimular a proliferação de células ricas em mitocôndrias (MRC) nas lamelas branquiais (McCORMICK, 1995). A proliferação de MRC leva ao aumento da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e na concentração de  $\text{Na}^+$  plasmático em apenas 1 h de estresse salino em *Fundulus heteroclitus* (MARSHALL *et al.*, 1999).

Portanto, parece claro que as respostas hormonais afetam os processos osmo-ionorregulatórios em curto espaço de tempo. É importante mencionar, que as áreas de pesca no Rio Itu e Rio Cuiuni ficam 80 e 50 km distantes, respectivamente, do entreposto de venda em Barcelos; como os pescadores utilizam pequenos barcos (4 a 5 HP), as viagens para o Rio Cuiuni e Rio Itu duram normalmente 6 e 12 horas, respectivamente. Portanto, os fatores tempo-resposta e dose-resposta podem agir sinergicamente e comprometer ainda mais o delicado equilíbrio osmorregulatório entre o animal e água.

## 2. OBJETIVOS

Este estudo analisou os efeitos do estresse sobre os processos osmorregulatórios de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) durante o transporte. A arraia cururu é a principal espécie de arraia (Potamotrygonidae) capturada no município de Barcelos, Médio rio Negro (Amazonas) a partir de duas importantes áreas de pesca (rio Cuiuni e rio Itu). Além disso, comparam-se os diferentes protocolos metodológicos praticados pelos pescadores de arraias de água doce na bacia do Rio Negro.

Os protocolos metodológicos para o transporte das arraias foram:

- a) transporte em monoblocos com renovação da água;
- b) transporte em monoblocos com adição de sal (NaCl);
- c) transporte em monoblocos sem renovação da água.

Os principais aspectos analisados foram:

- Quantificação das alterações na qualidade da água (íons, concentração de oxigênio, pH, temperatura e salinidade) durante o transporte;
- Avaliação das alterações na composição/concentração química (íons, proteínas totais, albumina, globulinas e osmolalidade e uréia) do plasma de *Potamotrygon* sp. durante o transporte;
- Análises dos efeitos do estresse pelo transporte sobre a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial e renal de *Potamotrygon* sp.

### 3. HIPÓTESES

#### 3.1. Hipótese 1:

Hipótese nula ( $H_0$ ):

- Os protocolos metodológicos de transporte das arraias de água doce **não** afetam os processos osmorregulatórios das arraias de água doce;

Hipótese alternativa ( $H_a$ ):

- Os protocolos metodológicos de transporte das arraias de água doce **afetam** os processos osmorregulatórios das arraias de água doce;

#### 3.2. Hipótese 2:

Hipótese nula ( $H_0$ ):

- O local e o tempo de transporte das arraias de água doce **não** afetam os processos osmorregulatórios das arraias de água doce;

Hipótese alternativa ( $H_a$ ):

- O local e o tempo de transporte das arraias de água doce **afetam** os processos osmorregulatórios das arraias de água doce;

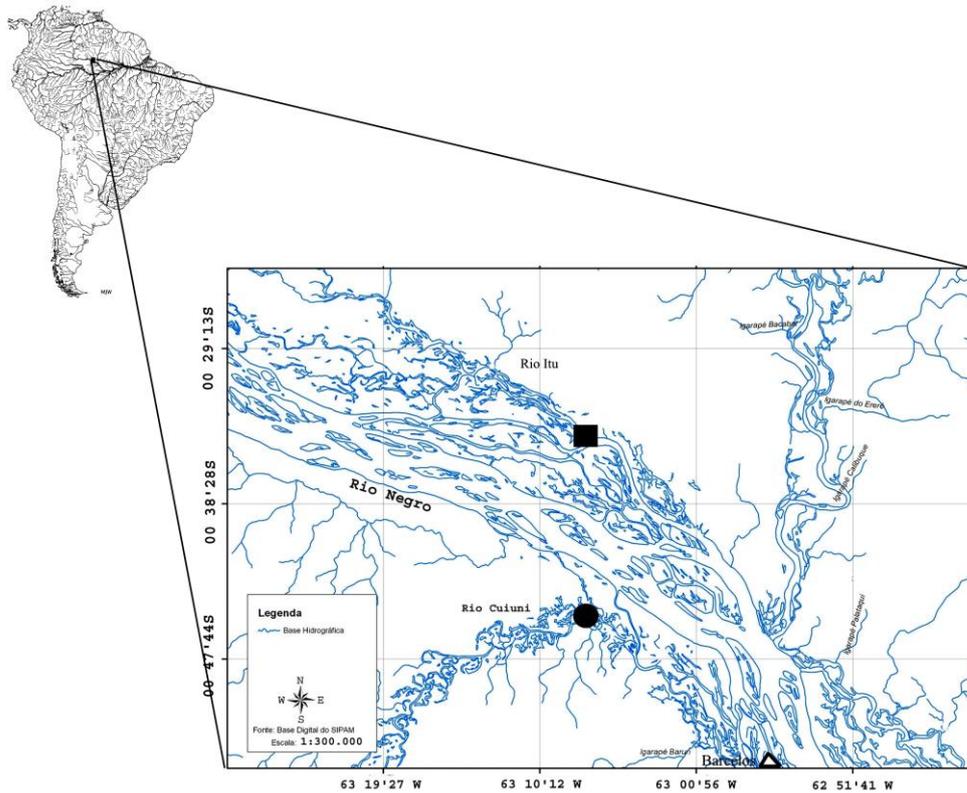
## 4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 4.1. Locais de captura

Os exemplares juvenis de *Potamotrygon* sp. (Fig. 1) foram capturados com o auxílio de rapichés em duas importantes áreas de pesca de peixes ornamentais, no Município de Barcelos (Estado do Amazonas) no Rio Cuiuni (S00°44'99"/W63°08'06") e Rio Itu (S00°30'62"/W63°14'44") (Fig. 2). Em ambas as áreas de pesca, após a captura os animais foram mantidos em tanques redes por 24 a 48 horas para a aclimatização (na água do próprio rio) (Fig. 3). De cada local de coleta, as variáveis físicas e químicas (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, sólidos totais dissolvidos e condutividade elétrica) da água no local de captura de cada animal foram determinadas por meio de um analisador multi-parâmetro (CONSORT C535). Amostras de água também foram armazenadas em baixa temperatura para quantificação da concentração de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>.



**Figura 1.** Exemplar de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) da região de Barcelos, Médio Rio Negro.



**Figura 2.** Representação das áreas de captura das arraias na região do Médio rio Negro, Arquipélago de Mariuá. Rio Itu (quadrado) e Rio Cuiuni (círculo escuro). O entreposto de comercialização das arraias é a cidade de Barcelos, AM (triângulo).



**Figura 3.** Tanque-rede utilizado para aclimatização (24 a 48 horas) das arraias capturadas.

## 4.2. Delineamento experimental

Os efeitos do estresse durante o transporte a partir de duas importantes áreas de pesca (Rio Cuiuni e Rio Itu) até ao município de Barcelos (AM) foram avaliados conforme protocolo experimental descrito abaixo. Após a captura e aclimatização (como descrito anteriormente), exemplares de cada espécie de arraia foram divididos em 3 grupos experimentais. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados (aleatórios). Em todos os grupos foram mantidas 3 arraias por monobloco sendo 3 monoblocos para cada grupo experimental (três repetições). Também foi mantida a biomassa/monobloco. Os tratamentos experimentais foram:

- Grupo 1: as arraias foram transportadas em caixas plásticas (monoblocos de 80x50x30 cm) com 10 litros de água, conforme os métodos convencionais praticados pelos pescadores da região de Barcelos, isto é, sem renovação de água;

- Grupo 2: os exemplares foram transportados nas mesmas condições do grupo 1, porém, com adição de sal de cozinha (5 g/l, conforme ALAM & FRANKEL, 2006);

- Grupo 3: os animais foram transportados de maneira similar ao grupo 1, porém com renovação parcial (2/3) do volume água dos monoblocos a cada 2 horas.

Estes procedimentos de transporte foram adotados para as arraias capturadas e transportadas a partir de duas importantes áreas de pesca da região de Barcelos: Rio Cuiuni (6 horas) e Rio Itu (12 horas).

É importante salientar que o período de transporte a partir de cada área de pesca foi baseado no tempo médio de viagem realizado por meio de um barco a motor rabeta (4 a 5 HP) típico da região de Barcelos. Os itinerários das viagens também foram os mesmos adotados pelos pescadores locais. Informações obtidas com os pescadores artesanais daquela região, o tempo médio da viagem da área de pesca no Rio Itu à Barcelos dura cerca de 12 horas, enquanto do Rio Cuiuni à Barcelos tem duração de 6

horas. Nenhum dos grupos experimentais foi considerado grupo controle, pois os três procedimentos ainda são praticados de maneira aleatória pelos pescadores artesanais daquela região, muito embora, a maioria deles transporta as arraias sem o uso do cloreto de sódio e sem a renovação da água.

Durante todos os experimentos foram realizadas análises das variáveis físicas e químicas da água. Amostras de água foram armazenadas para análises posteriores dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ . As demais análises, bem como o depósito dos exemplares-testemunho foram realizadas no Laboratório de Morfologia Funcional da Universidade Federal do Amazonas.

#### **4.3. Coleta das amostras de tecido**

No final dos experimentos, os animais foram lentamente anestesiados em ácido 3-amino-benzóico etil éster (0,05g/L; MS-222, Sigma Chemical Co.) tamponado (Tampão fosfato 10 mM; pH 7,3). Após perder ligeiramente o equilíbrio motor, as arraias foram pesadas e medidas (Tabela 1). O sangue foi retirado por meio de punção cardíaca (seringas de 5 ml heparinizadas). O plasma foi imediatamente separado por centrifugação a 10.000 rpm e armazenado em  $\text{N}_2$ -líquido para posterior análise da composição química e osmolalidade. Além disso, De cada animal, uma brânquia e um rim foram imediatamente removidos e congelados em  $\text{N}_2$ -líquido com tampão SEI (sacarose 300 mM, EDTA 20 mM e imidazol 100 mM em pH 7,4) em para análises da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

**Tabela 1.** Valores de médias  $\pm$  erros padrão do peso (g), largura de disco (LD - cm) das arraiais *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) utilizadas nos grupos experimentais 6 horas (Rio Cuiuni) e 12 horas (Rio Itu).

Tratamento/tempo	Peso (g)	Largura de Disco (cm)
Grupo 1	6 horas	206,2 $\pm$ 55,6
	12 horas	16,3 $\pm$ 1,8
Grupo 2	6 horas	197,2 $\pm$ 44,1
	12 horas	16,8 $\pm$ 2,1
Grupo 3	6 horas	182,4 $\pm$ 70,8
	12 horas	16,3 $\pm$ 1,7
Grupo 2	6 horas	149,2 $\pm$ 46,2
	12 horas	15,9 $\pm$ 1,5
Grupo 3	6 horas	249,4 $\pm$ 31,9
	12 horas	17,1 $\pm$ 0,4
Grupo 1	6 horas	179,4 $\pm$ 15,0
	12 horas	15,5 $\pm$ 1,7

#### 4.4. Procedimentos analíticos

As análises das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , uréia, proteínas totais e albumina do plasma foram realizadas com um auxílio de um espectrofotômetro (Spectrum SP-2000). O método da orto-cresolftaleína em meio alcalino foi utilizado para determinar os teores do íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ , em mmol/l) em 570 nm (Kit laboratorial da DOLES Reagentes e Equipamentos S/A, Goiânia/GO). Os níveis de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) foram determinados em meio ácido na presença de sulfocianeto de mercúrio e nitrato férrico (Kit laboratorial da DOLES Reagentes e Equipamentos S/A, Goiânia/GO). O complexo corado foi analisado em 510 nm sendo proporcional à concentração de cloreto presente na amostra (mmoles/l). Para as análises dos níveis de uréia presente no plasma foi usado o método da urease (reação de Berthelot modificada) onde os íons de amônia reagem com salicilato e hipoclorito de sódio para formar um cromóforo verde (leitura realizada em 578 nm). A coloração é proporcional à concentração de uréia presente na amostra (Kit laboratorial da HUMAN DO BRASIL S/A, Itabira/MG). Os níveis de proteínas totais no plasma foram determinados por meio do método biureto modificado Kit laboratorial da HUMAN DO BRASIL S/A, Itabira/MG). O método se baseia na reação das

proteínas presentes do plasma desenvolvendo uma coloração roxa (leitura em 550 nm) que é proporcional à concentração protéica da amostra. A concentração de albumina no plasma foi obtida pelo método que se baseia no uso do verde de bromocresol que em pH 4,0 liga-se à albumina presente no plasma com mudança de coloração para verde Kit laboratorial da HUMAN DO BRASIL S/A, Itabira/MG). As concentrações dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram determinadas por fotometria de chama (Digimed Model DM-61).

#### **4.5. Análise da atividade específica da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial e renal**

As amostras dos arcos branquiais e dos rins foram armazenadas e congeladas em tampão SEI (sacarose 300 mM, EDTA 20 mmol, Imidazol 100 mmol, pH 7,4) para a análise da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Os homogeneizados foram preparados em baixa temperatura ( $\sim 4^\circ\text{C}$ ) usando um homogeneizador Dispensor Extratur (Quimis). Foram usadas sub-amostras dos homogeneizados para a determinação da quantidade de proteína presente (pelo método do biureto descrito anteriormente) e atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. As análises da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foram ensaiadas em tampão NaCl, 100 mM; MgCl, 5 mM; KCl, 13 mM; ATP, 3 mM e imidazol, 30 mm, em pH 7,4 incubados durante 30 min a  $25^\circ\text{C}$  em meios com e sem ouabaína (inibidor da enzima). A concentração do fosfato inorgânico (Pi) foi determinada na presença do sulfato ferroso usado como agente redutor. As leituras das amostras foram realizadas em  $\lambda 830$  nm. A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi definida como sendo a diferença entre a concentração de Pi na ausência e presença do inibidor da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (ouabaína). A concentração está expressa como atividade específica da enzima em  $\mu\text{moles de Pi/mg proteína/hora}$ .

#### **4.6. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico Systat v.12. Os dados estão descritos como média  $\pm$  desvio padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado inicialmente para analisar a distribuição normal dos dados. Uma análise de variância de dois critérios (two-way ANOVA, critérios: tratamento  $\times$  tempo) foi utilizada para analisar as diferenças e as interações entre os tratamentos (grupos experimentais: 1- com renovação da água; 2- adição de sal; 3- sem renovação da água) e os intervalos de tempo (Rio Cuiuni: 6 horas e Rio Itu: 12 horas). Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5% ( $P < 0,05$ ).

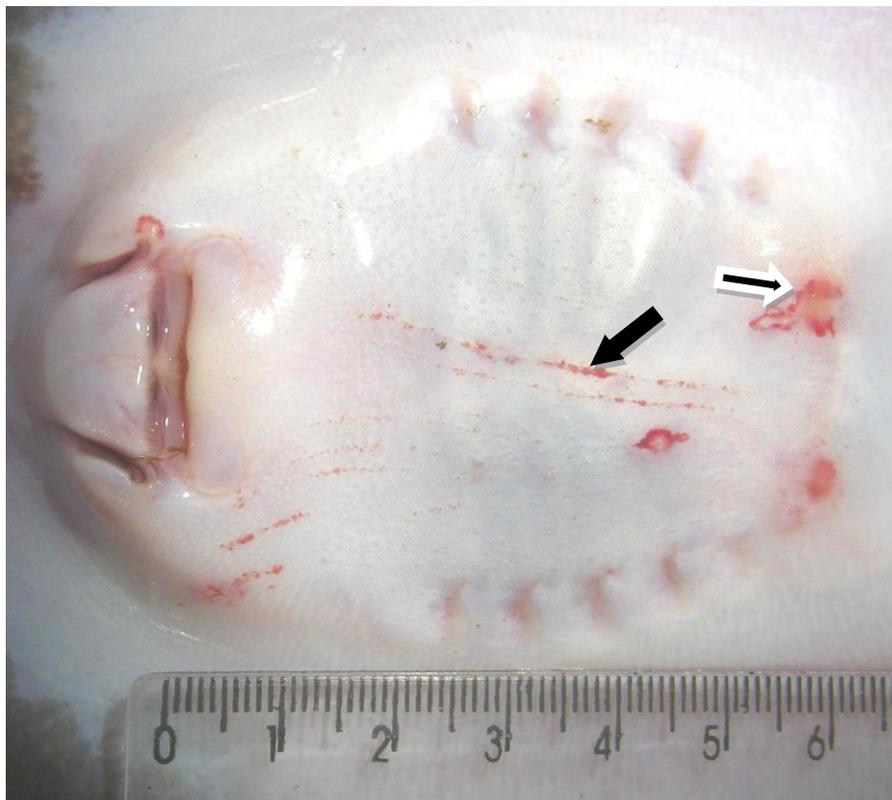
### **4. RESULTADOS**

#### **4.1. Características físicas e químicas da água**

Não houve mortalidade em nenhuma etapa dos experimentos. Apesar do cuidado ao manipular os espécimes, alguns exemplares demonstraram uma aparente agitação apenas no início dos experimentos. A agitação é tida como um aumento da atividade natatória. Este comportamento resulta numa série de lesões ventrais (Fig. 4) devido ao atrito com o substrato (abrasão mecânica), ou ainda, lesões perfurantes devido ao ferrão caudal. Cerca de 20% das arraiais apresentaram lesões ventrais devido ao atrito com o fundo plástico dos monoblocos.

A qualidade da água entre as repetições das unidades experimentais foi uniforme. No entanto, quando as arraiais permanecem confinadas nos monoblocos a qualidade da água é alterada durante o tempo de confinamento (Tabela 2). As principais alterações significativas ( $P < 0,05$ ) nos tratamentos entre o início e o final dos experimentos (tanto de 6 quanto de 12 horas) foram: aumento do pH, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos (TDS), concentração do íon sódio ( $[Na^+]$ ) e potássio

([K<sup>+</sup>]). No entanto, no final da exposição entre os diferentes procedimentos metodológicos de transporte as principais alterações observadas foram: aumento nos valores de pH da água das arraias mantidas na água com sal (5 g/l), aumento do TDS e dos teores de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> da água dos animais confinados nos monoblocos sem renovação da água tanto em 6 quanto em 12 horas. As alterações nos valores de TDS devem-se às alterações nas concentrações dos íons (Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>) da água, principalmente do íon Na<sup>+</sup>.



**Figura 4.** Lesão ventral provocada pelo ferrão caudal (seta escura) e pelo abrasamento no substrato (seta clara) devido ao adensamento das arraias nos monoblocos.

**Tabela 2.** Média±desvio padrão das variáveis físicas e químicas (pH, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos -TDS, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, íon sódio - [Na<sup>+</sup>] e íon potássio - [K<sup>+</sup>]) da água entre os grupos experimentais (renovação, sal e sem renovação) utilizados para transportar as arraias cururus (*Potamotrygon* sp.) das áreas de pesca (Rio Cuiuni, 6 horas e Rio Itu, 12 horas).

			pH	Condutividade ( $\mu$ S/cm)	TDS (g/l)	[O <sub>2</sub> ] (mg/l)	Temperatura (°C)	[Na <sup>+</sup> ] ( $\mu$ mol/l)	[K <sup>+</sup> ] ( $\mu$ mol/l)
Grupo 1	6 horas	Inicial	4,1±0,1	15,3±0,9	8,2±0,4	2,5±0,1	30,0±0,0	2,5±0,7	0,9±0,3
		Final	5,1±0,0*	20,6±0,4*	10,8±0,4*	2,2±0,1	29,0±0,0	9,5±0,7*	2,7±0,1*
	12 horas	Inicial	4,2±0,0	12,0±0,3	6,6±0,1	2,1±0,1	29,3±0,4	3,0±0,1	1,7±0,0
		Final	4,7±0,1	17,8±1,2*	9,5±0,6*	2,3±0,1	29,8±0,4	8,0±2,8*	2,3±0,1*
Grupo 2	6 horas	Inicial	4,7±0,2	4350,0±636,4	2300,0±282,8	1,5±0,1	30,3±1,1	7200,0±141,4	1175,0±135,4
		Final	5,5±0,0*	4990,0±452,5	2695,0±247,5	1,3±0,4	29,8±0,4	7465,0±49,5	1275,0±106,1
	12 horas	Inicial	4,6±0,1	5350,0±212,1	2895,0±120,2	1,3±0,2	30,5±0,7	7250,0±70,7	1225,0±135,4
		Final	5,9±0,0*	5600,0±141,4	2975,0±176,8	1,2±0,1	30,5±0,7	7550,0±212,1	1300,0±98,1
Grupo 3	6 horas	Inicial	4,2±0,1	13,6±2,1	6,6±0,1	1,7±0,2	29,5±0,7	3,0±0,1	0,8±0,1
		Final	6,2±0,5*	86,1±8,1*	45,6±4,5*	1,3±0,1	29,3±0,4	43,5±13,4*	5,5±0,6*
	12 horas	Inicial	4,2±0,0	11,9±0,3	6,6±0,3	1,2±0,1	29,5±0,7	3,5±0,7	0,9±0,4
		Final	4,5±0,3	38,9±4,6*	20,8±2,5*	1,1±0,1	29,8±0,4	14,5±4,9*	3,1±0,3*

## 4.2. Composição química do plasma

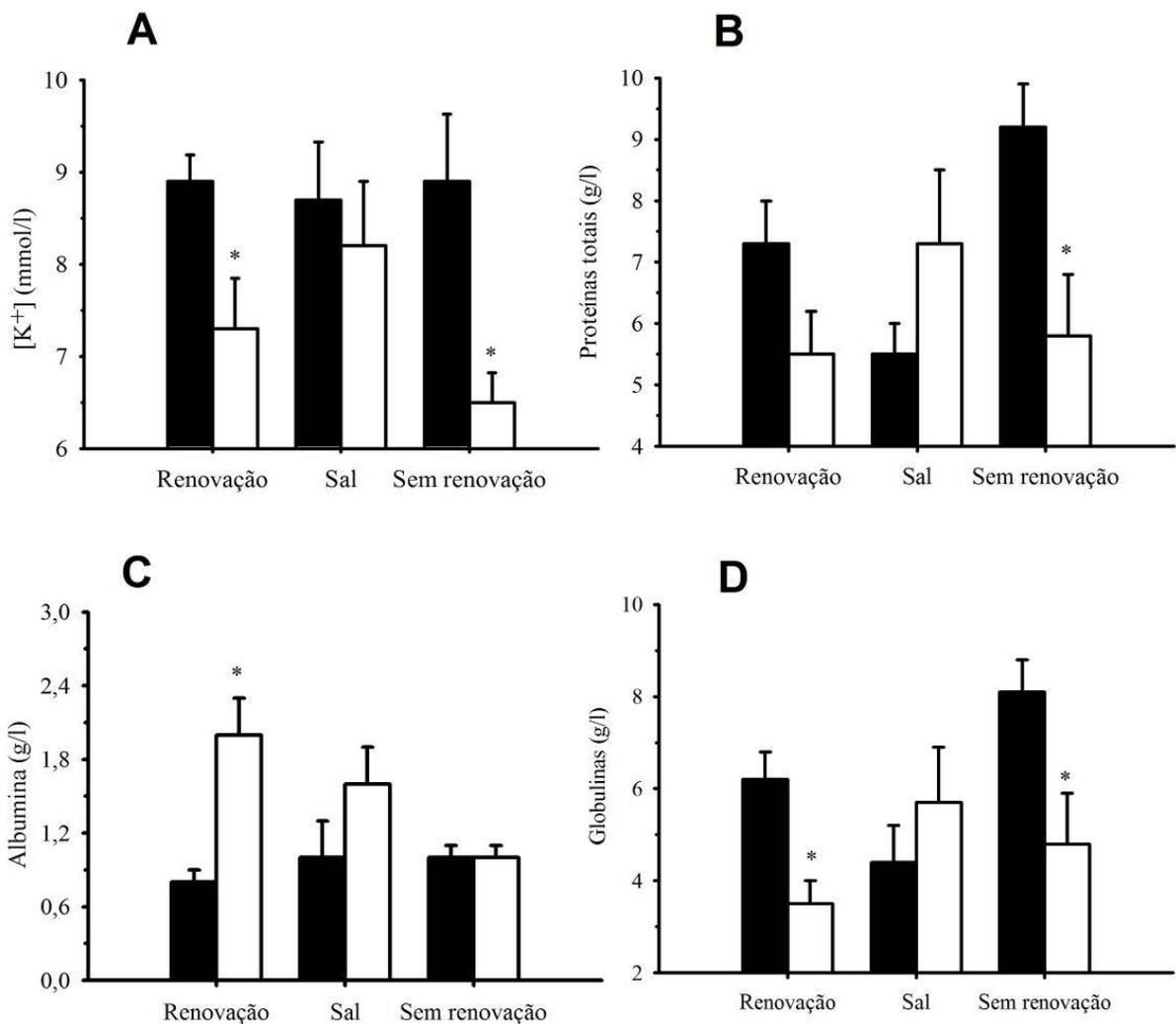
Não foram observadas alterações significativas nos teores dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , tampouco na relação  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  e concentração de uréia do plasma entre os tratamentos (procedimentos de transporte), bem como entre os tempos de local/tempo de transporte (Tabela 3). Também não foram observadas interações significativas entre o tempo de exposição (6 e 12 horas) e os procedimentos de transporte com renovação da água (grupo 1), transporte com sal na água (grupo 2) e transporte sem renovação da água (grupo 3).

**Tabela 3.** Valores médios±desvio padrão de eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) e uréia do plasma das arraias dos grupos experimentais 6 e 12 horas, dos animais coletados no Rio Cuiuni e Itu, respectivamente do Médio Rio Negro.

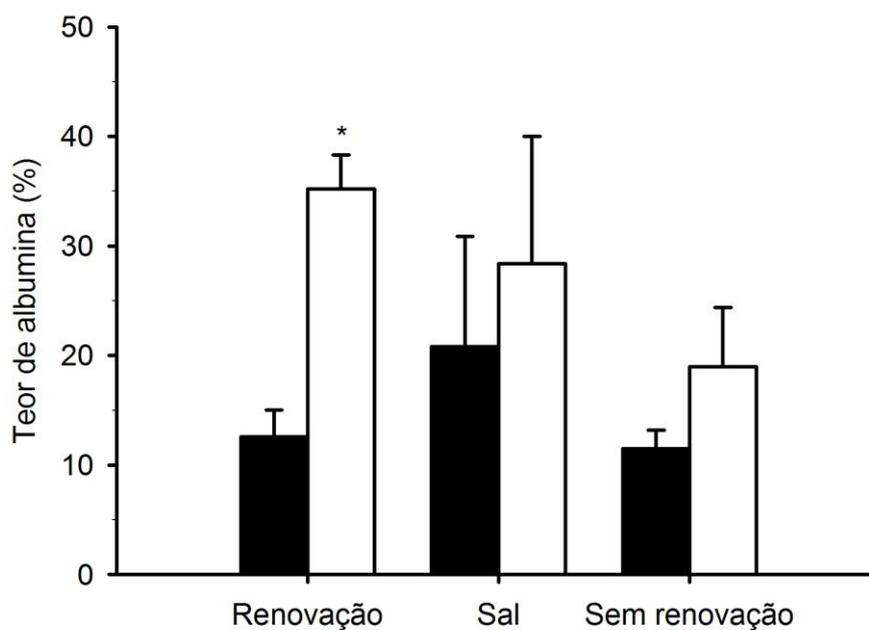
Variáveis	6 horas			12 horas		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
$\text{Na}^+$ (mmol/l)	355±34,6	354±44,4	372,8±34,4	340,2±16,1	348,8±44,0	327,8±11,7
$\text{Cl}^-$ (mmol/l)	119,6±6,6	126,6±7,2	113,9±6,6	120,2±9,1	114,6±5,3	116,8±7,7
$\text{Ca}^{2+}$ (mmol/l)	1,51±0,2	1,56±0,2	1,87±0,1	1,64±0,2	1,45±0,1	1,79±0,1
$\text{Na}^+/\text{Cl}^-$	3,0±0,4	2,8±0,4	3,3±0,5	2,8±0,1	3,1 ±0,5	2,8±0,2
Uréia (mM)	6,5±1,5	7,4±1,2	5,7±1,4	6,5±0,5	9,2±2,6	7,9±1,8

No entanto, alterações significativas foram observadas na concentração de  $\text{K}^+$ , proteínas totais e globulinas plasmáticas (Fig. 4). Observou-se uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) nos níveis de  $\text{K}^+$  e proteínas totais do plasma das arraias coletadas no Rio Itu e transportadas durante 12 horas nos monoblocos com e sem renovação de água (Fig. 5A,B). Nesta análise, observou-se ainda um efeito interativo entre tempo (12 horas) e os dois tratamentos experimentais (grupo 1 – com; e grupo 3 – sem renovação da água).

Por outro lado, observou-se um efeito interativo significativo entre tempo de exposição (12 horas) e o procedimento de transporte com renovação de água (grupo 1) sobre a concentração de albumina plasmática e globulinas totais. Neste tratamento (grupo 1 – com renovação da água), o aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos teores de albumina (Fig. 5C) provoca uma redução de mesma intensidade nos níveis das globulinas totais (Fig. 5D). A redução nos níveis de globulinas totais ocorreu de maneira proporcional ao aumento dos teores de albumina plasmática (Fig. 6).



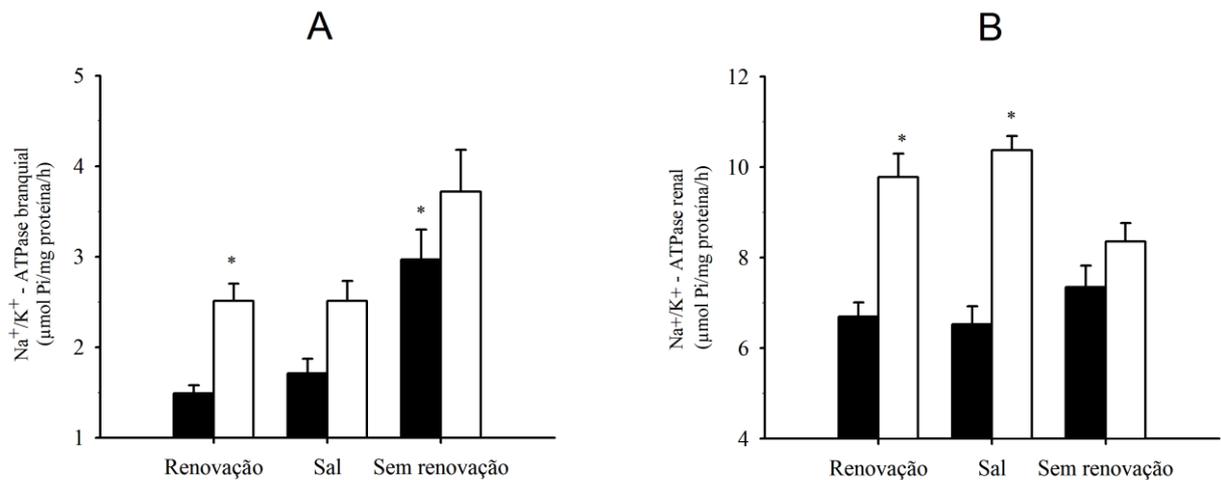
**Figura 5.** A) Valores médios ( $\pm$ erro padrão) da [K<sup>+</sup>], B) proteínas totais, C) albumina e D) concentração de globulinas totais plasmáticas nos exemplares de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) capturadas no Rio Cuiuni (transportadas por 6 horas – barras escuras) e Rio Itu (por 12 horas - barras claras) transportadas com renovação parcial da água (grupo 1), com adição de 5 g/l de sal (grupo 2) e sem renovação da água (grupo 3).



**Figura 6.** Percentual de aumento nos níveis de albumina plasmática em resposta ao confinamento/adensamento das arraias transportadas durante 6 (barras escuras) e 12 horas (barras claras) nos monoblocos com renovação de água.

#### 4.3 Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

Os efeitos do tempo e dos procedimentos de transporte sobre a atividade específica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial e renal estão apresentados na Figura 7. Nestes tecidos observou-se um efeito interativo do tempo de confinamento de 12 horas e os procedimentos de transporte com renovação parcial da água (grupo 1) e com adição de sal na água (grupo 2). Animais transportados por 12 horas em tais procedimentos apresentam um aumento (~2 vezes) significativo ( $P < 0,05$ ) nas atividades da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial (Fig. 7A) e renal (Fig. 7B).



**Figura 7. A.** Níveis da atividade específica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (µmoles Pi/mg proteína/h) nas brânquias; e **B.** rins das arraias coletadas no Rio Cuiuni e Rio Itu e transportadas por 6 (barras escuras) e 12 horas (barras claras), respectivamente, nos monoblocos com renovação de água (grupo 1), com adição de sal (grupo 2) e sem renovação da água (grupo 3).

## 5. DISCUSSÃO

O transporte de animais é uma das operações mais comuns no mercado de peixe ornamental. Porém, pouca atenção tem sido dada ao assunto. O tempo de transporte de organismos vivos tem duração variada dependendo da finalidade. Por exemplo, o tempo de viagem das principais áreas de pesca no sistema de rios, lagos, furos, paranás e igarapés do Rio Itu até ao município de Barcelos (Médio Rio Negro) dura cerca de 12 horas durante o período de safra (período da seca). Por outro lado, uma viagem das áreas de pesca no Rio Cuiuni dura apenas 6 horas. Após a triagem e posterior quarentena, as arraias são transportadas até Manaus numa viagem que dura cerca de 25 horas. Em todos os casos, os animais devem chegar em boas condições fisiológicas para satisfazer os rigorosos critérios do comprador final (URBINATI *et al.*, 2004). Além do confinamento nos monoblocos ou no fundo das canoas, as arraias capturadas na região de Barcelos passam por um período agudo e severo de adensamento. O adensamento ocorre em virtude do pequeno espaço no interior da embarcação (canoas). Os animais são

submetidos a um pequeno volume de água, e inevitavelmente são perfurados pelo ferrão caudal devido aos sucessivos encontros entre as arraias. Nos monoblocos plásticos, as lesões ventrais são sinais claros de estresse devido ao intenso vigor físico ocasionado pela atividade natatória e pelo comportamento de “enterrar-se” no substrato. Assim, a abrasão mecânica e as lesões ventrais pelo ferrão caudal são tidas como importantes precursores de respostas ao estresse. Como consequência do estresse pelo transporte, confinamento e adensamento, os animais aquáticos tornam-se susceptível às enfermidades e geralmente morrem (MORAES & MARTINS, 2004).

A adoção de boas práticas de manejo e transporte das arraias é ainda motivo de controvérsias (ALAM & FRANKEL, 2006; BRANDÃO *et al.*, 2006). Mesmo nas áreas de pesca da região de Barcelos diferentes protocolos de transporte são adotados pelos pescadores. A maioria transporta as arraias sem adicionar cloreto de sódio e sem renovar a água dos recipientes. No entanto, alguns pescadores usam o sal de cozinha de maneira empírica ou ainda renovam regularmente a água dos monoblocos durante o transporte.

Porém, o sal de cozinha pode ser considerado um insumo caro e supérfluo para esta atividade; além disso, trocar a água dos monoblocos durante o transporte é uma atividade que demanda tempo e esforço físico, uma vez que a pesca artesanal das arraias é uma atividade solitária e dispendiosa para os pescadores da região de Barcelos. O cloreto de sódio na concentração de 2,5 g/l é amplamente adicionado na água dos tanques de cultivo. Nas condições de transporte, adiciona-se 5 g/l para reduzir a toxicidade da amônia, além de servir como medida de profilaxia (ALAM & FRANKEL, 2006).

As arraias de água doce (da família Potamotrygonidae) osmorregulam de maneira similar aos teleósteos de água doce (THORSON, 1970; WOOD *et al.*, 2002;

DUNCAN *et al.*, 2009). As células do epitélio branquial, tais como as células cloreto contém um grande número de bombas iônicas (ATPases) capazes manter a homeostase iônica (EVANS *et al.*, 2004; EVANS *et al.*, 2005). A arraia cururu (*Potamotrygon* sp.) possui uma elevada densidade células cloreto ricas em  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no espaço interlamelar. Além disso, estas células organizam-se de maneira não usual formando um arranjo folicular relacionado na tomada de íons da água (DUNCAN *et al.*, 2010).

Embora contraditória, o aumento na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas arraias submetidas ao estresse pelo transporte com renovação da água e com adição de sal, especialmente nos grupos confinados em 12 horas pode ter interpretação ambígua. A função da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é ambivalente. Em *Dasyatis sabina* mantida na água do mar, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase cria um gradiente eletroquímico envolvido na excreção de NaCl, enquanto nos exemplares mantidos na água doce esta enzima está envolvida na tomada de NaCl (PIERMARINI & EVANS, 2000; PIERMARINI & EVANS, 2001). O aumento na atividade da enzima pode ter sido: (i) um aumento na expressão e/ou modulação de suas propriedade catalíticas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nos exemplares expostos ao sal (5 g/l) para criar um gradiente favorável à excreção do excesso de sais pelas brânquias; (ii) um aumento na expressão e/ou modulação de suas propriedade catalíticas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nos exemplares submetidos ao confinamento (embora com renovação da água) para criar um gradiente favorável à tomada dos íons pelas brânquias, os quais foram perdidos por meio da difusão facilitada.

Estas estratégias fisiológicas envolvendo a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase podem ter sido eficientes para a homeostase iono-osmorregulatórias. As alterações nas atividades específicas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase não afetaram os teores dos principais íons do plasma da arraias, pois os níveis de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  não foram alterados em nenhum dos protocolos de transporte. Tal como pode ser observado na relação entre  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  que não variou entre

os tratamentos. No entanto, os teores de  $K^+$  foram substancialmente reduzidos, especialmente nos mesmos grupos experimentais onde a atividade da  $Na^+/K^+$ -ATPase branquial e renal apresentou-se elevada. Presume-se que dos mecanismos de transporte iônico para manter a homeostase do  $Na^+$  e  $Cl^-$  plasmáticos por meio da  $Na^+/K^+$ -ATPase podem estar acoplados ao transporte do íon  $K^+$ . A concentração do íon  $K^+$  no plasma dos potamotrigonídeos é baixa. Nas várias espécies analisadas, inclusive *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) os valores estão em torno de 4-7 mmol/l (THORSON *et al.*, 1967; WOOD *et al.*, 2002; WOOD *et al.*, 2003; DUNCAN *et al.*, 2009). A enzima  $Na^+/K^+$ -ATPase é um sistema de transporte antiporte, ou seja, a tomada de  $2K^+$  está acoplada a saída de  $3 Na^+$ . Portanto, sugere-se que a redução dos níveis de  $K^+$  no plasma das arraias durante o transporte seja um reflexo do influxo desse íon para o compartimento intracelular.

O custo metabólico para osmorregular é relativamente baixo (<2%) se comparado aos outros processos, tais como contração-relaxamento muscular (EVANS *et al.*, 2005). Os sistemas eletrogênicos, entre os quais estão a  $Na^+/K^+$ -ATPase podem consumir entre 30 a 60% do ATP produzido (HOCHACHKA & LUTZ, 2001). Assim, o aumento na atividade da  $Na^+/K^+$ -ATPase representa uma elevação do custo metabólico para osmorregular. Se considerarmos que a água dos monoblocos possui pouco oxigênio dissolvido (<2 mg/l), a produção de ATP aeróbico pode ter sido limitada pela condição de hipóxia moderada. Esta interpretação pode ajudar a explicar o provável quadro de imunossupressão observada nos animais confinados e transportados em monoblocos durante 12 horas. Segundo Svensson *et al.* (1998), animais submetidos a situações de estresse apresentam uma redução na resposta imune. Segundo estes autores, a alocação de energia para sustentar os processos para a homeostasia poderá reduzir a energia disponível para a síntese de imunoglobulinas.

Outra possível explicação para a redução das globulinas plasmáticas das arraiais confinadas nos monoblocos pode estar associada ao estresse mediado pelos hormônios corticosteróides. Vários autores têm sugerido que os principais custos das respostas imunológicas são os danos teciduais e as reações autoimunes (SVENSSON *et al.*, 1998). As respostas fisiológicas ao estresse medidas pelos corticosteróides são amplamente discutidas na literatura (URBINATI *et al.*, 2004; BRANDÃO *et al.*, 2006). Tem sido sugerido que a principal função desses hormônios é proteger o organismo do estresse ativado pelos mecanismos de defesa do sistema imune que poderá causar severos danos teciduais, portanto, a imunossupressão pode evitar tais danos (SVENSSON *et al.*, 1998).

Todos os efeitos fisiológicos do estresse pelo confinamento/adensamento das arraiais foram mais pronunciados após 12 horas de transporte. Isto indica que, quanto mais tempo os animais permanecem submetidos aos agentes que provocam o estresse mais agudas serão as respostas e seus efeitos.

## **6. CONCLUSÃO**

- 1 – Os diferentes procedimentos de transporte (com renovação, adição de NaCl e sem renovação da água) não provocam alterações pronunciadas nos processos osmorregulatórios das arraiais de água doce;
- 2 – Quanto maior for o tempo de confinamento/adensamento mais agudos são os efeitos sobre os processos osmorregulatórios;
- 3 – Animais confinados/adensados e transportados por 12 horas apresentam uma redução nos níveis de  $K^+$ , proteínas e globulinas totais;
- 4 – A redução nos níveis de globulinas totais (incluindo as imunoglobulinas) ao longo do tempo de transporte significa uma redução da imunocompetência humoral – imunossupressão;

5 – O aumento na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial e renal foi associada à manutenção do equilíbrio iônico ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), pois estes eletrólitos não apresentaram alterações nos animais confinados/adensados e transportados;

6 – Os níveis de uréia plasmáticos não foram afetados durante o transporte das arraias.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M. & FRANKEL, T.L. Gill ATPase activities of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), and golden perch, *Macquaria ambigua* (Richardson): effects of environmental salt and ammonia. *Aquaculture*, v.251, p.118-133. 2006.

ARAÚJO, M.L.G. **Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp (Chondrichthyes – Potamotrygonidae) no Médio Rio Negro, Amazonas.** Manaus, 164p. Dissertação (mestrado)-PPG-BTRN-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas (INPA/FUA), 1998.

ARAÚJO, M.L. **Resultados do monitoramento da pesca de arraias de água doce utilizadas como peixe ornamental no Médio rio Negro.** Relatório Técnico do IBAMA nº 04. 42 p., 2004.

AUCOUR, A.M., TAO, F.X., MOREIRA-TURCQ, P., SEYLER, P., SHEPPARD, S. & BENEDETTI, M.F. The Amazon River: behaviour of metals (Fe, Al, Mn) and dissolved organic matter in the initial mixing at the Rio Negro/Solimões confluence. *Chemical Geology*, v.197, p.271-285. 2003.

BITTNER, A. & LANG, S. Some aspects of the osmoregulation of Amazonian freshwater stingrays (*Potamotrygon hystrix*). I. Serum osmolality, sodium and chloride content, water content, hematocrit, and urea level. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 67A, p. 9-13, 1980.

BRANDÃO, F. R., GOMES, L. C. & CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, v. 36, n. 3, p. 349-356, 2006.

CHARVET-ALMEIDA, P., ARAÚJO, M. L. G. & ALMEIDA, M. P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, v. 34, p. 165-171, 2005.

COMPAGNO, L. & COOK, S. F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. In **The Biology of Freshwater Elasmobranchs, a Symposium to Honor Thomas B. Thorson** (OETTINGER M. I., ZORZI, G.D., eds.). *Journal Aquaculture & Aquatic Sciences*, pp. 62-90, 1995.

DUNCAN W.P., COSTA, O.T.F., ARAÚJO, M.L.G. & FERNANDES, M.N. Ionic regulation and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> -ATPase activity in gills and kidney of the freshwater stingray *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon basin. *Journal of Fish Biology*, v. 74, n.2, p. 956-960, 2009.

DUNCAN, COSTA, O.T.F., SAKURAGUI, M.M. & FERNANDES, M.N. Functional morphology of the gill in Amazonian freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae): implications for adaptation to freshwater. *Physiological Biochemical Zoology*, v. 83, p. 19-32, 2010.

DUNCAN, W. P.; FERNANDES, M. N. (no prelo a). Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Pan American Journal of Aquatic Sciences*.

DUNCAN, W. P.; FERNANDES, M. N. (no prelo b). Mitochondrion-rich cells distribution, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and gill morphometry of the Amazonian freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Fish Physiology and Biochemistry*.

DUNCAN, W.P. **Habitat, morfologia branquial e osmorregulação das arraias de água doce da bacia Amazônica (Elasmobranchii: Potamotrygonidae)**. PPG-ERN/UFSCar, 2008. São Carlos, SP. 173 p.

EVANS, D. H., PIERMARINI, P. M. & CHOE, K. P. Homeostasis: osmoregulation, pH regulation and nitrogen excretion. In: **Biology of sharks and their relatives** (Ed. CARRIER, J. C., MUSICK, J. A. & HEITHAUS, M. R.), p. 247-268. Boca Raton, FL: CRC Press. 2004.

EVANS, D. H., PIERMARINI, P. M. & CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous wastes. *Physiology Review*, v.85, p. 97-177, 2005.

GERST, J.W.; THORSON, T.B. Effects of saline acclimation on plasma electrolytes, urea excretion, and hepatic urea biosynthesis in a freshwater stingray, *Potamotrygon* sp. Garman, 1877. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 56A, p. 87-93, 1977.

GOOD, D. W., KNEPPER, M. A. AND BURG, M. B. Ammonia and bicarbonate transport by thick ascending limb of rat kidney. *American Journal of Physiology*, v.247, p.F35-F44, 1984.

HARGREAVES, J.A. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, v.166, p.181- 212, 1998.

HOCHACHKA, P.W. & LUTZ, P. L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animal. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 130B, p. 435-459. 2001.

INOMATA, S.O., TEIXEIRA, T.R\*., FERNANDES, M.N., DUNCAN, W.P<sup>#</sup>., A Pesca ornamental das arraias de água doce (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica: conflitos de pesca e ornamentação pesqueira. *Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca-CONBEP*, Natal-RN, 2009.

KINSELLA, J. L. AND ARONSON, P. S. Interaction of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> with the renal microvillus membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *American Journal of Physiology*, v.241, p. C220-C226, 1981.

MARSHAL, W.S., EMBERLEY, T.R., SINGER, T.D., BRYSON, S.E., McCORMICK, S.D. Time course of salinity adaptation in strongly euryhaline estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*: a multivariable approach. *Journal of Experimental Biology*, v.202, p.1535-1544. 1999.

MARSHALL, W.S. & BRYSON, S.E. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cell: an inclusive model of a multifunctional cell. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 119A, p. 97-106, 1998.

McCORMICK, S.D. Hormonal control of gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase and chloride cell function. In: WOOD, C.M.; SHUTTLEWORTH, T.J. (Eds.) **Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation**. San Diego, Academic Press, v.14, p.285–315, 1995.

MORAES, F.R., MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. Editora Tecart, São Paulo, p. 343-386, 2004.

PIERMARINI, P.M. & EVANS, D.H. Effects of environmental salinity on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis Sabina*). *Journal Experimental Biology*, v. 203, p. 2957-2966, 2000.

PIERMARINI, P.M.; EVANS, D.H. Immunochemical analysis of the vacuolar proton-ATPase B-subunit in the gills of a euryhaline stingray (*Dasyatis sabina*): effects of salinity and relation to  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase. *Journal of Experimental Biology*, v. 204, p. 3251-3259, 2001.

RINCON, G. & CHARVET-ALMEIDA, P. O monitoramento da pesca ornamental de raias de água doce está sendo efetivo? Problemas e possíveis soluções nas esferas envolvidas. *Elasmovisor*, Novembro, 2006b. disponível em: <http://www.sbeel.org.br>.

SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M. L. G.; ZUANON, J. A. S. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii, Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 4, n. 4, p. 466-475, 2009.

SVENSSON, E., RABERG, L., KOCH, C. & HASSELQUIST, D. Energetic stress, immunosuppression and the cost of an antibody response. *Functional Ecology*, v. 12, p. 912-919, 1998.

THORSON, T. B. Freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp.: failure to concentrate urea when exposed to a saline medium. *Life Science*, v. 9, p. 893-900, 1970.

THORSON, T. B., COWAN, C. M. & WATSON, D. E. *Potamotrygon* spp.: elasmobranchs with low urea content. *Science*, v. 158, p. 375-377, 1967.

TOWLE, D.W., HOLLELAND, T. Ammonium ion substitute for K<sup>+</sup> in ATP-dependent Na<sup>+</sup> transport by basolateral membrane vesicles. *American Journal of Physiology*, v.252, p.R479-R489, 1987.

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

WILLIAMS, E.M., EDDY, F. B. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *Journal of Comparative Physiology*, v.156B, p.867–872, 1986.

WRIGHT, P.A. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology*, v.198, p.273-281, 1995.

WOOD, C. M., MATSUO, A. Y. O., GONZALEZ, R. J., WILSON, R. W., PATRICK, M. L. & VAL, A. L. Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwater of the Rio Negro. *Journal Experimental Biology*, v. 205, p. 3039-3054, 2002.

WOOD, C.M.; MATSUO, A.Y. O.; WILSON, R. W.; GONZALEZ, R. J.; PATRICK, M. L.; PLAYLE, R. C. & VAL, A. L. Protection by natural blackwater against disturbances in ions fluxes caused by low pH exposure in freshwater stingrays endemic to the Rio Negro. *Physiological and Biochemical Zoology* 76, 12–27, 2003.

## 8. CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 200 9	Set	Out	Nov	Dez	Jan 201 0	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Adequação dos protocolos/metodologias dos ensaios enzimáticos (ATPases)	R	R	R	R	R							
2	Captura dos animais na natureza					R		R	R				
3	Análise das características da água na natureza/variáveis físico-químicas					R	R	R	R	R			
4	Experimentação: transporte das arraias das áreas de pesca à cidade de Barcelos							R	R	R			
5	Análise da qualidade da água de transporte/ variáveis físico-químicas							R	R	R			
6	Análise da sensibilidade de <i>Potamotrygon</i> sp./Taxa de mortalidade							R	R	R			
7	Análise das alterações no equilíbrio eletrolítico/Análise de íons e metabólitos								R	R	R		
8	Análise dos mecanismos de transporte iônico/análises das ATPases								R	R	R		
9	Divulgação dos resultados em eventos científicos (congressos nacionais)											R	*
10	Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)										R	R	R
11	Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												R

R: Realizados; X: Em andamento; \*: Outros resultados deste estudo foram apresentados no Aquabio/Aquaciência 2010, em Recife no período de 12 a 15 de setembro de 2010.