

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FRAÇÃO SOLÚVEL DA GASOLINA EM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DE *Prochilodus lineatus***

JULIANA DELATIM SIMONATO

SÃO CARLOS – SP

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FRAÇÃO SOLÚVEL DA GASOLINA EM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DE *Prochilodus lineatus***

JULIANA DELATIM SIMONATO

ORIENTADORA: Dra. MARISA NARCISO FERNANDES

CO-ORIENTADORA: Dra. CLÁUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos-SP

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S595ee

Simonato, Juliana Delatim.

Efeitos da exposição à fração solúvel da gasolina em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Prochilodus lineatus* / Juliana Delatim Simonato. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

71 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Ecologia aquática. 2. Peixe de água doce. 3. Água - poluição. 4. Gasolina. 5. Estresse oxidativo. 6. Osmorregulação. I. Título.

CDD: 574.5263 (20^a)

Juliana Delatim Simonato


**OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FRAÇÃO SOLÚVEL DA GASOLINA EM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DE *Prochilodus lineatus***

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 19 de maio de 2010

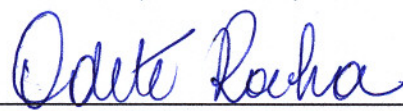
BANCA EXAMINADORA

Presidente



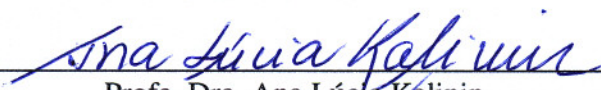
Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
(Orientadora)

1º Examinador



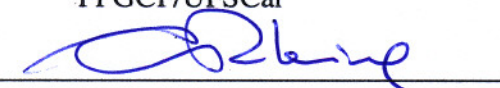
Profa. Dra. Odete Rocha
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



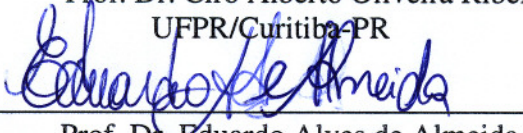
Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin
PPGCF/UFSCar

3º Examinador



Prof. Dr. Ciro Alberto Oliveira Ribeiro
UFPR/Curitiba-PR

4º Examinador



Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
UNESP/S. J. do Rio Preto-SP

DEDICATÓRIA

À Nicole, por ter completado minha vida.

Ao Henrique, pelo amor e apoio sempre.

Aos meus pais e irmãos, por tudo.

*"A vida é como andar de bicicleta.
para manter seu equilíbrio você
deve continuar em movimento."*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Dr^a.Cláudia B.R. Martinez pela orientação, apoio, incentivo e por estar sempre presente tanto no desenvolvimento do trabalho como na minha vida. Agradeço na verdade pelos sete anos de confiança e amizade.

À Dr^a.Marisa N. Fernandes pela ajuda, participação e principalmente à disponibilidade em orientar mesmo à distância.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFSCar e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao departamento de Ciências Fisiológicas da UEL pelo apoio, disponibilidade de espaço físico e cooperação durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina pelo fornecimento dos peixes.

Ao Marcelo Paulino pela ajuda na preparação das lâminas de imunohistoquímica.

Ao Dr. José Marcelo D. Torezan por ter concedido espaço para realização da preparação da FSG.

À Dr^a. Carmen L.B. Guedes pela análise qualitativa das amostras de gasolina.

Aos Drs. Ciro A. O. Ribeiro e Eduardo A. de Almeida e às Dras. Ana Lucia Kalinin e Odete Rocha, por terem disponibilizado tempo para leitura da tese para participarem da banca.

Ao CNPq, FAPESP e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

À Dra.Marta M. Souza pela sua eterna amizade.

À Nicole agradeço por ela existir.

Ao Henrique pelo seu amor, dedicação, compreensão, companheirismo e paciência principalmente nestes últimos momentos do trabalho.

À minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos agradeço pelo apoio, desabafos, conselhos e por sempre acreditarem em mim.

Ao pessoal do LEFA pelo apoio durante os experimentos. Ao Rafael pela ajuda nos derrames e à Andrea pela companhia e troca de artigos na fase final do trabalho. Em especial à Carolina Antunes pela ajuda em toda a fase de experimentação. À Marina, Lindalva e Kathya pela amizade.

À Deus pela vida.

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUÇÃO GERAL	3
4. OBJETIVOS	10
4.1. Objetivos gerais	10
4.2. Objetivos específicos	10
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	11
5.1. Animal experimental	11
5.2. Simulação de derrame de gasolina e preparo da fração solúvel da FSG	11
5.3. Exposição à FSG e amostragens	12
5.4. Análises químicas dos meios de exposição	13
6. CAPÍTULO I. Efeitos da fração solúvel da gasolina nas enzimas de biotransformação e defesas antioxidantes do peixe <i>Prochilodus lineatus</i>	16
6.1. INTRODUÇÃO	17
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	22
6.2.1. Preparação das amostras	22
6.2.2. Análises das enzimas de biotransformação	22
6.2.3. Análises dos antioxidantes	23
6.2.4. Análises da peroxidação lipídica	24
6.2.5. Análise estatística	24
6.3. RESULTADOS	24
6.3.1. Enzimas de biotransformação e defesa antioxidante no fígado	24
6.3.2. Enzimas de biotransformação e defesa antioxidante na brânquia	25
6.3.3. Lipoperoxidação no fígado e nas brânquias	31
6.4. DISCUSSÃO	32
6.5. CONCLUSÃO	37
7. CAPÍTULO II. Efeitos da fração solúvel da gasolina em parâmetros hematológicos, metabólicos e osmo-iônicos no	

peixe <i>Prochilodus lineatus</i>	39
7.1. INTRODUÇÃO	40
7.2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
7.2.1. Análises hematológicas	43
7.2.2. Concentrações plasmáticas de cortisol, glicose e proteínas	44
7.2.3. Análise osmo-iônicas	44
7.2.4. Identificação das células-cloreto nas Brânquias	44
7.2.5. Atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase nas Brânquias	45
7.2.6. Análise estatística	46
7.3. RESULTADOS	46
7.3.1. Parâmetros hematológicos	46
7.3.2. Parâmetros metabólicos	46
7.3.3. Parâmetros osmo-iônicos	47
7.3.4. Identificação das células-cloreto nas Brânquias	47
7.3.5. Atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase nas Brânquias	47
7.4. DISCUSSÃO	52
7.5. CONCLUSÃO	57
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos da fração solúvel da gasolina (FSG) em alguns parâmetros bioquímicos e fisiológicos do peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. A FSG foi preparada misturando-se gasolina em água (1:4), essa mistura foi exposta à radiação solar intensa durante 6 h, simulando um derrame de gasolina em condições tropicais. Após, a FSG foi coletada e a fração insolúvel foi descartada. Os animais foram expostos por 6, 24 e 96 h à FSG diluída 5 % (grupo EXP) ou apenas à água (grupo controle ou CTR). Foram analisados parâmetros bioquímicos (antioxidantes e indução da CYP1A) em brânquia e fígado, hematológicos, osmo-iônicos, metabólicos, endócrino (cortisol) além da densidade e distribuição de células-cloreto (CC) e a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) nas brânquias. O aumento na atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e da glutathiona-S-transferase (GST) indicou a estimulação das vias de biotransformação de fase I e II dos compostos da FSG em ambos os órgãos. A ativação das enzimas de detoxificação nas brânquias ressaltou a importância deste órgão na biotransformação de xenobióticos. O fígado apresentou aumento na concentração de glutathiona reduzida (GSH) após 24 h e 96 h de exposição à FSG e aumento na atividade catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) após 96 h de exposição. As brânquias mostraram uma ativação das vias antioxidantes com o aumento da CAT logo após 6 h de exposição, e da concentração de GSH após 24 h de exposição. No entanto, para ambos os órgãos estudados, a ativação das defesas antioxidantes não foi suficiente para impedir os danos oxidativo, como indicado pela ocorrência de peroxidação lipídica (LPO) no fígado e nas brânquias após 6 e 96 h de exposição, respectivamente. A FSG também provocou hemólise comprovada pela diminuição dos parâmetros hematológicos analisados, seguido pelo aumento do K^+ plasmático. Os peixes mostraram uma resposta secundária de estresse visualizado pela ocorrência da hiperglicemia em todos os períodos de exposição, apesar da ausência de diferenças significativas na concentração plasmática do cortisol. A FSG também provocou aumento na densidade das CC, na atividade da NKA, nas concentrações plasmáticas do Na^+ e osmolaridade nos animais expostos durante 24 h. Esses resultados em conjunto indicam que os compostos presentes na FSG afetaram de maneira significativa órgãos vitais como o fígado e as brânquias do *Prochilodus lineatus*.

Palavras-chave: gasolina, Na^+/K^+ -ATPase, células-cloreto, teleosteo dulcícola antioxidantes, respostas de estresse, CYP1A, peixe neotropical

2. ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effects of the water-soluble fraction of gasolina (WSFG) to the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. The WSFG was prepared by adding gasoline to water (1:4) this mixture was then exposed to intense sunlight for 6h, simulating a gasoline spill in tropical conditions. After that the upper insoluble phase was discharged and the WSFG was collected. Fish were exposed for 6, 24 and 96h to the WSFG diluted to 5% (EXP group) or only to water (control group or CTR). The following parameters were analyzed: biochemical (antioxidants and EROD) of gills and liver, hematologic, osmo-ionic, metabolic, endocrine (cortisol) besides the density and distribution of chloride cells (CC) and the activity of gills Na^+/K^+ -ATPase (NKA). The increased in ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and glutathione-S-transferase (GST) activity indicated phase I and II biotransformation of the compounds present in the WSFG in both organs. The activation of CYP1A in the gills pointed out the importance of this organ in the biotransformation of xenobiotics. The liver showed an increase in reduced glutathione (GSH) content at 24 and 96 h exposure to WSFG and the increase in the activity of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) after 96 h exposure. The gills showed an activation of the antioxidant defenses with an increased CAT activity soon after 6h exposure and an increase in GSH content after 24h exposure. However, for both organs the antioxidants defense was not enough to prevent oxidative damage, as shown by the occurrence of lipid peroxidation in liver and gills after 6 and 96h of exposure, respectively. The WSFG also promoted hemolysis, as indicated by the changes in the hematological parameters analyzed and an increase in plasma K^+ . Fish showed a secondary stress response, noted by the occurrence of hyperglycemia in all the periods of exposure, despite no significant increase in plasma cortisol. The WSFG also lead to an increase in the density of CC, in the activity of NKA, in plasma concentrations of Na^+ and in the osmolarity in fish exposed to WSFG for 24h. Taken together these results showed that the compounds present in the WSFG interfere on the functioning of vital organs such as liver and gills of *Prochilodus lineatus*.

Keywords: gasoline, Na^+/K^+ -ATPase, chloride cells, freshwater fish, antioxidants, stress response, CYP1A.

3. INTRODUÇÃO GERAL

De todos os problemas causados pelo excesso de poluição ambiental, os mais importantes são a contaminação das águas e a conseqüente escassez dos recursos hídricos de boa qualidade. A água, indiscutivelmente, é a substância mais necessária aos seres vivos. É um composto de grande estabilidade e considerado um solvente universal. Devido à sua capacidade de dissolver quase todos os elementos e compostos químicos, sejam eles constituintes naturais do solo ou substâncias lançadas de forma inadequada, a água contém várias substâncias dissolvidas e dependendo do grau de concentração destes compostos, a água pode ou não ser nociva.

Atualmente, com o aumento demográfico e por conseqüência o aumento da industrialização, a preocupação com a escassez de água tornou-se tema de discussões, afinal essa intensa demanda de água potável gera um aumento no consumo e comprometimento da águas de rios, lagos e reservatórios.

O ambiente aquático, devido ao seu alto potencial de diluição, recebe todos os tipos de despejos e efluentes provindos da agricultura, indústria, esgoto doméstico e lixos urbanos, comprometendo a utilização da água e promovendo sérios problemas para os organismos residentes. Dentre os diferentes tipos de poluentes aquáticos, os derivados de petróleo são um dos mais relevantes para a ecotoxicologia aquática (Pacheco e Santos, 2001a) e tem causado bastante preocupação, tanto pela freqüência dos eventos de contaminação, como pelo elevado potencial poluidor dos seus compostos (Gómez et al., 2003; Tiburtius et al., 2004).

A contaminação do ambiente aquático por petróleo e derivados é atribuída principalmente a acidentes com tanques de armazenamento, derramamentos e descargas de resíduos municipais e industriais. Essa contaminação também pode ser explicada pelo aumento no consumo de petróleo motivado pela crescente necessidade da população e da indústria (Gómez et al., 2003).

A ocorrência de vazamentos em postos de distribuição de combustíveis tem sido objeto de crescente preocupação, em função dos riscos associados a esses eventos, tanto para a segurança e saúde da população, como para o meio ambiente (CETESB, 2010). Embora grandes vazamentos sejam muito preocupantes e ocupem um considerável espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação do ambiente aquático por derivados de

petróleo deva-se a pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis em postos de distribuição, favorecidos pelo envelhecimento e falta de manutenção dos tanques de armazenamento (Tiburtius et al., 2005). No Brasil, de acordo com a Resolução nº 273 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 29 de novembro de 2000, toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis, configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. Segundo a CETESB (2010), desde 1984 aproximadamente 70% das emergências atendidas em postos de distribuição em todo o Estado de São Paulo referem-se à vazamentos de gasolina.

A gasolina é produto da destilação direta do petróleo e é constituída de uma mistura de hidrocarbonetos voláteis, cujos componentes principais são cadeias ramificadas de parafinas, hidrocarbonetos aromáticos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (denominados grupo BTEX) e alguns hidrocarbonetos poliaromáticos (Tiburtius et al., 2004). No Brasil, e em diversos outros países, a gasolina é misturada com etanol (25%), em virtude da escassez do petróleo e do excesso de monóxido de carbono no ar atmosférico nos grandes centros urbanos. A presença do etanol na gasolina aumenta a solubilidade dos hidrocarbonetos na água devido ao seu efeito co-solvente (Corseuil et al., 2004; Tiburtius et al., 2005). O alto potencial poluidor da gasolina está diretamente relacionado com esses hidrocarbonetos monoaromáticos de maior solubilidade em água os BTEX (Tiburtius et al., 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde estabelece na portaria federal 518 (de 25 de março de 2004) os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, onde a concentração máxima permitida para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos são de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$; $0,17 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$; e $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. A Resolução CONAMA nº357 (2005) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e providências ao abastecimento para consumo humano. Os padrões para água doce classe I (destinada para consumo humano e à preservação de comunidades aquáticas), prevê concentrações

máximas para benzeno ($0,005 \text{ mg.L}^{-1}$), tolueno ($2,0 \text{ } \mu\text{L.L}^{-1}$), etilbenzeno ($90,0 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$), xileno ($300,0 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) e fenóis totais ($0,003 \text{ mg.L}^{-1}$).

A exposição à gasolina tem sido associada à problemas sensoriais, depressão da atividade do sistema nervoso central e efeitos no sistema respiratório, além do comprometimento dos rins, fígado e do sistema sanguíneo, podendo provocar leucemia (USEPA, 2002). O benzeno é reconhecidamente o mais tóxico de todos os BTEX e trata-se de uma substância comprovadamente carcinogênica. Uma exposição aguda por inalação ou ingestão pode causar até mesmo a morte de uma pessoa.

Além do benzeno os outros compostos do grupo BTEX apresentam toxicidade. O tolueno também é depressor do sistema nervoso central. A exposição crônica pode causar distúrbios psíquicos e doenças neurológicas. O etilbenzeno pode produzir irritação das vias aéreas superiores seguida de narcose, calafrios e parada respiratória. Os xilenos exercem ação tóxica sobre o sistema nervoso central e fígado além de distúrbios hematológicos como anemias, com diminuição da hemoglobina e das hemácias (Bruckner et al., 2008).

O petróleo e seus derivados também podem promover sérios distúrbios nos ecossistemas aquáticos uma vez que suas frações solúveis podem alcançar águas naturais, tornando-se biologicamente disponíveis aos organismos aquáticos (Khan, 1998). Os hidrocarbonetos podem penetrar facilmente nas membranas biológicas, devido a sua natureza lipofílica, e se acumular nos organismos vivos (Tuvikene, 1995), por isso a investigação dos efeitos tóxicos dos produtos derivados de petróleo em organismos aquáticos é de extrema importância (Pacheco e Santos, 2001b; Zhang et al., 2003).

A toxicologia aquática surgiu como uma alternativa técnica confiável para prever o impacto de agentes contaminantes sobre as diversas comunidades do ambiente aquático. A toxicologia aquática é definida como o estudo dos efeitos de produtos químicos e outros materiais de atividades antropogênicas sobre organismos aquáticos em vários níveis de organização, desde o subcelular até uma comunidade ou um ecossistema (Rand et al., 1995)

Os contaminantes podem manifestar seus efeitos nos peixes em vários níveis de organização biológica como: alterações estruturais em órgãos e tecidos, disfunções fisiológicas e exposições prolongadas dos peixes à

contaminantes, em doses subletais, tendem a afetar o seu crescimento, reprodução e diminuir a resistência a doenças, ocasionando sérias conseqüências para a sobrevivência da população (Di Giulio e Hinton, 2008).

As alterações biológicas provocadas pelos poluentes podem ser utilizadas como biomarcadores para se identificar danos iniciais nos organismos sinalizando os efeitos e/ou respostas resultantes da exposição a um ou mais agentes tóxicos. Atualmente, os biomarcadores fisiológicos, histológicos e bioquímicos vêm sendo utilizados amplamente para apontar e quantificar tanto a exposição quanto os efeitos de contaminantes ambientais, e estão relacionados à avaliação da saúde dos peixes (Adams et al., 1990; Van der Oost et al., 2003). Os biomarcadores são ferramentas sensíveis capazes de detectar pequenas variações no ambiente, antes da ocorrência de danos irreversíveis ao ecossistema. Da mesma forma, contribuem para identificar o risco de contaminação, o que é fundamental para determinar o grau de severidade dos efeitos causados pelos xenobióticos. A aplicação de biomarcadores no monitoramento ambiental proporciona uma medida da disponibilidade de uma substância química ambiental para um organismo aquático, fornecendo uma medida direta da resposta do organismo à exposição a substâncias químicas (Schlenk et al., 2008).

Neste contexto, diversos trabalhos foram desenvolvidos com a preocupação de avaliar os efeitos dos hidrocarbonetos em organismos aquáticos, além de indicar os biomarcadores mais sensíveis que poderão ser utilizados em monitoramentos de áreas impactadas.

Trabalhos que avaliam a toxicidade da gasolina em peixes são escassos, porém os poucos trabalhos existentes comprovam que este composto, mesmo em pequenas concentrações, é capaz de promover alterações significativas nos organismos expostos. Segundo Rodrigues e colaboradores (2010) a gasolina provocou alterações histológicas nas brânquias e no fígado das larvas de *Odontesthes argentinensis*, sendo inclusive mais tóxica que o petróleo, e o trabalho de Pacheco e Santos, (2001a) mostrou que a gasolina também induziu a atividade da EROD e teve ação genotóxica para *Anguilla Anguilla* (enguia).

Por outro lado, existem diversos trabalhos que avaliaram os efeitos de hidrocarbonetos individualmente. A exposição ao benzeno promoveu alterações em diferentes enzimas no rim, fígado, coração e cérebro de *Clarias*

garipepinus (Adeyemi et al., 2009), já a mistura de benzeno e tolueno mostrou-se mais letal que os compostos analisados separadamente para embriões de *Oryzias latipes* (Teuschler et al., 2005). Para *Brachydanio rerio* os compostos etilbenzeno, xileno e tolueno, analisados individualmente, promoveram alterações de comportamento, incluindo hiperatividade, natação errática e convulsões (Ya-wei e Qi-xing, 2009).

Alguns hidrocarbonetos poliaromáticos, como o naftaleno e o fenantreno também estão presentes na gasolina, porém em concentrações menores quando comparadas às concentrações dos BTEX. No entanto, vários trabalhos mostram que estes compostos, mesmo em baixas concentrações, são capazes de causar diversos danos em peixes expostos. O naftaleno é um dos HPAs mais representativos na gasolina e trabalhos indicaram a presença dele em frações solúveis em água da gasolina (Pacheco e Santos, 2001a; Rodrigues et al., 2010). Vários trabalhos já reportaram os efeitos em peixes provocados pela exposição ao naftaleno. Segundo Tintos e colaboradores (2007) o naftaleno interferiu no metabolismo energético hepático e promoveu redução dos níveis de cortisol plasmático da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Pollino e colaboradores (2009) verificaram que o naftaleno promoveu inibição dose-dependente da EROD hepática, agiu como disruptor endócrino além de promover má formação nas larvas de *Melanotaenia fluviatilis*. Outro trabalho também mostrou que o naftaleno, e outros HPAs, são compostos neuro-ativos que alteram o metabolismo de neurotransmissores monoaminérgicos no cérebro, incluindo a noradrenalina, a serotonina e a dopamina (Gesto et al., 2006 e 2009). A exposição ao fenantreno (HPA) promoveu aumento na atividade de enzimas de defesa antioxidante de duas espécies (*Oreochromis niloticus* e *O. aureus*) de tilápia (Wenju et al., 2009). Além dos efeitos da exposição direta aos HPA na saúde dos peixes, estes compostos também podem ser acumulados em órgãos e tecidos como revelado na análise da bile de *Oreochromis niloticus* coletados em rios contaminados com HPA onde se detectou a presença de naftaleno, pireno e benzo(a)pireno (Pathiratne et al., 2009). Silva e colaboradores (2006) também encontraram naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno na bile de peixes demersais coletados no canal de São Sebastião, São Paulo.

Devido à sua capacidade de adaptação às variações ambientais, os peixes são considerados modelos interessantes para estudos em ecotoxicologia. Em áreas poluídas, os peixes encontram-se submetidos ao estresse químico que pode ocasionar alterações em órgãos-alvo afetando diferentes sistemas (Schwaiger et al., 1997). Para se conhecer os efeitos de contaminantes sobre a biota aquática, têm se desenvolvido testes com organismos aquáticos, que possibilitam avaliar o efeito do poluente em condições laboratoriais.

Dentre as espécies de peixes utilizadas como modelo experimental, o *Prochilodus lineatus*, Valenciennes (Figura 1), tem sido bastante utilizado e já mostrou resultados importantes como espécie sentinela. Esse peixe da ordem Characiformes, da família Prochilodontidae popularmente conhecida como curimba ou curimatá, é nativo das regiões Sul e Sudeste do Brasil, considerada uma das mais importantes da bacia do rio Paraná. Além de seu valor ecológico, é também economicamente importante para a região, tanto para a subsistência como para a pesca comercial (Cazenave et al., 2009). Trata-se de uma espécie detritívora, desta forma, encontra-se em contato direto com poluentes eventualmente depositados no sedimento, além dos compostos diluídos na água. Alguns trabalhos realizados têm demonstrado que essa espécie é muito sensível à diferentes contaminantes (Carvalho e Fernandes 2008; Camargo et al., 2009; Cazenave et al., 2009; Modesto e Martinez, 2010), inclusive aos derivados de petróleo (Simonato et al., 2006 e 2008; Vanzella et al., 2007), e por isso é considerada como um potencial bioindicador para monitoramentos ambientais.



Figura 1. Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*.

Apesar do número relativamente elevado de estudos relacionados à toxicidade dos hidrocarbonetos de petróleo para organismos aquáticos marinhos, os efeitos no ambiente neotropical e em organismos dulcícolas ainda são escassos (Pollino e Holdway, 2003; Simonato et al., 2006 e 2008) e trabalhos que avaliam a toxicidade e efeitos da gasolina ainda são raros.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

- Caracterizar os efeitos da fração solúvel da gasolina para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus* em vários níveis de organização biológica: celular, bioquímico e fisiológico.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar o efeito na atividade das enzimas EROD, GST, SOD, CAT, GPx, GR, na concentração de GSH e a ocorrência de danos oxidativos (peroxidação lipídica) nas brânquias e no fígado de *P. lineatus* expostos à FSG.
- Avaliar o efeito nos parâmetros hematológicos (hematócrito, conteúdo de hemoglobina e número de eritrócitos), endócrinos (cortisol plasmático), metabólicos (glicemia) e osmo-iônicos (osmolaridade plasmática e concentrações plasmáticas de Na⁺, K⁺ e Cl⁻) de *P. lineatus* expostos à FSG;
- Analisar o efeito na atividade Na⁺/K⁺-ATPase e na quantidade de células-cloreto nas brânquias de *P. lineatus* expostos à FSG.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para atender aos objetivos propostos, peixes jovens da espécie neotropical *Prochilodus lineatus* (Figura 1) foram expostos à fração solúvel de gasolina. Segue abaixo a descrição do desenho experimental.

5.1. Animal Experimental

Exemplares jovens de *Prochilodus lineatus* foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da UEL, com massa corpórea de $11,23 \pm 4,67$ g e comprimento total de $10,76 \pm 1,98$ cm (média \pm DP, n= 266). Os animais foram aclimatados durante sete dias, em tanque de 300 L, contendo água desclorada, com aeração, pH, fotoperíodo e oxigênio dissolvido constantes. Os peixes foram alimentados com ração comercial a cada 48 h.

5.2. Preparo da fração solúvel da gasolina (FSG)

Foi utilizada a gasolina normalmente comercializada em postos de distribuição de combustível, comprada sempre no mesmo posto de bandeira BR. A metodologia de simulação do derrame de combustível seguiu a proposta por Nicodem et al. (1998), sofrendo adaptações para escala de campo. A gasolina foi misturada à água na proporção de 1 parte de gasolina para 4 partes água (em forma de filme), essa mistura permaneceu em repouso durante 24 horas (Figura 2). Dentro destas 24 horas, a mistura foi exposta ao intemperismo sob condições tropicais de insolação durante 6h com radiação solar direta (das 10 h até 16 h) em dias sem nuvens. Logo após a exposição, foi realizada a extração de fases: orgânica e aquosa. A fase aquosa foi separada (FSG 100%), diluída para 5% (FSG 5%) e assim utilizada nos testes de exposição e a fase orgânica (insolúvel) foi descartada apropriadamente.

As FSG 100% e 5% foram analisadas qualitativamente para a presença de hidrocarbonetos mono e poliaromáticos por espectrofotometria de fluorescência sincronizada de excitação/emissão, segundo Nicodem e colaboradores (1998). Os espectros de fluorescência sincronizados foram registrados de 300 a 800 nm, onde os picos de 300 a 400 correspondem aos hidrocarbonetos presentes na amostra. A determinação quantitativa (concentrações) dos hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), alguns hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) e

fenóis totais foi realizada somente na FSG 100%. Os HPAs foram analisados de acordo com o método USEPA 8310 usando cromatografia líquida com detector de fluorescência UV. Os BTEX foram analisados de acordo com o método USEPA 5021, utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. O fenol foi analisado de acordo com o Standard Method Direct (Método: 5530D) utilizando-se espectrofotometria.



Figura 2. Aquário contendo a FSG pronta para utilização nos testes de toxicidade.

5.3. Exposição à FSG e coleta das amostras

Os peixes foram submetidos a testes de toxicidade estáticos agudos (6, 24 e 96 h). Para cada tempo experimental utilizou-se um grupo exposto à FSG (EXP) e um grupo controle exposto apenas à água (CTR). Os testes foram realizados em aquários de vidro de 100 L, contendo 8 peixes cada. Os peixes foram expostos à água contaminada com a FSG 5% (4 L de FSG:76 L de água) e amostrados após cada período de exposição. O grupo controle foi amostrado simultaneamente ao grupo exposto à FSG. Foram realizadas réplicas para cada aquário (EXP e CTR). As características físicas e químicas dos meios foram monitoradas continuamente quanto a: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade.

Imediatamente após a retirada dos peixes dos aquários, estes foram anestesiados com benzocaína ($0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para a retirada de uma amostra de sangue pela veia caudal utilizando-se seringas heparinizadas. Seguidamente foram mortos por secção medular, medidos e pesados. A brânquia foi retirada e dividida em três partes, uma parte foi congelada a -80°C para as análises bioquímicas, a segunda parte foi fixada em tampão SEI para a análise da enzima $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ e a terceira parte fixada em solução de Bouin aquoso e utilizada para a análise imunohistoquímica. O fígado foi retirado e posteriormente congelado a -80°C até o momento dos ensaios. Após utilização de uma alíquota do sangue total o restante foi centrifugado (10 minutos, 10.000 g), e as amostras de plasma foram congeladas (-20°C) até o momento das análises de osmolaridade e das concentrações dos íons Na^{+} , Cl^{-} , K^{+} , do cortisol, da glicose e das proteínas totais.

5.4. Análises químicas dos meios de exposição

As características físicas e químicas da água dos aquários dos grupos EXP foram (média \pm DP): temperatura $21,1 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$; pH $7,3 \pm 0,5$; OD $7,4 \pm 0,8\text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$; condutividade $88,6 \pm 2,9\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, $n=30$. Para a água dos aquários dos grupos CTR os valores foram: temperatura $21,8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; pH $7,2 \pm 0,3$; OD $7,1 \pm 1,8\text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$; condutividade $116,6 \pm 1,6\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, $n=30$. Esses valores permaneceram estáveis durante todo o período experimental, tanto nos aquários controles quanto nos aquários com a FSG, desta forma esses parâmetros não influenciaram nos resultados obtidos.

As concentrações dos HPAs e dos BTEX estão relacionadas na Tabela 1. A FSG apresentou altas concentrações de BTEX, o etilbenzeno foi o mais representativo seguido pelo xileno, benzeno e tolueno. Dentre os 12 HPAs analisados, o naftaleno foi o mais significativo, seguido pelo antraceno e fenantreno. Todos os outros HPAs analisados mostraram concentrações abaixo do limite de detecção ($0,05\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). O espectro de fluorescência (Figura 2) da FSG 100 % indicou a presença dos hidrocarbonetos com pico de emissão entre 300 e 400 nm. As amostras da FSG diluída 5 % e coletada após os testes de toxicidade (6, 24 e 96 h) mostraram uma diminuição na intensidade relativa destes compostos quando comparadas com a FSG 100 %.

Tabela 1. Concentração de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) e hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) em 100% da fração solúvel da gasolina (FSG).

Hidrocarbonetos	FSG 100% [$\mu\text{g.L}^{-1}$]
Benzeno	5.700,00
Tolueno	1.050,00
Etilbenzeno	10.500,00
Xilenos	7.550,00
Total BTEX	24.800,00
Antraceno	53,25
Benzo(a) antraceno	<0,05
Benzo(a) pireno	<0,05
Benzo(ghi) perileno	<0,05
Benzo(k) fluoranteno	<0,05
Criseno	<0,05
Dibenzo(a, h) antraceno	<0,05
Fenantreno	12,20
Fluoranteno	<0,05
Indeno (1, 2, 3) pireno	<0,05
Naftaleno	2.138,25
Pireno	<0,05
Total HPA	2.203,70
Fenol Total	60,00

Limites de detecção: BTEX - $5,0 \mu\text{g.L}^{-1}$; HPA - $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$; Fenol - $5,0 \mu\text{g.L}^{-1}$

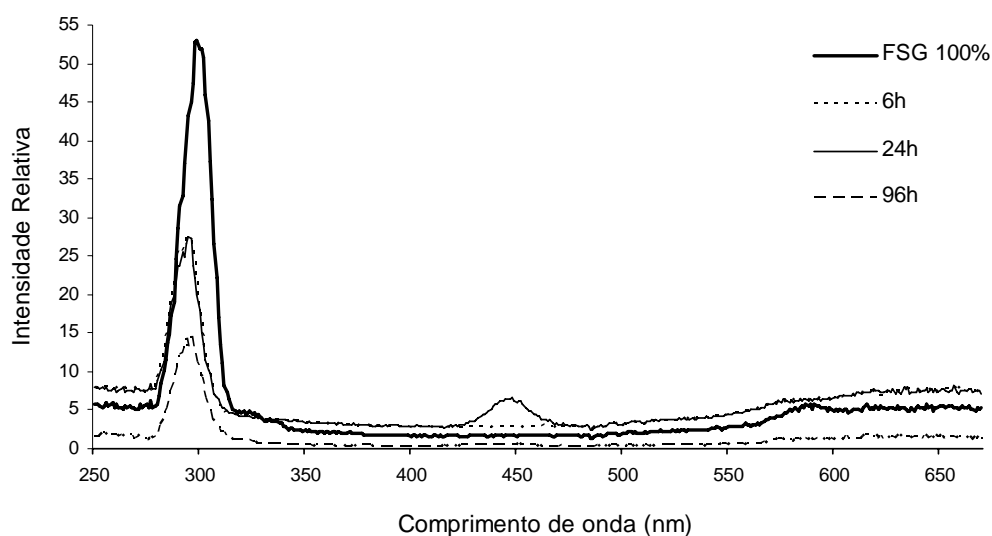


Figura 3. Espectro de fluorescência sincronizado da FSG 100% e da FSG 5% coletada após os testes de toxicidade de 6, 24 e 96 h.

Neste trabalho a análise química de 100 % da FSG mostrou altas concentrações dos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) e do poliaromático, naftaleno. Outros HPAs como o antraceno e fenantreno também foram encontrados, porém em menores concentrações. As altas concentrações dos BTEX refletem a adição do etanol na gasolina brasileira (25 %) o qual aumenta a solubilidade destes monoaromáticos devido ao efeito co-solvente quando presente na água (Corseuil et al., 2004). A determinação das concentrações dos hidrocarbonetos foi realizada somente para a FSG 100 %, considerando-se que os métodos analíticos disponíveis possuem limitações para quantificar concentrações muito pequenas, como a encontrada na FSG 5 %. Apesar disso, a análise qualitativa indicou a presença dos hidrocarbonetos na FSG 5 % após os testes de exposição. A comparação entre a FSG 100 % e a FSG 5 %, depois dos diferentes períodos do teste (6, 24 e 96 h), mostrou uma diminuição na intensidade relativa dos picos de fluorescência. No entanto, a comparação entre as FSG 5 % coletadas após os diferentes tempos de exposição indicaram uma pequena variação entre os tempos de 6 e 24 h, e mesmo a amostra coletada após 96 h de exposição ainda foi possível visualizar o pico de fluorescência dos compostos aromáticos. Esses resultados enfatizam a importância da utilização de biomarcadores sensíveis na avaliação e monitoramento de locais impactados com gasolina, visto que baixas concentrações de hidrocarbonetos são suficientes para manifestar alterações significativas no organismo dos animais expostos servindo de alerta antes do comprometimento de populações inteiras.

6. CAPÍTULO I

Efeitos da fração solúvel da gasolina nas enzimas de biotransformação e defesas antioxidantes do peixe *Prochilodus lineatus*

6.1. INTRODUÇÃO

Dentre os diferentes tipos de poluentes, os derivados de petróleo são um dos mais relevantes para a ecotoxicologia aquática (Pacheco e Santos, 2001a) e causam muita preocupação, tanto pela frequência dos eventos de contaminação como pelo elevado potencial poluidor dos seus compostos, principalmente os hidrocarbonetos aromáticos (Pacheco e Santos, 2001b). A gasolina é um produto da destilação direta do petróleo, que apresenta potencial poluidor diretamente relacionado com os hidrocarbonetos aromáticos de maior solubilidade em água, isto é, benzeno, tolueno e xilenos (BTEX) e alguns hidrocarbonetos poliaromáticos como o naftaleno, o fenantreno entre outros (Petrobras, 2003; Tiburtius et al., 2004).

Alguns trabalhos já mostraram os efeitos da exposição ao petróleo e seus derivados nas vias de defesa antioxidante de peixes (Pacheco e Santos, 2001a; Achuba e Osakwe, 2003; Zhang et al., 2004). Em peixes expostos a hidrocarbonetos de petróleo, alguns danos oxidativos podem aparecer como a peroxidação lipídica, a inativação de enzimas, quebra da cadeia de DNA entre outros (Zhang et al., 2003).

A biotransformação é importante para alterar a atividade biológica de compostos tóxicos e impedir que causem danos celulares. O processo de biotransformação inclui numerosos sistemas enzimáticos diferentes e diversos tipos de substratos. A função das enzimas de biotransformação é tornar os compostos mais hidrossolúveis para que sejam facilmente excretados. No entanto, algumas vezes os produtos metabólicos podem ser mais reativos e tóxicos do que o composto não metabolizado, esse processo é denominado bioativação (Stegeman et al., 1992; Van der Oost et al., 2003). A biotransformação dos xenobióticos usualmente consiste de duas fases. As reações de fase I envolvem reações de oxidação, redução e hidrólise que são catalisadas por enzimas que compõem o sistema de oxidases de função mista (MFO) e incluem o citocromo P450, o citocromo b_5 e o NADPH-citocromo P450 redutase. A mais importante característica do sistema MFO é a capacidade de facilitar a excreção de compostos pelo metabolismo da fase I transformando-os em compostos mais hidrossolúveis e também servindo de substrato para as reações de fase II que aumentam a taxa de excreção (Van der Oost et al.,

2003). A principal função do sistema MFO em peixes não expostos a contaminantes é o metabolismo de hormônios sexuais. Para os peixes, as principais enzimas de fase I são da família denominada citocromo P450 (Di Giulio et al., 1995). Os citocromos P450 são heme proteínas associadas à membrana, predominantemente localizada no retículo endoplasmático do fígado. A reação básica catalisada pelo citocromo P450 é a monooxigenação, na qual um átomo do oxigênio molecular é incorporado ao substrato lipofílico RH, que corresponde ao xenobiótico, e o outro é reduzido à água, sendo os elétrons necessários para a redução fornecidos pelo NADPH. O sistema do citocromo P450 abrange uma superfamília de enzimas. Para os peixes a classe de isoenzimas da família do citocromo P450 responsável pela biotransformação de uma ampla variedade de xenobióticos, como os HPAs, é a subfamília CYP1A (Van der Oost et al., 2003; Benedetti et al., 2007). Embora seja estudada principalmente no fígado, a indução da CYP1A também já foi observada em outros órgãos, como rim e brânquias (Jönsson et al., 2009). O método mais utilizado para se determinar a atividade catalítica associada à CYP1A é o ensaio que mede a atividade da enzima EROD (7-Etoxiresorufina-O-desetilase) (Whyte et al., 2000). A Figura 4 mostra as etapas da indução da CYP1A por um xenobiótico. A indução de isoenzimas específicas se inicia pela ligação de um xenobiótico (XB) a um complexo protéico constituído pelo receptor aril hidrocarboneto (AhR) ligado a uma proteína HSP90 (heat-shock protein 90). Após a liberação da HSP90 o complexo AhR+XB liga-se a uma outra enzima, a hidrocaboneto aril nuclear transferase (ARNT), e então esse complexo é transferido do citoplasma da célula para o núcleo. No núcleo o complexo XB+AhR+ARNT liga-se a uma região específica do DNA, denominada de elemento de resposta a xenobiótico (XRE), localizada antes (upstream) do gene da CYP1A. Após a ligação do complexo ao DNA, fatores de transcrição conseguem acessar a região promotora do gene CYP1A e o RNAm, produto deste gene, é sintetizado (Stegeman et al., 1992).

A fase II de biotransformação envolve a conjugação do xenobiótico, na sua forma original ou seus metabólitos. Essa conjugação resulta no aumento da solubilidade dos contaminantes na água e conseqüentemente nas suas taxas de eliminação, reduzindo a probabilidade dos compostos tóxicos se ligarem a outras macromoléculas celulares, como o DNA.

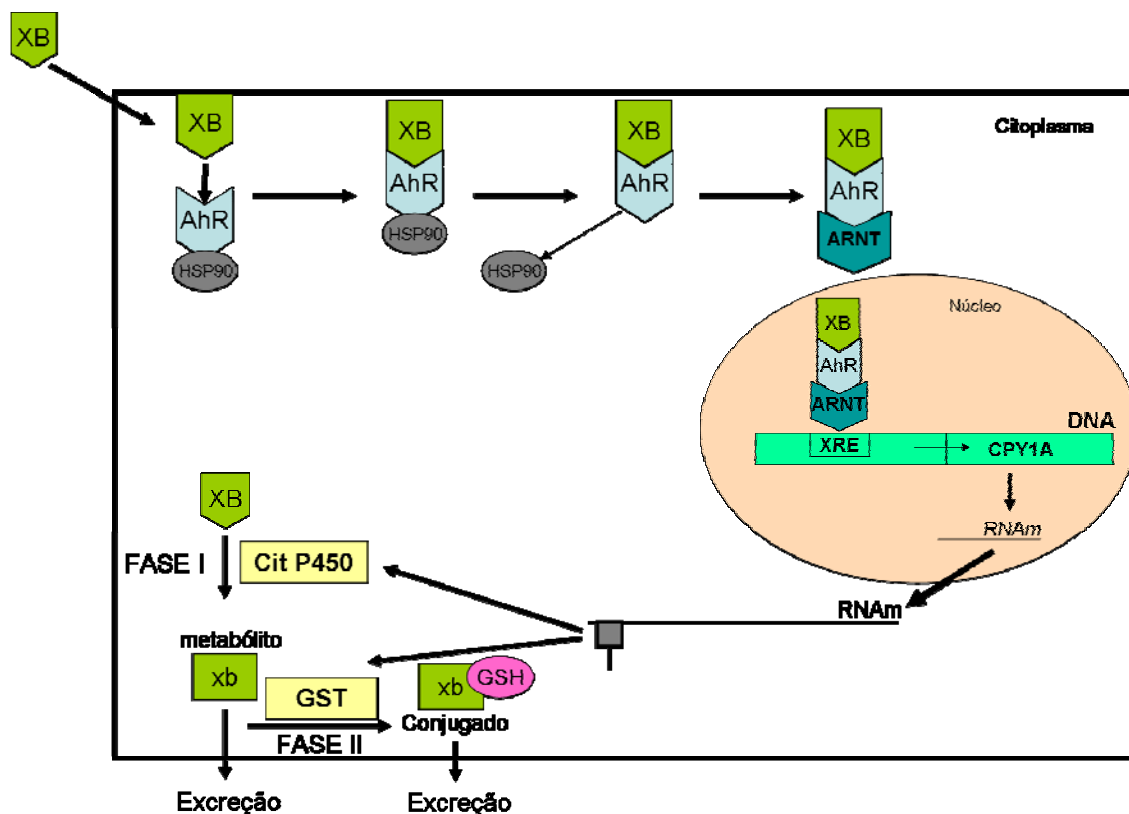


Figura 4. Esquema do mecanismo da indução do citocromo P450. XB, xenobiótico; AhR, receptor aril hidrocarboneto; HSP90, proteína 90 de choque térmico; ARNT, hidrocarboneto aril nuclear transferase; DNA, ácido desoxirribonucléico; Cit P450, citocromo P450; GST, glutationa-S-transferase; xb, xenobiótico metabolizado na fase I; GSH – tripeptídeo glutatona reduzida; XRE, elemento de resposta a xenobiótico; RNAm, ácido ribonucléico mensageiro. Baseado em Van der Oost et al., 2003 e Tompkins and Wallace, 2007.

A glutationa-S-transferase (GST) está principalmente relacionada com a conjugação e excreção de compostos tóxicos na chamada fase II de biotransformação, essa enzima é responsável por detoxificar os compostos tóxicos e/ou os metabólitos produzidos na fase I de biotransformação. A GST participa da detoxificação de contaminantes lipofílicos, pela ativação das reações de conjugação com substratos endógenos, no caso o tripeptídeo glutatona (GSH). A toxicidade de muitos poluentes pode ser modulada pela indução das GSTs (Van der Oost et al., 2003; Halliwell e Gutteridge, 2005). A Figura 4 mostra a GST catalizando a reação de conjugação do xenobiótico metabolizado na fase I com o tripeptídeo endógeno (GSH) para que este seja excretado. Por outro lado, muitos contaminantes ou seus metabólitos produzidos durante a biotransformação têm mostrado exercer efeitos tóxicos relacionados ao estresse oxidativo (Van der Oost et al., 2003).

Os danos oxidativos surgem quando os mecanismos de defesa do animal, responsáveis pela remoção das espécies reativas de oxigênio (ERO) são inadequados ou insuficientes, promovendo estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (ERO) como o radical ânion superóxido, o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio, são moléculas formadas a partir do metabolismo de compostos normais para os organismos ou do metabolismo de xenobióticos (Halliwell e Gutteridge, 2005). Os organismos aeróbicos apresentam diferentes mecanismos, enzimáticos e não enzimáticos, de defesa antioxidante que podem prevenir a formação das ERO, reagir com esses intermediários reativos, bem como reparar os danos causados pelos mesmos (Storey, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2005). Caso o sistema de defesa antioxidante esteja comprometido, pode ser estabelecido um desequilíbrio pró-oxidante celular, promovendo estresse oxidativo, que, por sua vez, está associado a vários processos patológicos e pode comprometer a sobrevivência dos organismos. Dentre os danos oxidativos podemos encontrar a peroxidação lipídica e danos no DNA. Esses danos são considerados biomarcadores importantes na avaliação da resposta de organismos expostos a xenobióticos (Di Giulio et al., 1995).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo endógeno que pode ser considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra lesões resultantes da exposição a agentes oxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2005). Além disto, a GSH é co-fator para a ação da enzima GST (Figura 5) que participa da detoxificação de agentes químicos, e da enzima GPx, que atua na eliminação de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (Di Giulio et al., 1995; Hermes-Lima, 2004). A glutathiona redutase (GR) é uma enzima chave no metabolismo da glutathiona reduzida, essencial na manutenção da homeostase GSSG/GSH sob condições de estresse oxidativo, visto que pela oxidação de um NADPH para NADP ela catalisa a forma oxidada da glutathiona (GSSG) para a forma reduzida (GSH) promovendo a reciclagem deste tripeptídeo (Van der Oost et al., 2003).

As superóxidos dismutases (SOD) constituem uma família de metaloenzimas responsável por catalisar a transformação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Existem diferentes tipos de SOD como a cobre e zinco (CuZn-SOD), que pode ser encontrada tanto no meio intracelular como no extracelular (Halliwell e Gutteridge, 2005). A catalase

(CAT) é uma enzima capaz de catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água e muitos estudos sugerem que esta enzima é mais efetiva para controlar o estresse oxidativo quando as concentrações de H_2O_2 estão muito elevadas (Hermes-Lima, 2004). O peróxido de hidrogênio é um composto potencialmente prejudicial dada sua capacidade de atravessar membranas biológicas e sua alta estabilidade. A GPx é uma enzima que além de catalisar o metabolismo do H_2O_2 também é responsável pelo metabolismo de um grande número de hidroperóxidos orgânicos, envolvendo a oxidação concomitante da GSH para a sua forma oxidada (GSSG). Esta enzima não é meramente complementar à catalase, mas desempenha um papel muito importante na inibição e/ou prevenção contra danos oxidativos nas células (Halliwell e Gutteridge, 2005). A Figura 5 apresenta uma pequena síntese de como o sistema de defesa antioxidante pode funcionar de maneira integrada. A SOD é responsável por catalisar a dismutação do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e este por sua vez pode ser degradado tanto pela CAT como pela GPx. A GSH pode atuar sozinha como antioxidante ou como substrato para as reações da GST e da GPx. A GR é importante para a reciclagem GSH. Essas ações ocorrem para que as ERO não provoquem dano oxidativos aos componentes celulares.

A gasolina é o principal combustível automotivo e é amplamente utilizada em todo o mundo. A contaminação da água por esse derivado de petróleo está relacionada a vazamentos pequenos, porém contínuos, a partir dos tanques de armazenamento em postos de distribuição de combustíveis. Esses vazamentos atingem corpos de água e, portanto é importante que se conheça o potencial tóxico da gasolina para organismos aquáticos. Entretanto, apesar do número relativamente elevado de estudos relacionados à toxicidade dos hidrocarbonetos de petróleo, há uma carência de dados sobre os efeitos da gasolina em espécies de peixes dulcícolas e estudos experimentais sobre os efeitos desse contaminante nos ecossistemas e em peixes neotropicais de água doce são necessários. Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da fração solúvel da gasolina nas enzimas de biotransformação e no sistema de defesa antioxidante do peixe neotropical *Prochilodus lineatus*.

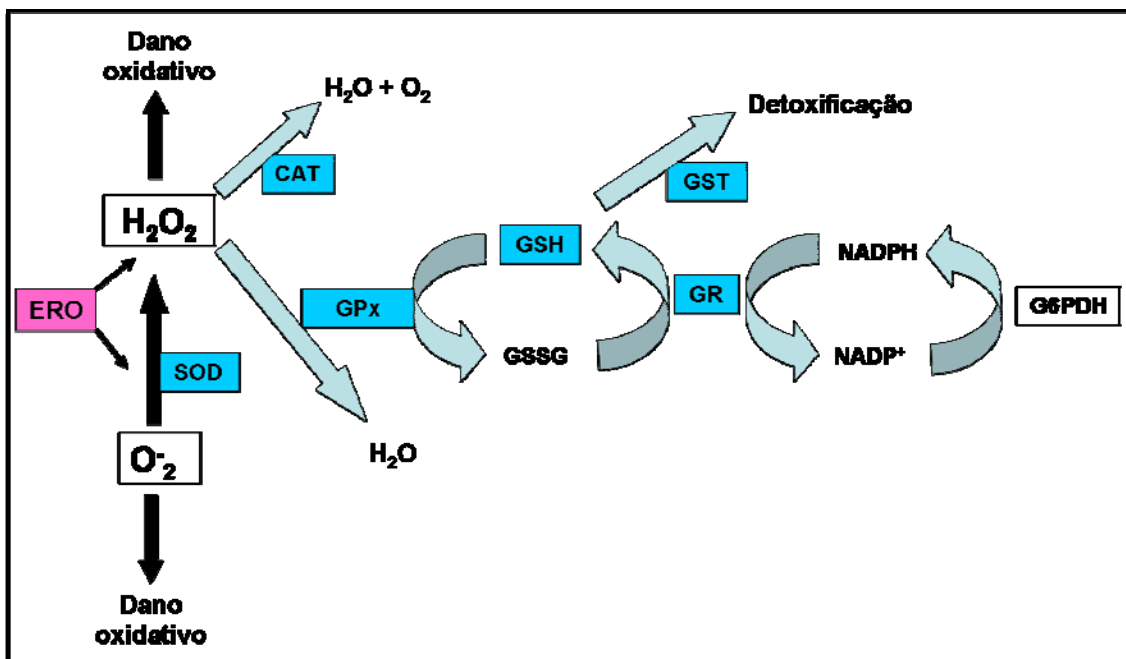


Figura 5. Esquema do mecanismo de defesa antioxidante para proteção das células contra as espécies reativas de oxigênio. Legenda: ERO, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GST, glutathione-S-transferase; GR, glutathione redutase; GPX, glutathione peroxidase; GSH, glutathione reduzida; GSSG, glutathione oxidada; O_2^- , radical ânion superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; H_2O , molécula de água; O_2 , oxigênio molecular. Adaptado de Hermes-Lima, 2004.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Preparação das amostras

A brânquia e o fígado foram pesados, homogeneizados (5x volume para as brânquias e 10x volume para o fígado) em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0), centrifugados (20 min, 13.200 g, 4 °C) e o sobrenadante foi separado para análises dos parâmetros bioquímicos. A concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

6.2.2. Análises das enzimas de biotransformação

A indução da CPY1A foi determinada pela análise da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD). O método adaptado de Eggens e colaboradores (1992) consiste da medida fluorimétrica em placa de 96 poços. A mistura de reação continha tampão fosfato de potássio 0,1 M; pH 7,6; NADPH 2 mM e 0,1 mM 7-etoxiresorufina. A reação foi iniciada pela adição da amostra (50 μ L de sobrenadante de brânquia ou de fígado) em 200 μ L da mistura de

reação. O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, era medida a cada minuto, durante 10 minutos (comprimento de onda de excitação de 530 nm e emissão 590 nm). A porção inicial linear da curva foi utilizada para avaliar a taxa de reação e a atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, baseada em uma curva padrão de resorufina.

A atividade da GST foi determinada seguindo-se a complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm (Keen et al., 1976). A atividade da enzima foi expressa em nmol CDNB conjugado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

6.2.3. Análises dos antioxidantes

A atividade da SOD foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em 550 nm de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade da enzima foi expressa em U de SOD por miligrama de proteína. Uma unidade de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50 % de inibição da taxa de redução do citocromo c.

A atividade da CAT foi determinada seguindo-se a velocidade de decomposição do H₂O₂, através do decréscimo de absorvância em 240 nm (Beutler, 1975). A atividade da enzima foi expressa em μmol H₂O₂ metabolizado. min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

A atividade da GPx selênio-dependente foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na oxidação do NADPH + H⁺ em presença de peróxido de hidrogênio, em 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em μmol NADPH oxidado. min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

A concentração de GSH foi determinada de acordo com o método de Beutler e colaboradores (1963). As amostras foram homogeneizadas com ácido tricloroacético (1:1 v/v com TCA 6 %). Após centrifugação (1.200 g) este sobrenadante acidificado foi adicionado a tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,0, contendo DTNB 0,25 mM (5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico) e a formação do ânion tiolato foi determinado a 412 nm. O conteúdo de GSH foi expresso em μg GSH.mg de proteína⁻¹, a partir de uma curva padrão de 10 a 200 μM de GSH.

A glutathiona redutase (GR) foi determinada indiretamente pela redução do NADPH mediante a presença da glutathiona oxidada (Carlberg e Mannervik, 1975), a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$

6.2.4. Análises da peroxidação lipídica

Os níveis de lipoperoxidação (LPO) tecidual foram estimados pela oxidação do Fe^{2+} na presença de xilenol laranja (ensaio FOX). Para este ensaio foi utilizada a metodologia proposta por Jiang e colaboradores (1991), que emprega o butil-hidroxitolueno na mistura de reação e as leituras de absorbância foram feitas em 560 nm. Os níveis de LPO foram expressos em $\mu\text{mol hidroperóxido de cumeno}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$, a partir de uma curva padrão para o hidroperóxido de cumeno (CHP).

6.2.5. Análise estatística

Os resultados obtidos para os grupos controle e experimental, em cada tempo de exposição, foram comparados entre si utilizando-se o teste paramétrico *t* de student's ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados. A opção para utilização de testes paramétricos ou não paramétricos baseou-se nas análises de normalidade e homogeneidade de variância. Foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Enzimas de biotransformação e defesa antioxidante no fígado

Os animais expostos à FSG apresentaram aumento significativo da EROD (Figura 6.A) nos tempos experimentais de 24 e 96 h, em comparação aos respectivos controles. A atividade da enzima GST apresentou aumento significativo nos animais expostos à FSG (Figura 6.B) nos três tempos experimentais, quando comparados com os respectivos grupos controles. A atividade da SOD (Figura 7.A) apresentou redução transitória nos animais expostos à FSG por 24 h. As atividades das enzimas de defesa antioxidantes CAT e GPx (Figura 7.B e C) apresentaram aumento significativo no fígado dos

animais exposto por 96 h à FSG. A concentração de GSH (Figura 8.A) no fígado dos animais expostos à gasolina foi significativamente maior após 24 h e 96 h de exposição, quando comparada com a do grupo CTR. A GR apresentou aumento significativo em 6 h de exposição e diminuição significativa em 24 h e 96 h nos animais expostos à FSG (Figura 8.B).

6.3.2. Enzimas de biotransformação e defesa antioxidante na brânquia

Os animais expostos à FSG apresentaram aumento significativo da EROD branquial nos tempos experimentais de 24 e 96 h, em comparação aos respectivos controles (Figura 9.A). A atividade da enzima GST apresentou aumento significativo nos animais expostos à FSG em todos os tempos experimentais, em relação aos respectivos controles (Figura 9.B).

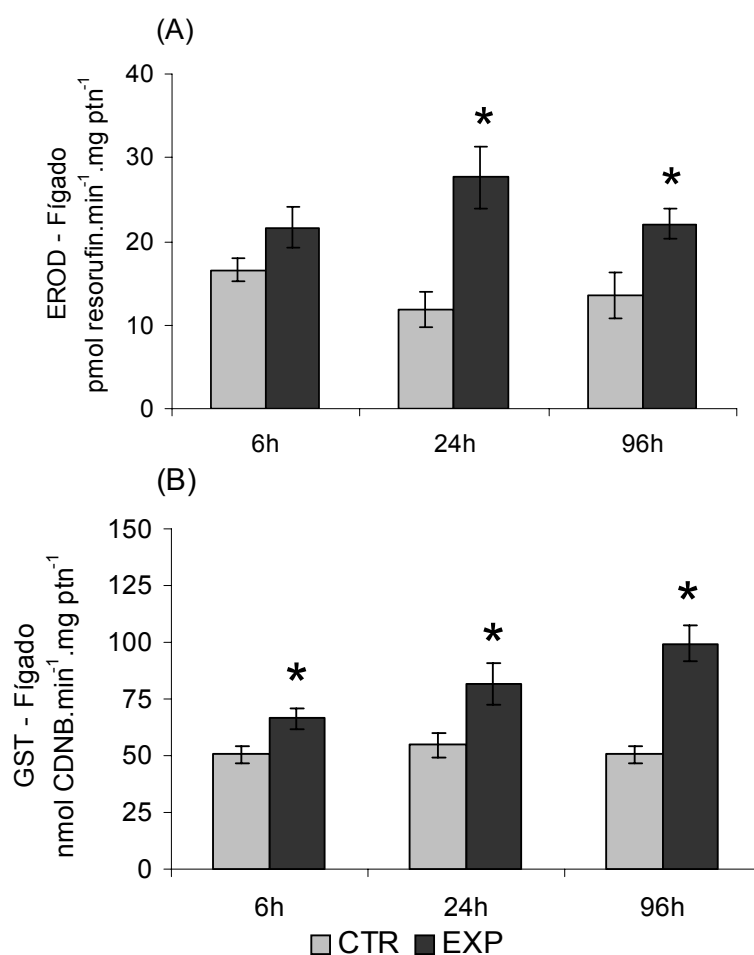


Figura 6. Atividade hepática da EROD (A) e da GST (B) de *Prochilodus lineatus* expostos à água (CTR) ou à FSG (EXP), durante 6, 24 e 96 h. * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

A SOD e GPx (Figura 10.A e C) não apresentaram alterações significativas nos animais expostos à FSG quando comparados aos grupos controle. Por outro lado, a atividade branquial da CAT (Figura 10.B) aumentou significativamente nos animais após 6 h e 24 h de exposição à FSG, quando comparada com a atividade da CAT nos animais dos respectivos grupos controle.

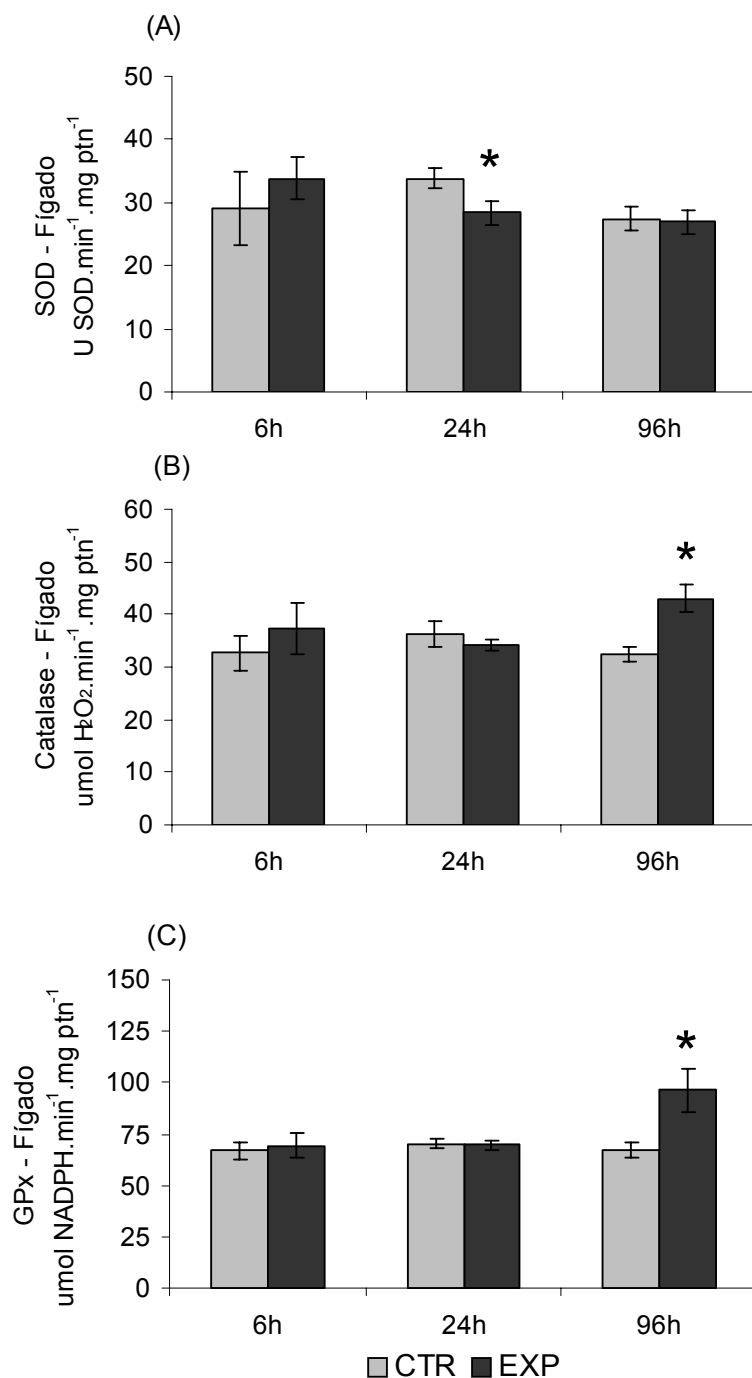


Figura 7. Atividade hepática da SOD (A), da Catalase (B) e da GPx (C) de *Prochilodus lineatus* expostos à água (CTR) ou à FSG (EXP), durante 6, 24 e 96 h. * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

A concentração de GSH nas brânquias dos animais expostos à FSG por 24 h foi significativamente maior em relação ao grupo CTR (Figura 11.A). A atividade da GR (Figura 11.B) não apresentou alteração significativa entre os animais expostos à FSG quando comparados ao grupo controle.

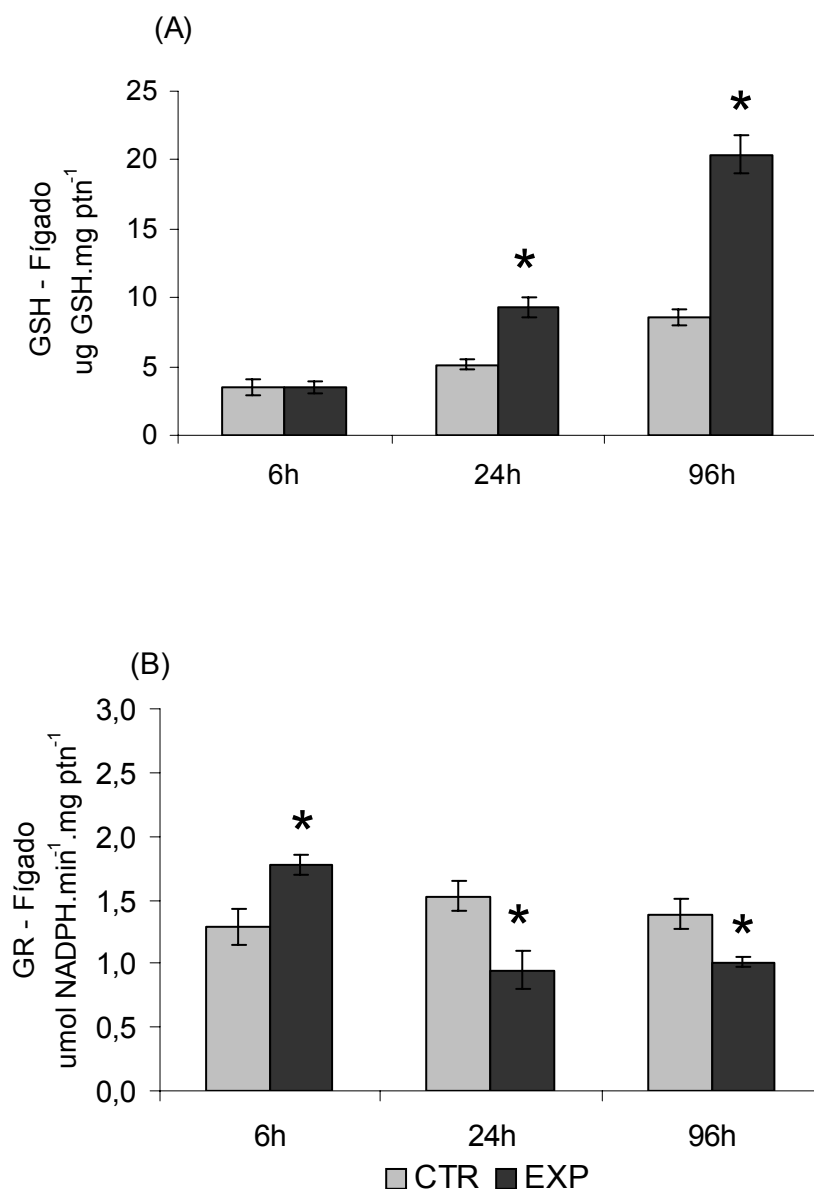


Figura 8. Concentração de GSH (A) e atividade da GR (B) no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos à água (CTR) ou à FSG (EXP), durante 6, 24 e 96 h. * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

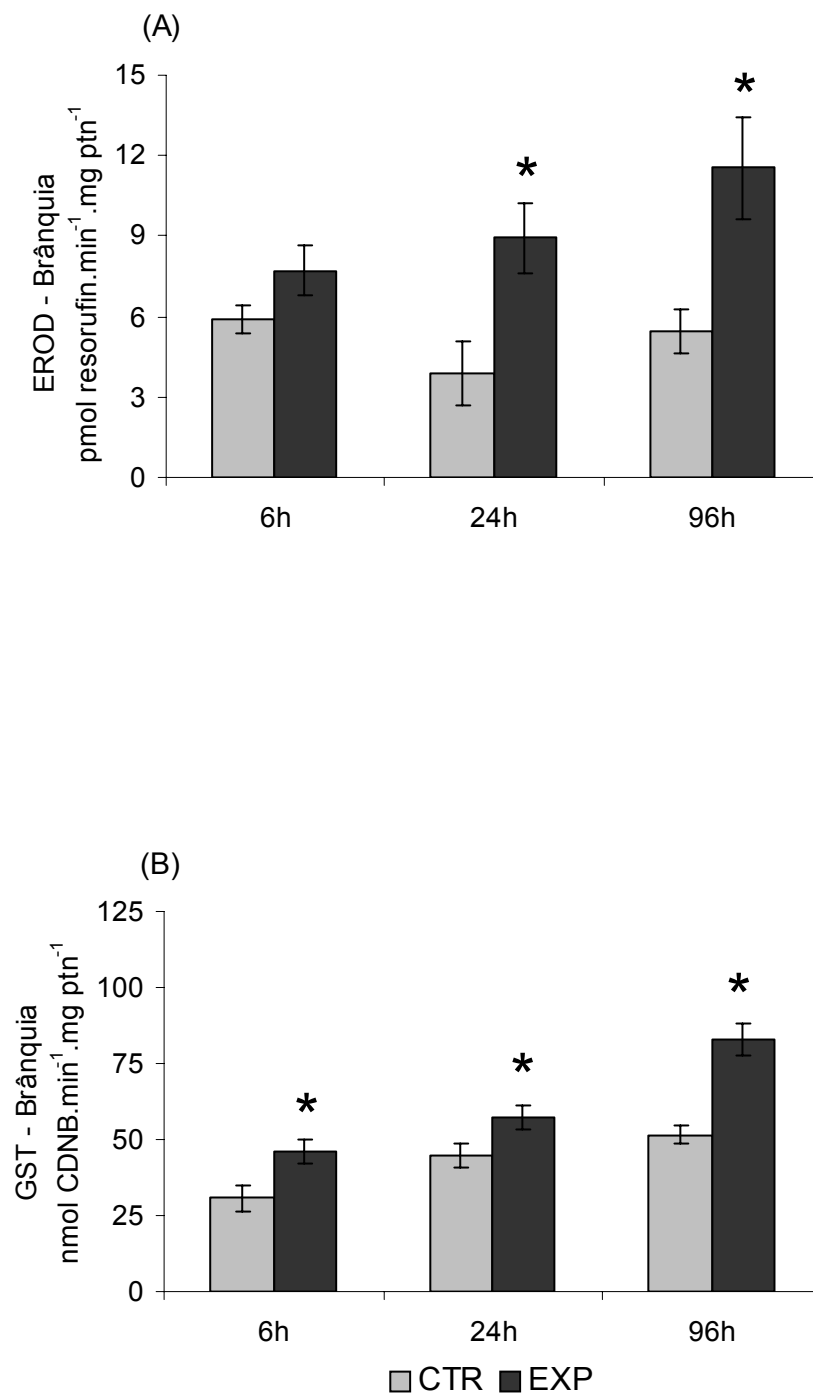


Figura 9. Atividade branquial da EROD (A) e da GST (B) de *Prochilodus lineatus* expostos à água (CTR) ou à FSG (EXP), durante 6, 24 e 96 h. * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

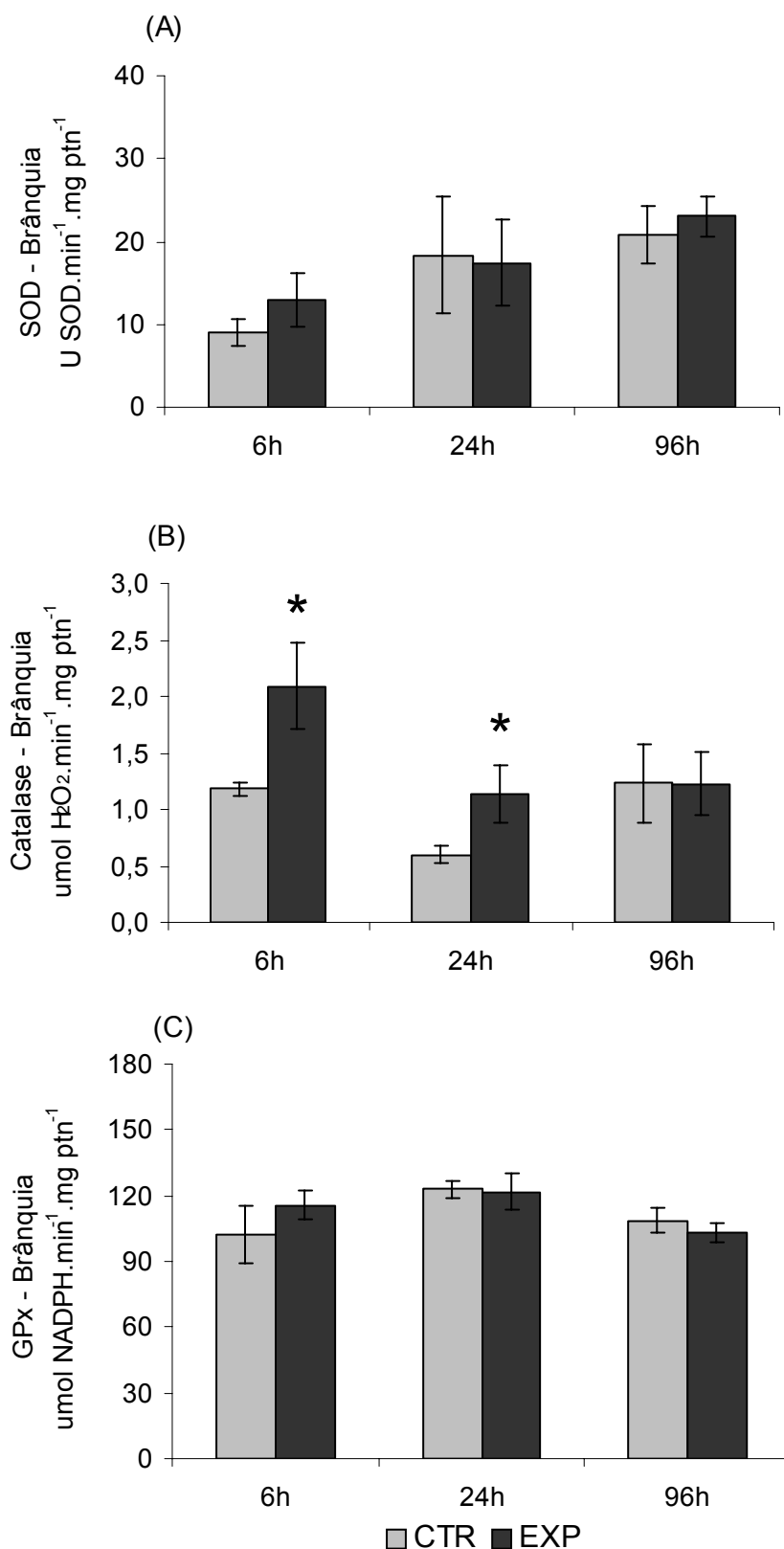


Figura 10. Atividade branquial da SOD (A), da Catalase (B) da GPx (C) de *Prochilodus lineatus* expostos à água (CTR) ou à FSG (EXP), durante 6, 24 e 96 h. * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

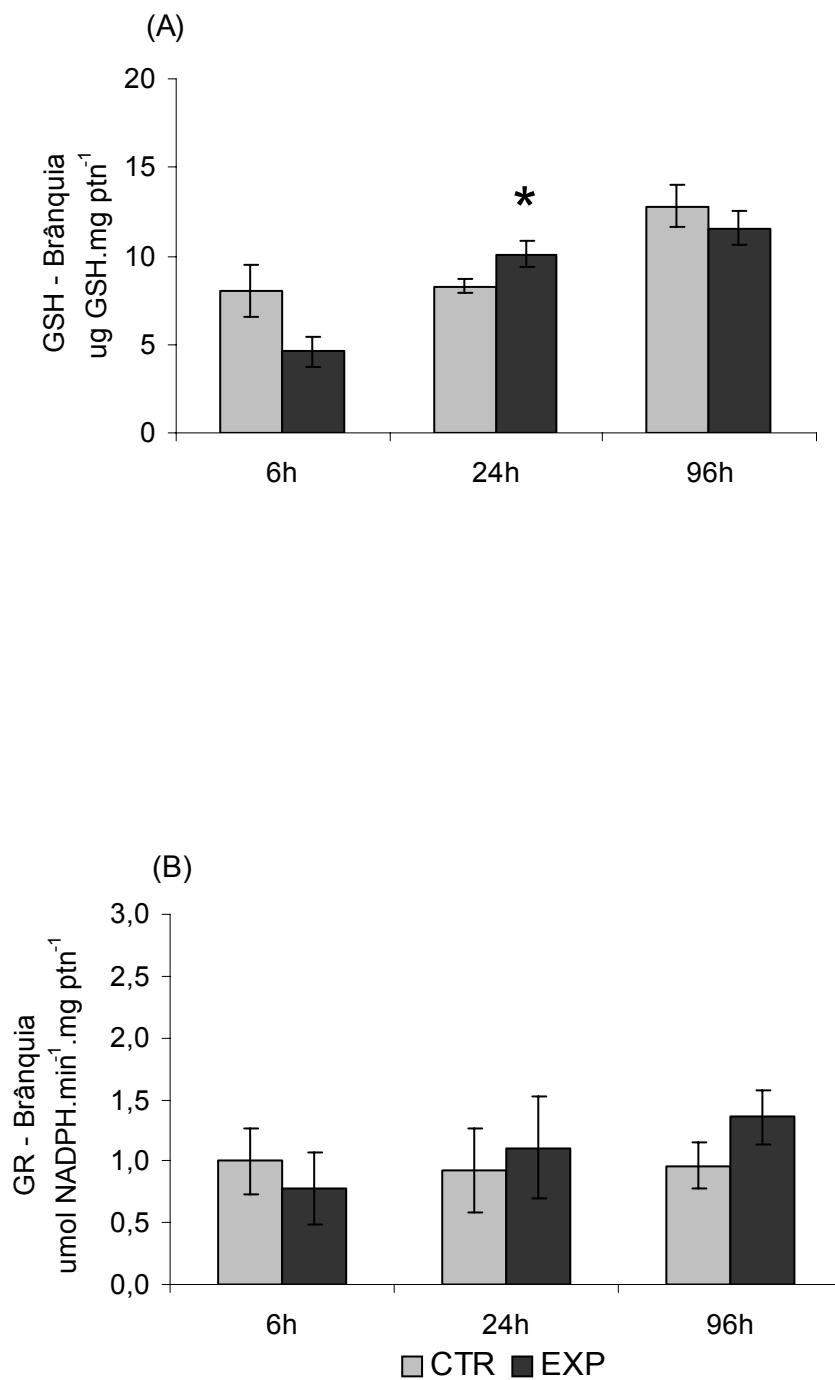


Figura 11. Concentração de GSH (A) e atividade da GR (B) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos à água (CTR) ou à FSG (EXP), durante 6, 24 e 96 h. * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

6.3.3. Lipoperoxidação no fígado e nas brânquias

Um aumento significativo de peroxidação lipídica foi detectado no fígado dos animais após 6 h de exposição à FSG (Figura 12.A). Enquanto que nas brânquias um aumento na peroxidação lipídica foi identificado somente após 96 h de exposição à FSG (Figura 12.B).

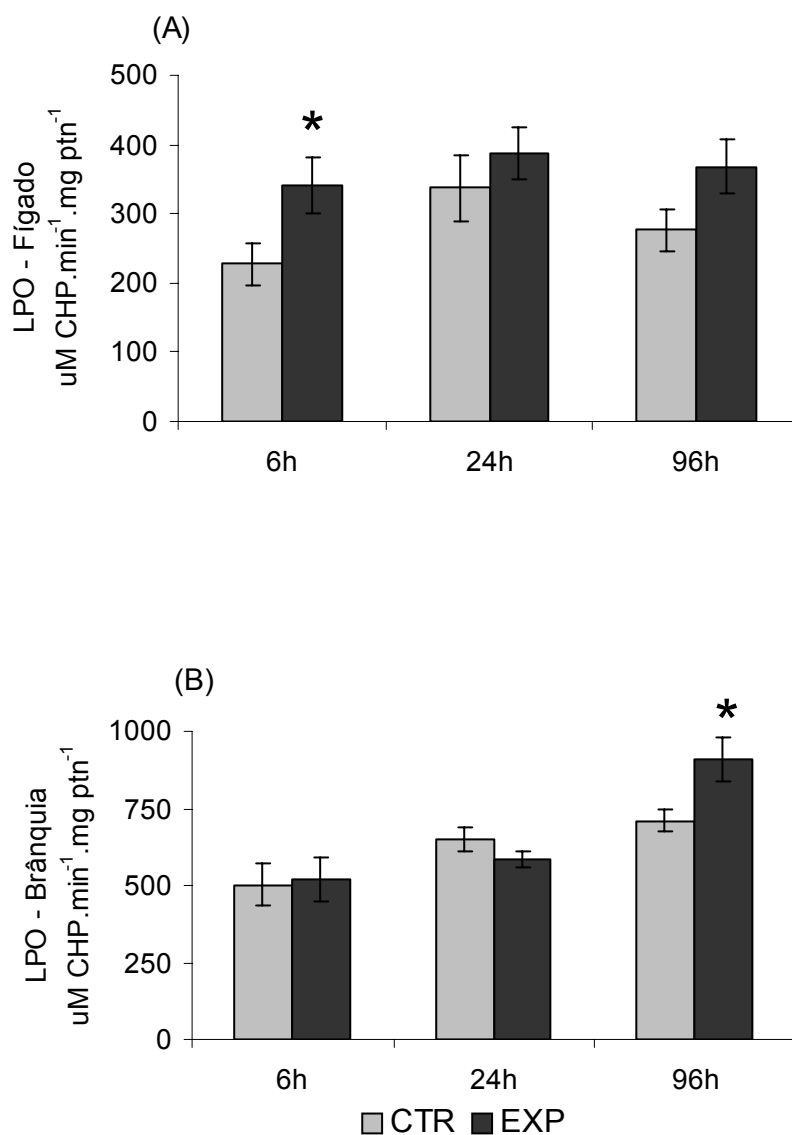


Figura 12. Concentração de hidroperóxido de cumeno no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos à água (CTR) ou à FSG (EXP), durante 6, 24 e 96 h. * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

4. Discussão

Alguns trabalhos já reportaram alterações significativas em parâmetros bioquímicos de peixes expostos à BTEX e HPA presentes em diferentes tipos de petróleo e/ou seus derivados. Nos trabalhos de Pacheco e Santos (2001 a e b), enguias (*Anguilla Anguilla*) expostas à fração solúvel da gasolina e do diesel apresentaram aumento significativo da EROD hepática. Bols e colaboradores (1999) também detectaram aumento da EROD em hepatócitos de trutas expostos a diferentes tipos de HPAs. Shukla e colaboradores (2007) encontraram acumulação de HPAs em brânquias, fígado, músculo e gônadas de *Tilapia mossambica* e Silva e colaboradores (2006) também encontraram naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno na bile de peixes demersais coletados no canal de São Sebastião, São Paulo.

Entretanto, ainda existe uma carência de dados sobre os efeitos dos derivados do petróleo, em especial da gasolina, em espécies de peixes dulcícolas neotropicais e por isso estudos experimentais do impacto desse contaminante nos ecossistemas e em peixes neotropicais de água doce, são importantes.

Alguns trabalhos recentes já demonstraram que a exposição da espécie de peixe *Prochilodus lineatus* à fração solúvel do óleo diesel promoveu ativação das vias de detoxificação, alterações hematológicas e metabólicas e ainda causou danos estruturais na brânquia e no fígado (Simonato et al., 2006 e 2008), além de danos no DNA e nos eritrócitos (Vanzella et al., 2007). Esses resultados demonstram a sensibilidade dessa espécie para derivados de petróleo. O presente trabalho é o primeiro a avaliar os parâmetros bioquímicos de um peixe dulcícola neotropical exposto à FSG, e os resultados mostraram que esta espécie também é sensível à gasolina. Neste trabalho as altas concentrações dos compostos monoaromáticos (BTEX) e de alguns HPAs, como o naftaleno, fenantreno e antraceno, encontradas na FSG estimularam a biotransformação, como mostrado pelo aumento da EROD e da GST, e promoveram alterações nos componentes enzimáticos e não-enzimáticos do sistema de defesa antioxidante do *P. lineatus*. Além disso, o sistema de defesa antioxidante não foi totalmente eficaz uma vez que ocorreu peroxidação lipídica em ambos os órgãos estudados.

O organismo possui duas formas principais de eliminar um composto químico: ou é excretado na sua forma original ou é biotransformado pelo organismo. A biotransformação geralmente leva a formação de um composto mais hidrofílico para que seja facilitada sua excreção. O órgão mais comumente relacionado à biotransformação de xenobióticos é o fígado (Jimenez e Stegeman, 1990; Van der Oost et al., 2003). No entanto, alguns autores também destacam a importância de outros órgãos detoxificantes, como os rins, o intestino e as brânquias (Jönsson et al., 2002). Os trabalhos desenvolvidos por Abrahamson e colaboradores (2007) e Jönsson e colaboradores (2009) mostraram a importância das brânquias no processo de detoxificação de xenobióticos. No presente trabalho, a indução da CPY1A indicada pelo ensaio da EROD mostrou a ocorrência do processo de biotransformação de fase I dos compostos da FSG nos tempos experimentais de 24 e 96 h nas brânquias e no fígado. Esses resultados reforçam a indução da CPY1A na presença de hidrocarbonetos aromáticos. O aumento da EROD já foi relatado em estudos anteriores em fígado (Pacheco e Santos, 2001a e 2001b; Benedetti et al., 2007) e em brânquias (Abrahamson et al., 2007; Jönsson et al., 2009) de peixes expostos a diferentes tipos de hidrocarbonetos. Nesta fase da biotransformação, um oxigênio molecular é incorporado ao substrato lipofílico RH, que corresponde ao xenobiótico, e, embora isto aumente sua solubilidade em água, o efeito mais importante é tornar o xenobiótico um substrato adequado para as reações de fase II. Nas reações de fase II, o composto resultante da fase I ou o xenobiótico original é conjugado com compostos endógenos, que torna o produto mais hidrossolúvel para que seja facilmente excretado (Di Giulio et al., 1995). A GST cataliza a conjugação com a GSH de compostos tóxicos na chamada fase II de biotransformação (Pandey et al., 2003). No presente trabalho, tanto o fígado como as brânquias apresentaram aumento significativo da GST em todos os tempos experimentais. Esses resultados mostraram que houve indução das enzimas de biotransformação de fase I e II em ambos os órgãos, reforçando a função do fígado no metabolismo de xenobióticos e indicando a brânquia como um importante órgão de detoxificação, além disso, indicam essas duas enzimas como bons biomarcadores para monitoramento de locais impactados com gasolina.

A biotransformação de xenobióticos é um mecanismo essencial para a eliminação de compostos tóxicos como já descrito acima, no entanto é uma importante fonte de ERO (Stegeman et al., 1992; Halliwell e Gutteridge, 2005). Assim, os organismos aeróbicos apresentam diferentes mecanismos, enzimáticos e não enzimáticos, que podem reagir com esses intermediários reativos, prevenir a formação dessas ERO, bem como reparar os danos causados pelos mesmos (Storey, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2005).

A indução da CAT hepática em 96 h e branquial após 6 e 24 h sugere um aumento na produção de peróxido de hidrogênio, devido a sua especificidade em remover este composto que é causador de danos celulares (Sturve et al., 2006). Segundo Hermes-Lima (2004) a catalase é mais requerida quando a concentração intracelular do H_2O_2 é muito elevada. Assim, esses resultados indicam um esforço do animal em combater o peróxido de hidrogênio produzido durante a exposição à FSG. Além disso, o aumento da CAT afeta a reação de Fenton e diminui a possibilidade de peroxidação lipídica (Bagnyukova et al., 2006). Apesar do aumento da atividade da CAT branquial é necessário atentar que a quantidade dessa enzima nas brânquias é muito menor quando comparada com o fígado. Segundo Wilhelm e colaboradores (1994) a brânquia pode apresentar mecanismos alternativos para a eliminação do peróxido de hidrogênio. Um possível aumento de peróxido de hidrogênio, indicado pela elevação da CAT em ambos os órgãos, provavelmente reflete um efeito da FSG, visto que essa ERO não foi gerada pela transformação do radical ânion superóxido pela SOD. Essa enzima não apresentou variação na brânquia, e no fígado mostrou diminuição em 24 h, o que pode refletir a inibição da SOD. O estresse oxidativo, provocado pela gasolina, pode causar modificações estruturais em enzimas, inativando-as (Che et al., 2007), e ainda há várias condições patológicas provocadas por ERO que causam diminuição na atividade da SOD (Hermes-Lima, 2004). Além disso, a SOD também apresenta sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, sendo inativada na presença desse composto (Sampson and Beckman, 2001), indicando que esta enzima é sensível às pequenas alterações do estado normal do organismo. O sistema SOD-CAT fornece uma importante linha de defesa contra as ERO (Pandey et

al., 2003), no entanto os resultados de SOD e CAT deste trabalho para ambos os órgãos, não apresentaram uma co-relação.

A GPx é uma enzima do sistema de defesa antioxidante que utiliza a GSH como co-fator, e também é responsável por catalisar a redução do H₂O₂ em água além de eliminar hidroperóxidos orgânicos (Van der Oost et al., 2003; Halliwell e Gutteridge, 2005) sendo assim muito importante para combater a formação de lipoperóxidos (Di Giulio et al., 1995). As brânquias não apresentaram alterações significativas na atividade da GPx após exposição à FSG, contudo o fígado apresentou aumento significativo desta enzima nos peixes expostos à FSG após 96 h, o que reflete a necessidade de eliminação de peróxido de hidrogênio e/ou de hidroperóxidos orgânicos hepáticos. O aumento na atividade das enzimas GPx e CAT hepáticas reforça a idéia de um acréscimo na quantidade de peróxido de hidrogênio neste órgão, provavelmente provocado pela exposição à FSG. Foi possível observar também que a quantidade de GPx branquial do *Prochilodus lineatus* foi quase duas vezes maior que a GPx hepática. Isto pode indicar que GPx branquial no *P. lineatus* pode atuar como reforço para a eliminação de ERO uma vez que a quantidade de CAT é muito pequena. No entanto, esse padrão não foi observado em outras espécies de peixes como em *Liza aurata* (Oliveira et al., 2008), em *Clarius gariepinus* e *Oreochromis mossambicus* (Siwela et al., 2009) e no *Wallago attu* (Pandey et al., 2003) onde a quantidade de GPx hepática sempre foi superior à GPx branquial.

A GSH é um tripeptídeo endógeno antioxidante que forma a primeira linha de defesa contra as ERO (Ahmad et al., 2000) participando de muitas reações celulares neutralizando diretamente os pro-oxidantes ou atuando em reações enzimáticas onde opera como substrato (Van der Oost et al., 2003; Halliwell e Gutteridge, 2005). O aumento significativo da concentração de GSH hepática durante 24 h e 96 h e da GSH branquial após 24 h de exposição à FSG indica o aumento da proteção do organismo contra o estresse oxidativo. Esse aumento da GSH pode também ser justificado, além da sua capacidade antioxidante individual, pela necessidade das enzimas GST e GPx, que requerem este tripeptídeo como substrato para as reações de biotransformação e de defesa antioxidante, respectivamente (Halliwell e Gutteridge, 2005).

Segundo Oliveira e colaboradores (2008) o fenantreno promoveu aumento da GSH nas brânquias e no fígado do peixe *Liza aurata*. Outros trabalhos também já mostraram o aumento na concentração de GSH em animais expostos à HPAs (Ahmad et al., 2003; Pandey et al., 2003). Stegeman e colaboradores (1992) afirmam que aumento na concentração de GSH pode ocorrer por duas vias: pelo aumento na atividade da GR, que converte GSSG em GSH ou pelo aumento de sua síntese. No presente trabalho provavelmente ocorreu um aumento na síntese de GSH uma vez que a GR branquial não apresentou variação e a GR hepática apresentou aumento somente nos animais expostos à FSG após 6 h. Além disso, foi observada a diminuição da GR hepática após 24 e 96 h de exposição. O aumento da GR hepática em 6 h reflete a necessidade de reciclar GSH através da redução da glutationa oxidada (GSSG) (Van der Oost et al., 2003). Contudo a inibição provavelmente ocorreu devido a uma sensibilidade desta enzima aos compostos presentes na FSG ou a uma ERO gerada pela presença deste xenobiótico. Segundo Bagnyukova e colaboradores (2006) a GR é sensível à presença do peróxido de hidrogênio e do radical ânion superóxido. E como vimos é possível que a FSG possa ter provocado um aumento na quantidade de peróxido de hidrogênio uma vez que a CAT e GPx hepáticas apresentaram ativação em 96 h. Além disso, a diminuição da GR também pode estar relacionada a uma redução da disponibilidade de NADPH (Stegeman et al., 1992), muito requerido durante as reações de biotransformação de fase I (Di Giulio et al., 1995), que neste trabalho mostrou ativação como indicado pela indução da CPY1A (aumento da EROD) nos mesmos tempos experimentais (24 e 96 h).

Quando o sistema de defesa antioxidante é insuficiente ou inativado podem ocorrer danos oxidativos como a peroxidação lipídica, responsável por alterar a permeabilidade de membranas podendo causar danos ou até morte celular (Hermes-Lima, 2004). O ensaio FOX indicou peroxidação lipídica no fígado após 6 h, e na brânquia após 96 h nos animais expostos à FSG, demonstrando que houve dano oxidativo nestes órgãos. Segundo Ahmad e colaboradores (2003) a exposição ao naftaleno também promoveu peroxidação lipídica em diversos órgãos de *Anguilla Anguilla*, e os danos foram órgãos-dependentes, indicando o fígado como melhor adaptado sendo seguido pelo

rim e brânquias considerados mais vulneráveis. Observando os resultados quanto à linha de defesa antioxidante no fígado após 6 h, e na brânquia após 96 h, foi possível observar que não houve ativação das enzimas CAT, GPx e SOD e tampouco aumento no conteúdo de GSH. Sendo assim, pode-se inferir que o sistema de defesa antioxidante foi insuficiente para ambos os órgãos nestes tempos experimentais, e as ERO geradas pela presença da FSG promoveram danos peroxidativos. Isso pode indicar uma melhor adaptação do fígado para exposições mais prolongadas (após 24 h) e segundo Oliveira e colaboradores (2008) a GSH e a GPx são consideradas as duas primeiras linhas de defesa e muito importantes para impedir a peroxidação lipídica, e no fígado ambas estavam ativadas nos tempos experimentais onde não ocorreu danos oxidativos. No caso das brânquias, por representarem o primeiro órgão de contato com os contaminantes presentes na água e como tal, uma via de entrada de poluentes dada sua grande superfície de contato e permeabilidade (Wendelaar Bonga, 1997), as defesas antioxidantes foram ativadas logo no início da exposição à FSG e foram capazes de impedir a ocorrência de peroxidação lipídica nos tempos iniciais (6 e 24 h), além da possibilidade da brânquia possuir mecanismos diferentes para a eliminação das ERO, como já mencionado.

5. Conclusão

Os resultados mostraram que os hidrocarbonetos mono e poliaromáticos presentes na FSG 5 % promoveram ativação das enzimas de biotransformação de fase I e II, tanto no fígado como nas brânquias, confirmando o importante papel do fígado nestes processos de eliminação de compostos tóxicos e ressaltando o papel da brânquia como órgão detoxificante. Além disso, estes parâmetros mostraram-se eficientes para avaliar os efeitos tóxicos dos componentes presentes na gasolina, mesmo em baixas concentrações para peixes. O sistema de defesa antioxidante foi mais eficiente no fígado do que nas brânquias. Ainda assim, ambos os órgãos estudados apresentaram ocorrência de peroxidação lipídica em um dos tempos experimentais, o fígado após 6 h, e as brânquias somente após 96 h de exposição à FSG. Isso pode indicar uma melhor adaptação do fígado para exposições mais prolongadas (após 24 h). No caso das brânquias, por se tratar do primeiro órgão de contato

com os xenobióticos, as defesas antioxidantes foram capazes de impedir a ocorrência de peroxidação lipídica nos tempos iniciais (6 e 24 h). Os resultados ainda apontam para o importante papel da GSH como defesa antioxidante em ambos os órgãos, visto que quando sua concentração apresentou-se aumentada, não houve dano oxidativo.

7. CAPÍTULO II

**Efeitos da fração solúvel da gasolina em parâmetros hematológicos,
metabólicos e osmo-iônicos no peixe *Prochilodus lineatus***

7.1. INTRODUÇÃO

As brânquias representam o primeiro órgão de contato com os contaminantes presentes na água e como tal, uma via de entrada de poluentes dada sua grande superfície de contato e permeabilidade (Wendelaar Bonga, 1997). Estudos confirmaram que a principal via de absorção de hidrocarbonetos dissolvidos na água é pelas brânquias, por elas constituírem um órgão muito dinâmico e diretamente exposto às águas contaminadas (Ahmad et al., 2003). Este órgão apresenta uma variedade de funções nos peixes de água doce, além de ser o principal responsável pelas trocas gasosas e excreção de resíduos metabólicos, também é responsável pela regulação de íons e equilíbrio ácido-base (Mayer-Gostan et al., 1987; Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Heath, 1995, Goss et al., 1998, Hwang e Lee, 2007).

Muitos agentes estressores afetam a estrutura branquial e, direta ou indiretamente, as trocas gasosas e o balanço hidromineral, que constituem as principais razões para a vulnerabilidade destes animais em águas poluídas (Schwaiger et al., 1997; Wendelaar Bonga, 1997). Por representar a barreira entre meio externo e meio interno, este tecido é altamente susceptível às alterações ambientais (Wendelaar Bonga e Lock, 2008). Sendo assim, as brânquias são consideradas como órgãos-alvo para os efeitos imediatos dos produtos químicos diluídos na água (Oliveira et al., 2008).

A osmorregulação é essencial para a sobrevivência de peixes dulcícolas, uma vez que o ambiente em que vivem proporciona um alto gradiente iônico, favorecendo as perdas de íons (Wendelaar Bonga e Lock, 2008). As alterações nos órgãos diretamente envolvidos na osmorregulação, como as brânquias, podem promover distúrbios no balanço iônico. Assim, os níveis de íons no sangue determinados pela osmolaridade ou concentrações iônicas específicas, são biomarcadores sensíveis e muito utilizados em peixes expostos à agentes químicos em concentrações subletais (Wendelaar Bonga e Lock, 2008).

Os peixes de água doce captam íons ativamente pelas brânquias, dentre eles o Ca^{2+} , Na^+ e Cl^- (Mayer-Gostan et al., 1987; Bindon et al., 1994; Hirose et al., 2003). E essa regulação iônica praticada pelas brânquias se dá principalmente em função da presença das células-cloreto (CC), (Bindon, et al., 1994; Hirose et al., 2003) localizadas normalmente nos filamentos branquiais,

próximo à base das lamelas (Perry, 1997). As CC desempenham um papel essencial na manutenção de um ambiente interno ionicamente equilibrado absorvendo Na^+ e Cl^- (Bindon et al., 1994). Estas células são ricas em mitocôndrias e possuem diversas ATPases como a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e a Ca^{2+} -ATPase, também possuem canais de Ca^{2+} e Na^+ , além de trocadores como $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ o que reflete sua importância no transporte de íons nas brânquias (Perry, 1997; Claiborne et al., 2002). A Figura 13 ilustra as principais vias de tomada de íons em peixes de água doce. Para extrair Na^+ e Cl^- da água para o plasma, ambos os íons são movidos contra um gradiente eletroquímico. O Na^+ entra passivamente pelos canais de sódio devido a um gradiente elétrico favorável estabelecido pela H^+ -ATPase que acidifica a camada mais externa. A anidrase carbônica hidrata o CO_2 extraído do sangue e libera H^+ e HCO_3^- . A tomada de Cl^- ocorre via membrana apical pelo trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e a saída do Cl^- para o sangue ocorre via canais na membrana basolateral. E a NKA faz a tomada ativa de K^+ , que havia saído a favor do gradiente, e retira Na^+ que entrou passivamente (Evans e Claiborne, 2009)

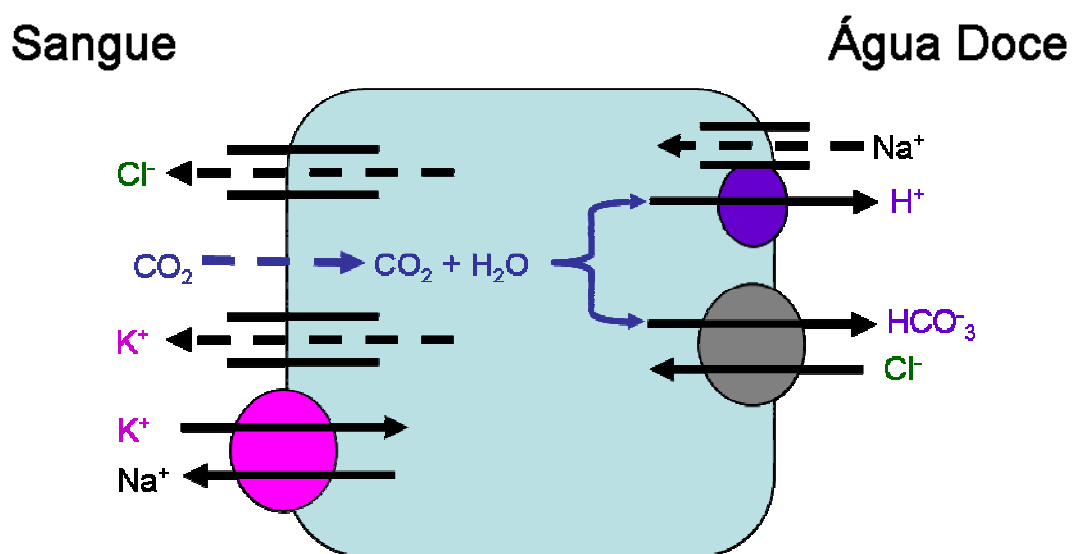


Figura 13. Esquema da tomada de íons através das células-cloreto de peixes de água doce. Baseado em Evans (1987) e Lingwood e colaboradores (2006). Legenda: círculo rosa (Na^+/K^+ -ATPase); círculo roxo (H^+ -ATPase); círculo cinza (trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$); setas tracejadas (transporte de íons via canais, a favor de um gradiente).

Distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica são aspectos característicos de estresse em peixes e ocorrem devido à íntima relação entre os fluidos corpóreos nas brânquias e o ambiente aquático (Wendelaar Bonga,

1997). Portanto, a osmolaridade plasmática e as concentrações individuais de diferentes íons, complementados pelos resultados de quantidade de CC e da atividade da NKA, são exemplos de parâmetros importantes como indicadores de efeitos subletais de poluentes em peixes.

A presença de produtos químicos no ambiente aquático também pode desencadear diversas respostas fisiológicas, coletivamente denominadas resposta de estresse, que são amplamente utilizadas como biomarcadores. Essa resposta representa a percepção de um estado alterado que deflagra respostas neuro-endócrinas que fazem parte de uma cadeia de reações generalizada promovidas por um estresse. Nos peixes, as respostas neuro-endócrinas, denominadas respostas primárias, incluem a rápida liberação de hormônios na circulação, como as catecolaminas e o cortisol. As catecolaminas são liberadas a partir do tecido cromafim localizado no rim cefálico (anterior) e também das terminações dos nervos adrenérgicos (Iwama et al., 2006). O cortisol é liberado a partir do tecido interrenal, localizado também no rim anterior em resposta a vários hormônios hipofisários, principalmente o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Seguidamente ocorre a chamada resposta secundária de estresse que compreende vários ajustes bioquímicos e fisiológicos associados e mediados por esses hormônios. Essa resposta secundária resulta em alterações hematológicas, osmo-iônicas e metabólicas, como a hiperglicemia, entre outras (Wendelaar Bonga, 1997; Iwama et al., 2006). O estresse é um processo que requer muita energia do organismo exposto e as alterações nas concentrações de glicose plasmática, proteínas plasmáticas e do glicogênio hepático ocorrem para que o organismo possa atender a esse aumento na demanda energética e essas alterações são indicadores de resposta secundária de estresse, amplamente utilizadas como biomarcadores (Iwama et al., 2006).

Alterações nos parâmetros hematológicos também podem ocorrer como consequência da resposta neuro-endócrina ou como um efeito direto do poluente nas células sanguíneas. As alterações hematológicas de peixes são importantes porque refletem qualquer mudança ambiental ocorrida, desta forma estes parâmetros podem ser bons indicadores da saúde de animais aquáticos expostos a contaminantes (Davison et al., 1993). Alterações em parâmetros hematológicos já foram encontradas em peixes expostos a diferentes tipos de

petróleo e derivados. Alkindi e colaboradores (1996) encontraram em linguados (*Pleuronectes flesus*) expostos à fração solúvel do óleo cru aumento no hematócrito e no conteúdo de hemoglobina. Entretanto, após 24 h e 48 h, esses parâmetros diminuíram. Por outro lado, Davison e colaboradores (1992 e 1993) observaram que o peixe antártico *Pagothenia borchgrevinki* exposto à fração solúvel do diesel, tanto em testes agudos como crônicos, apresentou aumento no hematócrito e na concentração de hemoglobina. Assim, fica evidente que as alterações nos parâmetros hematológicos podem variar entre espécies e poluentes diferentes, e outras informações, como por exemplo, concentrações iônicas e osmolaridade e são necessárias para poder se definir uma interrelação entre o poluente e as alterações ocorridas.

Se por um lado as respostas de estresse estimulam mecanismos adaptativos durante uma exposição aguda ao xenobiótico, a exposição crônica pode resultar em danos ao sistema de defesa, crescimento e capacidade reprodutiva dos peixes (Wendelaar Bonga, 1997). Por isso, a avaliação destes parâmetros fisiológicos em peixes expostos a contaminantes ajuda a antecipar e prevenir danos para populações inteiras.

Com base no exposto, o presente trabalho visou analisar os parâmetros metabólicos, hematológicos, osmo-iônicos e enzimáticos a fim de avaliar os efeitos e/ou respostas de *Prochilodus lineatus* expostos à FSG. A espécie *P. lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), popularmente conhecida como curimba, é uma espécie nativa das regiões Sul e Sudeste do Brasil, considerada uma das mais importantes da bacia do rio Paraná. Além de seu valor ecológico, é também economicamente importante para a região (Cazenave et al., 2009). Alguns trabalhos realizados têm demonstrado que essa espécie é muito sensível a diferentes contaminantes (Carvalho e Fernandes 2008; Camargo et al., 2009; Modesto e Martinez, 2010), inclusive aos derivados de petróleo (Simonato et al., 2006 e 2008), e por isso é considerada como um potencial bioindicador para monitoramentos ambientais.

7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1. Análises hematológicas

Alíquotas do sangue foram utilizadas para determinar os valores de hematócrito (Hct) pela técnica de microhematócrito, usando tubos capilares heparinizados e centrifugados (5 min a 1.200 g) em centrífuga apropriada. O conteúdo de hemoglobina (Hb) foi determinado pelo método da cianometahemoglobina, em espectrofotômetro, a 540 nm, utilizando-se kit comercial (Analysa, Brasil). A quantidade de células vermelhas (RBC) foi determinada a partir de uma alíquota de sangue total fixada em tampão formol-citrato (0,13 M de citrato de sódio diluído em 0,4 % de formol), usando-se uma câmara de Neubauer espelhada, em microscópio de luz (aumento de 400x).

7.2.2. Concentrações plasmáticas de cortisol, glicose e proteínas

O cortisol plasmático foi determinado pelo ensaio imunoenzimático (kit comercial Diagnostic Systems, Laboratories, USA) e as leituras de absorvância foram feitas em leitora de microplacas a 450 nm. A concentração de glicose foi determinada pelo método da glicose-oxidase em espectrofotômetro, 505 nm (kit comercial Labtest, Brasil). A concentração plasmática de proteína total foi determinada de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, leitura em espectrofotômetro a 700 nm.

7.2.3. Análises osmo-iônicas

Alíquotas de plasma foram usadas para determinar a concentração dos íons Na^+ e K^+ em fotômetro de chama (Analyzer, Brasil). A concentração do íon Cl^- foi determinada pelo método que utiliza o tiocianato de mercúrio em espectrofotômetro a 470 nm (kit comercial, Analisa, Brasil). A osmolaridade foi determinada por congelamento utilizando-se osmômetro (Osmomat 030, Gonotec, Germany).

7.2.4. Identificação das células-cloreto nas brânquias

O número de CC nas brânquias foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Dang e colaboradores (2000). Imediatamente após serem retiradas, as brânquias foram lavadas com solução salina (sacarose 0,026 M e NaCl 0,15 M; pH 7,4). Quatro arcos branquiais foram fixados em solução de Bouin por 6 horas, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e

incluídos em parafina. As lâminas histológicas foram desparafinadas e reidratadas em série decrescente de etanol e lavadas em Tris-salino + Triton (TBS-T). Os cortes foram pré-incubados com soro de cabra 20 % para bloquear sítios de ligação não específicos e, posteriormente, foram incubados durante 15 h em câmara úmida a temperatura ambiente, com o anticorpo monoclonal de camundongo contra Na^+/K^+ -ATPase (IgG α 5, Development Studies Hydrion Bank, University of Iowa, USA) diluído 1:300. Após lavagem com TBS-T, os cortes foram incubados com o segundo anticorpo, de cabra anti-camundongo (GAM, Sigma), diluído 1:150. Posteriormente os cortes foram lavados com TBS-T, incubado com o anticorpo peroxidase anti-peroxidase (PAP/mouse, Sigma), diluído 1:800 durante 1h e, então, lavados em tampão Tris (TB). O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado após coloração com DAB-Ni (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) e peróxido de hidrogênio (0,03 %). Os controles negativos para o primeiro e o segundo anticorpo foram obtidos suprimindo-se a aplicação do primeiro anticorpo em uma lâmina e o segundo em outra. Os cortes foram desidratados, as lâminas foram montadas e após secagem, foram observadas em microscópio de luz. As células-cloreto foram quantificadas em relação ao comprimento do filamento (mm) de acordo com sua localização: no filamento (CCF) ou nas lamelas (CCL), usando fotomicroscópio (DM 2500, Leica, Germany) e um analisador de imagens (Leica, *Qwin*, Germany). Para cada corte do mesmo peixe, 5 filamentos foram escolhidos aleatoriamente, medidos e tiveram as CC quantificadas. Os resultados foram expressos como número CC por mm de filamento.

7.2.5. Atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias

Após lavagem, os arcos branquiais foram transferidos para tubos plásticos contendo tampão SEI (Sacarose 300 mM; EDTA 0,1 mM; Imidazol 30 mM; β -mercaptoetanol 0,035 %; pH 7,4) e depois congelados (-20 °C) até o momento do ensaio enzimático. Os filamentos branquiais foram homogeneizados com tampão SEI (10x o volume) e centrifugados (7800 g, 15 min, 4° C). O sobrenadante foi usado para determinar a atividade da enzima NKA segundo método descrito por Quabius e colaboradores (1997) e adaptado para leitora de microplacas por Nolan (2000). O ensaio consiste em determinar a liberação de fosfato pelas amostras incubadas em tampão (NaCl 100 mM; MgCl_2 8 mM;

imidazol 30 mM; EDTA 0,1 mM; ATP 3 mM; pH 7,6) contendo KCl (13 mM) ou ouabaína (2,5 mM). Uma solução de fosfato de 0,65 mM (Sigma) foi usada como padrão e as amostras foram analisadas em triplicatas a 620 nm em uma leitora de microplacas (ELX 800, BioTek, USA). A atividade da NKA foi expressa como $\mu\text{mol Pi. mg.proteína}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

7.2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos para os grupos controle e experimental, em cada tempo de exposição, foram comparados entre si utilizando-se o teste paramétrico *t* de Student's ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados. A opção para utilização de testes paramétricos ou não paramétricos baseou-se nas análises de normalidade e homogeneidade de variância. Foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Parâmetros hematológicos

Os peixes expostos à FSG por 96 h apresentaram valores de hematócrito (Figura 14.A) e hemoglobina (Figura 14.B) significativamente menores que os respectivos CTR. Os valores de RBC (Figura 14.C) dos peixes expostos à FSG apresentaram diminuição significativa nos tempos experimentais de 24 e 96 h em relação aos respectivos CTR.

7.3.2. Parâmetros metabólicos

A glicose plasmática dos animais expostos à FSG apresentou aumento significativo em relação aos controles nos três tempos experimentais (Figura 15.A). Os valores de proteína plasmática apresentaram diminuição em 24 h nos peixes expostos à FSG quando comparados aos respectivos controles (Figura 15.B). O cortisol plasmático não mostrou variação entre os grupos amostrados (Figura 15.C).

7.3.3. Parâmetros osmo-iônicos

A osmolaridade plasmática (Figura 16.A) foi significativamente maior nos animais expostos à FSG durante 24 h e 96 h, quando comparados aos respectivos grupos controles. O conteúdo de Na^+ plasmático (Figura 16.B) apresentou aumento significativo somente após 24 h de exposição à FSG quando comparado ao grupo controle. Nos animais expostos à FSG durante 96 h a concentração plasmática do K^+ (Figura 16.C) foi significativamente maior do que nos peixes do grupo CTR. A concentração plasmática de Cl^- não apresentou variação significativa entre os grupos nos diferentes tempos experimentais (Figura 16.D).

7.3.4. Identificação das células-cloreto nas brânquias

As fotos da Figura 17 mostram as CC identificadas pela reação de imunohistoquímica dos animais após exposição de 24 h à água (CTR) ou à FSG (EXP). Nos animais do grupo controle (Figura 17.A) as CC estão presentes preferencialmente na base da lamela junto ao filamento. Entretanto, nos animais do grupo experimental (Figura 17.B) as CC apresentaram-se em maior número e distribuídas principalmente nas lamelas.

A Figura 18 mostra esse aumento significativo no número de CC nas lamelas (CCL) dos peixes expostos à FSG durante 24 h, após comparação com os animais CTR. A somatória das CC encontradas no filamento e nas lamelas, denominada número total de CC (TCC), aumentou significativamente nos animais expostos à FSG durante 24 h, em relação ao grupo CTR. Nos demais tempos experimentais não foi encontrada variação entre os grupos.

7.3.6. Atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias

A atividade da enzima NKA nas brânquias dos peixes expostos à FSG durante 24 e 96 h apresentou um aumento significativo em comparação com os respectivos grupos CTR (Figura 19)

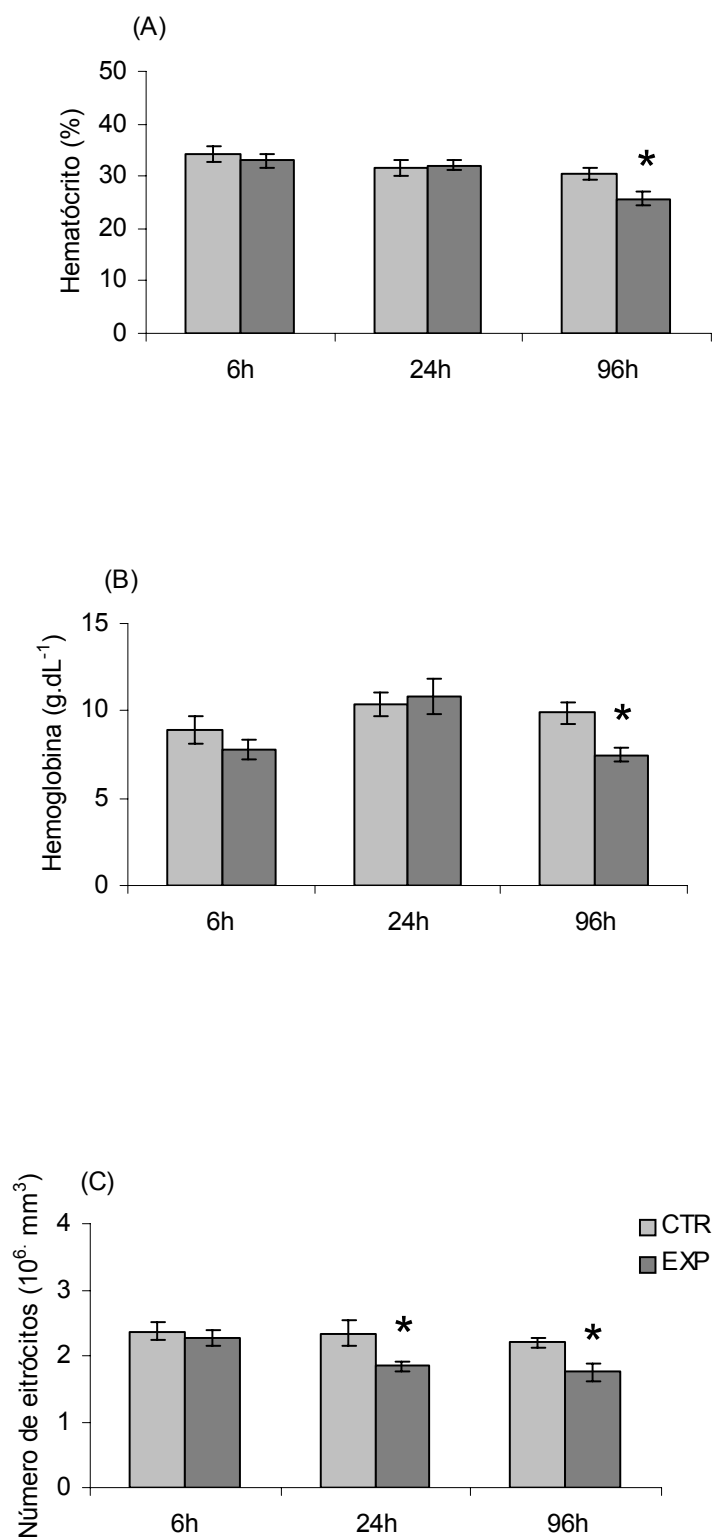


Figura 14. Hematócrito (A), hemoglobina (B) e número de eritrócitos (C) de *Prochilodus lineatus* expostos durante 6, 24 e 96 h à FSG (EXP) ou apenas à água (CTR). * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

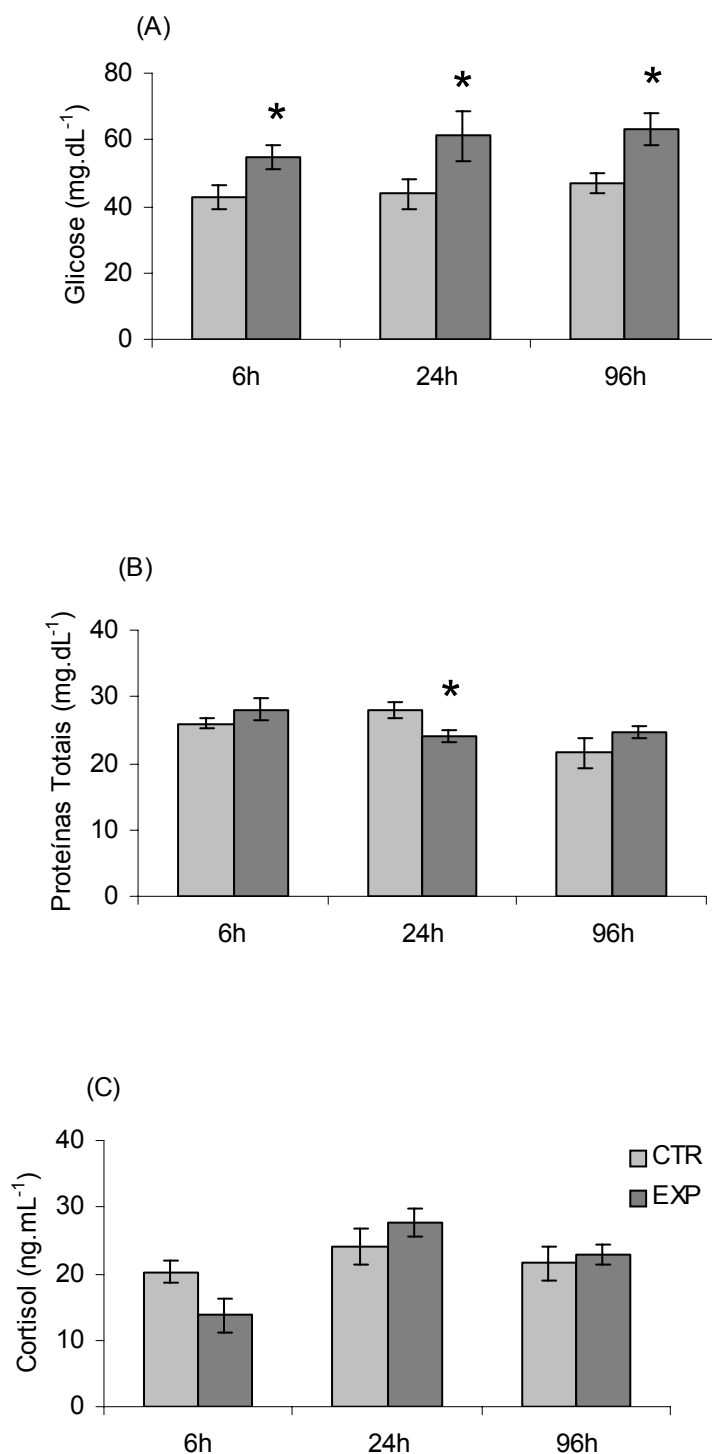


Figura 15. Concentrações plasmáticas de glicose (A), proteínas totais (B) e cortisol (C) de *Prochilodus lineatus* expostos durante 6, 24 e 96 h à FSG (EXP) ou apenas à água (CTR). * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

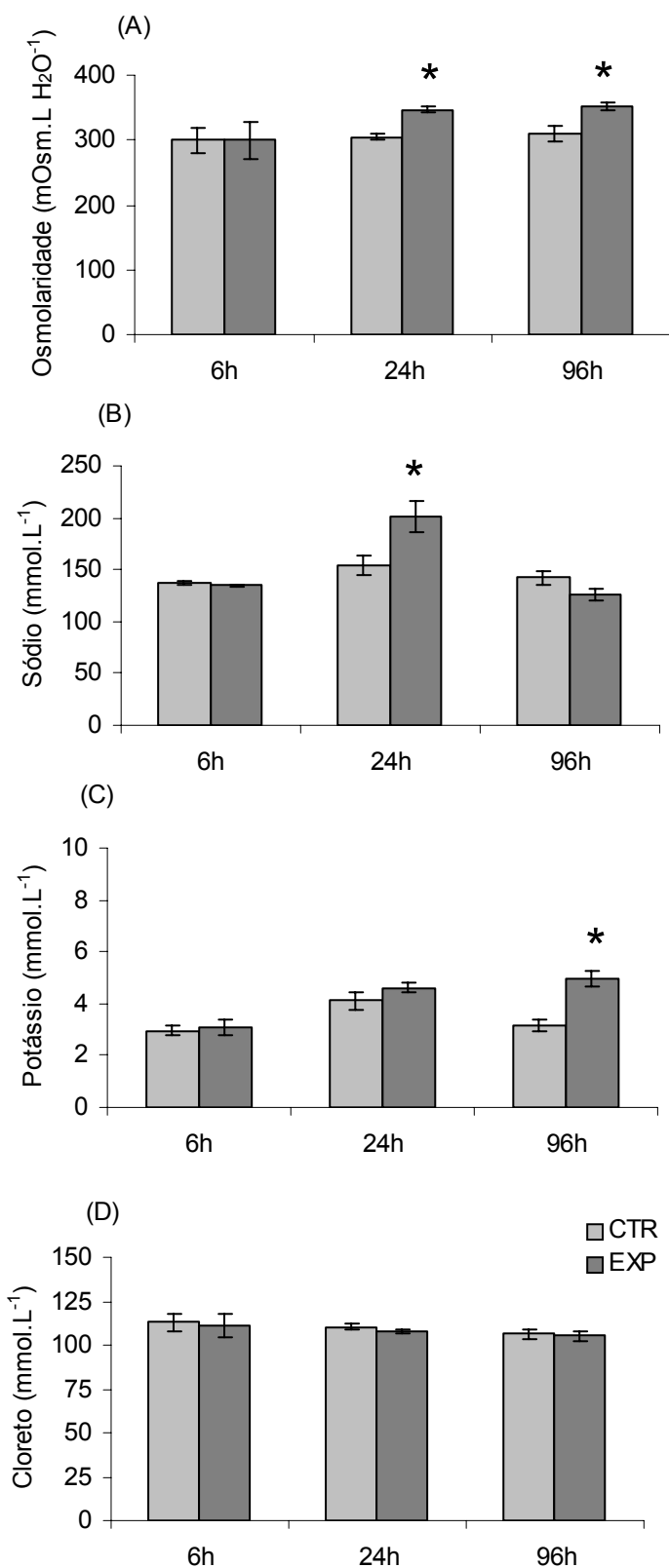


Figura 16. Concentrações plasmáticas de potássio (A), cloreto (B), sódio (C) e osmolaridade plasmática (D) de *Prochilodus* expostos durante 6, 24 e 96 h à FSG (EXP) ou apenas à água (CTR). * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

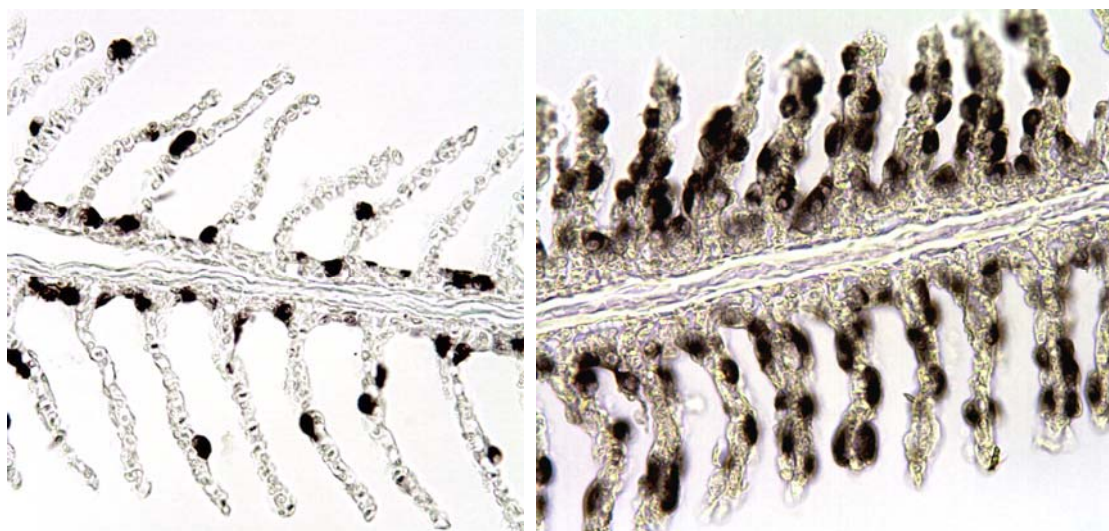


Figura 17. Fotomicrografia da técnica de imunohistoquímica usada para localização da enzima NKA nas CC de *P. lineatus* exposto à água (A) e à FSG (B) durante 24 h (400x);

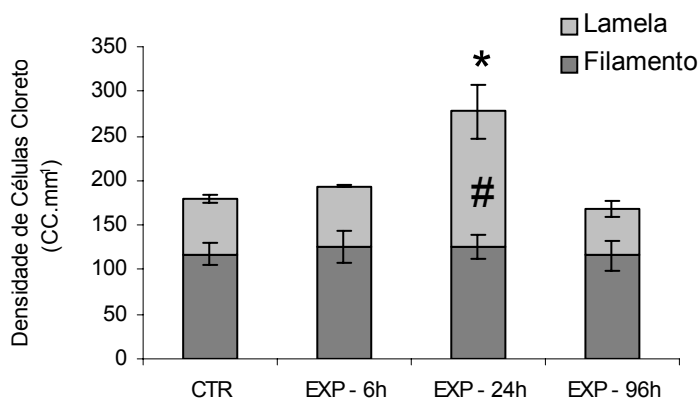


Figura 18. Densidade das CC nas regiões lamela e filamento das brânquias de *P. lineatus* expostos à água (CTR) ou à FSG (EXP) durante 6, 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o EP. * indica diferença significativa TCC entre os grupos CTR e EXP. # indica diferença significativa do número de CCL entre os grupos CTR e EXP.

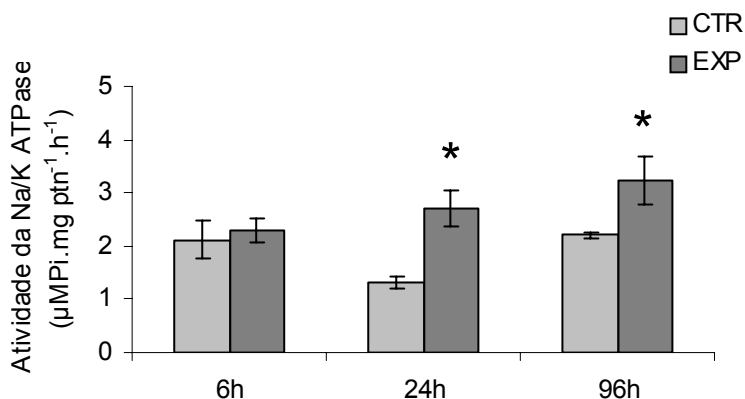


Figura 19. Atividade branquial da enzima Na^+/K^+ -ATPase de *P. lineatus* expostos à FSG (EXP) ou à água (CTR) durante 6, 24 e 96 h. * Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. As barras indicam a média e as linhas o EP (número de animais: de 10 a 15).

7.4. DISCUSSÃO

A FSG promoveu alterações importantes nos peixes expostos a este contaminante. Foi constatada hemólise, indicada pela diminuição dos parâmetros hematológicos analisados, seguido pelo aumento do K^+ plasmático em 96 h. Resultados semelhantes já foram encontrados para este peixe após exposição ao óleo diesel (Simonato et al., 2008). Houve também a indicação da resposta secundária de estresse devido à ocorrência da hiperglicemia nos três tempos de exposição, apesar da ausência de diferenças na concentração plasmática do cortisol. A FSG também provocou aumento na quantidade das CC e na atividade da NKA nos animais expostos após 24 h de exposição.

As alterações em parâmetros hematológicos de peixes refletem as mudanças ambientais vividas por esses organismos, assim, estes parâmetros podem ser bons indicadores da saúde de animais aquáticos expostos a contaminantes, visto que constituem um dos primeiros reflexos detectáveis do estresse promovido por alterações ambientais (Davison et al., 1993). No presente trabalho, a exposição dos peixes à FSG durante 96 h promoveu uma diminuição no hematócrito, no conteúdo de hemoglobina e no número de eritrócitos, e ainda provocou um aumento nos valores de K^+ plasmáticos. Esses resultados em conjunto indicam que o aumento do K^+ deve ter ocorrido como resultado da hemólise, uma vez que esse íon apresenta-se em maior quantidade no interior dos eritrócitos. A hemólise pode dificultar a captação de oxigênio e as trocas gasosas desses animais além de interferir no equilíbrio ácido-base (Bloom e Brandt, 2008). Resultados semelhantes já foram descritos para *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do diesel (Simonato et al., 2008) e em linguados (*Pleuronectes flesus*) após exposição à fração solúvel do óleo cru (Alkindi et al., 1996). Segundo Duarte e colaboradores (2010) os hidrocarbonetos presentes no petróleo promovem graves distúrbios do transporte de oxigênio uma vez que esses hidrocarbonetos são conhecidos por alterar a permeabilidade dos eritrócitos com um forte efeito hemolítico.

Quando a hemólise ocorre devido à presença de estresse oxidativo, o processo de oxidação pode lesar diretamente a membrana celular pela peroxidação lipídica ou alterar a molécula de hemoglobina, que em alguns casos leva à sua desnaturação (Bloom e Brandt, 2008). A gasolina também pode induzir a formação de metahemoglobina, isto é, ocorre a oxidação do

ferro heme para o estado férrico tornando a hemoglobina incapaz de se ligar ao oxigênio (Bloom e Brandt, 2008). Além disso, a própria formação da metahemoglobina está associada à geração ERO, como o radical ânion superóxido, que é convertido em peróxido de hidrogênio pela SOD. A presença do peróxido de hidrogênio promove a lipoperoxidação ao se ligar diretamente à cadeia lipídica da membrana, essa oxidação dos lipídios compromete a membrana dos eritrócitos promovendo a hemólise (Halliwell e Gutteridge, 2005). Além disso, o peróxido de hidrogênio não eliminado pode se ligar à hemoglobina e formar o ferro reativo (Fe^{+4}) que incorporado em outras reações poderá causar a desnaturação da hemoglobina (Bloom e Brandt, 2008). As cadeias globinas desnaturadas diminuem a sua afinidade pelo grupo heme e podem dissociarem-se durante a lesão oxidativa. O grupo heme livre além de ser tóxico para a célula, pode induzir a lesões teciduais pela formação de novas ERO. Assim, a hemólise encontrada nos animais expostos à FSG pode estar relacionada ao estresse oxidativo, visto que os eritrócitos são sensíveis e sofrem lise na presença de ERO (Halliwell e Gutteridge, 2005). Essa hipótese de estresse oxidativo que estes animais estão sofrendo é sustentada pelos resultados encontrados na análise dos parâmetros bioquímicos. Os resultados tanto das brânquias como do fígado mostraram aumento das defesas antioxidantes e também apresentaram peroxidação lipídica, indicando um possível aumento das ERO.

A exposição à gasolina provocou hiperglicemia nos três tempos experimentais, além de redução nas concentrações de proteínas após 24 h, indicando a disponibilização de reservas energéticas para sua imediata utilização. A mobilização das reservas energéticas é descrita como uma típica resposta secundária de estresse e pode ser mediada pela liberação das catecolaminas ou do cortisol (Heath, 1995; Wendelaar Bonga, 1997; Iwama et al., 2006). A resposta de estresse tem como objetivo a manutenção ou o restabelecimento da homeostase devido às mudanças físicas e/ou químicas que estejam comprometendo a sobrevivência do organismo expostos a um agente estressor (Wendelaar Bonga, 1997). Desta forma é importante salientar que as respostas de estresse são vitalmente importantes para a sobrevivência do organismo (Iwama et al., 2006). A glicose disponibilizada é importante porque fornece substrato energético para os tecidos como o cérebro, músculos

e brânquias para que o animal possa responder defensivamente ao agente estressor. O aumento da glicose plasmática já foi observado em outros estudos após a exposição à HPA (Pacheco e Santos, 2001a; Vijayan et al., 1997). Como já mencionado a mobilização de energia pode ser mediada pelo cortisol ou pelas catecolaminas. Segundo Mommsen e colaboradores (1999) o cortisol além de promover hiperglicemia também é responsável pela proteólise em peixes, provavelmente relacionada a ajustes no metabolismo de aminoácidos que promovem a gliconeogênese. Por outro lado, a liberação de catecolaminas é considerada uma resposta compensatória para otimizar a função cardiovascular e respiratória e também pode mobilizar as reservas de energia para suprir o metabolismo que foi aumentado devido às exigências associadas com o estresse (Fabbri et al., 1998). Alguns autores afirmam que como as catecolaminas são liberadas pela via rápida (sistema nervoso simpático) e são prontamente eliminadas da circulação, de modo que a hiperglicemia mantida durante a exposição até 96 h, como visto neste trabalho, deve ser resultado da liberação do cortisol (Wendelaar Bonga, 1997; Iwama, et al., 2006). No entanto, segundo Fabbri e colaboradores (1998) a hiperglicemia após 24h de exposição ainda pode ser um efeito das catecolaminas. Essa é confirmada pelos resultados de Gesto e colaboradores (2006) que observaram que o naftaleno induziu a liberação de noradrenalina após 24 e 72h de exposição em truta arco-iris.

Ainda existe muita controvérsia sobre a relação entre a liberação de cortisol e catecolaminas com a hiperglicemia observada em situações de estresse. Segundo Vijayan et al. (1997) a hiperglicemia encontrada no seu trabalho não pode estar relacionada às catecolaminas já que a persistência destes hormônios por até 48 h não é provável e relacionou o aumento da glicose com o aumento da gliconeogênese no fígado induzida pelo cortisol previamente liberado. Outro aspecto da hiperglicemia gerada após exposições à contaminantes é discutido por Vijayan e colaboradores (1997) e Aluru e Vijayan (2006) que afirmam que xenobióticos capazes de induzir a P450, aumentam a captação hepática e o catabolismo do cortisol, sugerindo que os compostos indutores das enzimas P450, afetam a concentração de cortisol, quer na sua produção ou na sua eliminação. O trabalho de Tintos e colaboradores (2007) mostrou que a intoxicação de peixes com naftaleno

resultou em aumento da glicemia plasmática e os autores afirmaram que essa ativação do metabolismo energético pode ocorrer também para fornecer energia para os processos de detoxificação, indicados pelo aumento na atividade das enzimas hepáticas de biotransformação GST e a EROD. No capítulo II do presente trabalho foi observado que as enzimas de biotransformação foram ativadas em ambos os órgãos, assim a glicose aumentada pode ter ocorrido também para disponibilizar energia para esses processos.

No presente trabalho, os níveis de cortisol plasmático não apresentaram variações significativas. Essa ausência de variação pode indicar que o cortisol tenha sido liberado nas primeiras horas após o estresse desta forma não foi possível registrar o aumento da concentração plasmática deste hormônio. Isto também é sugerido por Iwama e colaboradores (2006), que afirmam que o nível basal deste hormônio retorna em poucas horas após sua liberação. No entanto as respostas secundárias puderam ser percebidas, como a hiperglicemia, uma possível proteólise, além das alterações na quantidade das CC. Este resultado também foi encontrado em enguias (*Anguilla Anguilla*) expostas à fração solúvel da gasolina (Pacheco e Santos, 2001a) e por Simonato e colaboradores (2008) em *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do diesel por até 96 h.

Os poluentes podem alterar o balanço iônico uma vez que atingem órgãos diretamente envolvidos na osmorregulação, no metabolismo ou nos processos de transporte ativo. A brânquia é considerada um órgão-alvo para contaminantes uma vez que possui uma extensa área superficial de contato com o meio externo (Mayer-Gostan et al., 1987; Dang et al., 2000). A NKA é a enzima responsável pelo transporte ativo de íons de sódio e potássio, mantendo o gradiente iônico equilibrado, e está presente em altas concentrações nas CC das brânquias de teleósteos. A NKA é importante não somente para sustentar a homeostase intracelular como também auxilia outros sistemas de transporte dentro das brânquias (Hwang e Lee, 2007). Neste trabalho os peixes expostos à FSG apresentaram aumento nas concentrações do Na^+ e na osmolaridade plasmática, acompanhado pelo aumento da quantidade de CC nas lamelas e da atividade da NKA, após 24 h de exposição à FSG. Esses resultados refletem uma estimulação das vias de tomada de

sódio, conforme demonstrado pela ativação da NKA, que resultou em aumento na concentração de Na^+ e osmolaridade plasmática. Por sua vez, o aumento da atividade da NKA resultou, pelo menos em parte, da diferenciação de células-cloreto nas brânquias, conforme indicado pelo aumento da densidade de CC nas brânquias de *P. lineatus*. Em conjunto estas respostas indicam uma adaptação do animal frente ao poluente, para a manutenção do equilíbrio osmo-iônico.

Segundo Perry (1997) as CC estão mais restritas à região interlamelar do epitélio do filamento, na base das lamelas. No entanto, neste trabalho o aumento observado na quantidade das CC dos animais expostos à FSG durante 24 h, ocorreu nas lamelas. Essa proliferação das CC nas lamelas pode ser uma forma de aproximação destas células da corrente sanguínea como um mecanismo de defesa do organismo para aumentar a captação de íons (Perry, 1997; Dang et al., 2000). A presença de CC no epitélio lamelar pode indicar uma adaptação à reduzida concentração de íons na água, a fim de aumentar a capacidade de transporte ativo de íons por meio das brânquias (Fernandes e Perna-Martins, 2001), ou no caso do presente estudo, uma dificuldade na captação de íons provocada pela presença de agentes tóxicos na água. Segundo Sloman e colaboradores (2001) o cortisol aumenta a capacidade de transporte de íons nas brânquias pela proliferação das CC. Apesar da ausência de alteração no cortisol plasmático destes animais, é possível inferir que este foi liberado pela detecção de respostas secundárias de estresse. Por outro lado, essa proliferação de CC nas lamelas pode dificultar a troca dos gases necessários à respiração (Perry, 1997). Este fato foi confirmado pelo trabalho desenvolvido por Bindon e colaboradores (1994) no qual concluíram que a proliferação das CC prejudicou a transferência dos gases respiratórios nas brânquias dos animais estudados. Essa redução das trocas gasosas como efeito da proliferação das CC ocorre devido a um espessamento da barreira de difusão sangue-água, que conseqüentemente restringe a passagem do fluxo de água pela área inter-lamelar (Bindon et al., 1994).

Após 96 h de exposição à FSG o número de CC não apresentou diferenças significativas, mas a NKA continuou elevada. Pode-se inferir que as CC em excesso foram eliminadas para que não houvesse prejuízo na respiração e a NKA permaneceu elevada para compensar um possível

distúrbio iônico provocado pelos contaminantes presentes na FSG. Segundo Bury e colaboradores (1998) o cortisol induz a apoptose das CC e as alterações no epitélio branquial podem ser parte de uma resposta integrada de estresse. Além disso, segundo Wendelaar Bonga (1997) a exposição à agentes estressores pode promover apoptose das CC, e essa apoptose não necessariamente diminuirá também a atividade da NKA, isto porque as células restantes podem compensar a ausência das outras. Esse restabelecimento da quantidade das CC pode ter ocorrido para que o seu aumento não provocasse conseqüências deletérias para homeostase respiratória. A hipótese de que o excesso de CC foi eliminado para que não houvesse um prejuízo na respiração destes animais é sustentada por Goss e colaboradores (1998) que encontraram uma redução na quantidade de CC em animais expostos à hipercapnia e essa diminuição ocorreu para que seja restabelecido o equilíbrio ácido-base do sangue. Em adição, a hipercapnia, pode promover uma liberação de catecolaminas para regular o pH sanguíneo (Brauner e Val, 2006). Segundo Goss e colaboradores (1998) hipercapnia pode ser corrigida por um aumento na captação de Na^+ e como conseqüência ocorrerá a eliminação do ácido. Assim, o aumento das CC pode ter prejudicado as trocas gasosas, o que provou uma hipercapnia que teria provocado a liberação de catecolaminas, a liberação destes hormônios provocou a hiperglicemia, e para regular o equilíbrio ácido-base do sangue houve uma maior captação de Na^+ e conseqüente eliminação de H^+ . Esse aumento de Na^+ provocou um aumento na atividade da NKA para regularizar o balanço iônico.

7.5. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que os hidrocarbonetos mono e poliaromáticos presentes na FSG 5 %, mesmo em baixas concentrações, foram capazes de provocar hemólise indicada pela diminuição dos parâmetros hematológicos analisados, seguido pelo aumento do K^+ plasmático, provavelmente como efeito provocado por um desequilíbrio pró-oxidante celular. Os peixes expostos à FSG também mostraram uma resposta secundária de estresse visualizado pela ocorrência da hiperglicemia em todos os períodos de exposição, apesar da ausência de diferenças significativas na concentração plasmática do cortisol, refletindo a necessidade de ajustes para que o animal pudesse

responder a este agente estressor. A FSG ainda promoveu modificações na regulação iônica das brânquias que resultaram em aumento na densidade das CC, na atividade da NKA, nas concentrações plasmáticas do Na^+ e osmolaridade nos animais expostos após 24 h. Em conjunto esses resultados mostram a importância do uso de biomarcadores para a avaliação de áreas impactadas com gasolina.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os padrões de respostas do peixe neotropical *Prochilodus lineatus* à exposição à fração solúvel de gasolina, em vários níveis organizacionais: celular, bioquímico, fisiológico e morfológico.

Os resultados mostraram que os hidrocarbonetos mono e poliaromáticos presentes na FSG 5% promoveram ativação das enzimas de biotransformação de fase I e II, tanto no fígado como nas brânquias, confirmando assim a importante função do fígado nestes processos de eliminação de compostos tóxicos e ressaltando o papel da brânquia como órgão detoxificante. Além disso, a FSG também promoveu a estimulação das vias de tomada de sódio, conforme demonstrado pela ativação da NKA, que resultou em aumento na concentração de Na^+ e osmolaridade plasmática. Por sua vez, o aumento da atividade da NKA resultou, pelo menos em parte, da diferenciação de células-cloreto nas brânquias, conforme indicado pelo aumento da densidade de CC nas brânquias. Em conjunto estas alterações indicam uma adaptação do animal frente ao poluente, para a manutenção do equilíbrio osmo-iônico, e mostram a sensibilidade das brânquias como órgão-alvo para monitoramento de áreas impactadas.

O sistema de defesa antioxidante foi mais representativo no fígado do que nas brânquias que apresentou poucas variações. Ainda assim, ambos os órgãos estudados apresentaram ocorrência de peroxidação lipídica em um dos tempos experimentais, o fígado após 6 h, e as brânquias somente após 96 h de exposição à FSG. Isso pode indicar uma melhor adaptação do fígado para exposições mais prolongadas (após 24 h). No caso das brânquias, por se tratar do primeiro órgão de contato com os xenobióticos, as defesas antioxidantes foram capazes de impedir a ocorrência de peroxidação lipídica nos tempos iniciais (6 e 24 h). Uma observação pertinente que os resultados apontaram foi o importante papel da GSH como defesa antioxidante tanto no fígado como nas brânquias, visto que quando sua concentração apresentou-se aumentada nestes órgãos, não houve dano oxidativo. Isso reforça a já conhecida função da GSH como a primeira linha de defesa antioxidante.

Os animais expostos também apresentaram hemólise, indicada pela diminuição dos parâmetros hematológicos analisados, e pelo aumento do K^+ plasmático. Essa hemólise pode ter ocorrido como consequência do aumento de ERO provocada pela exposição à FSG. A ocorrência da hiperglicemia nos três tempos de exposição foi indicativa da resposta secundária de estresse, apesar de não ter sido constatado aumento na concentração plasmática do cortisol.

Em resumo, o presente trabalho utilizou biomarcadores que se mostraram sensíveis à presença dos hidrocarbonetos presentes na FSG, no entanto algumas alterações ocorridas necessitam de parâmetros complementares para que possam ser melhores explicadas. Desta forma, este trabalho sugere uma investigação mais aprofundada dos mecanismos da defesa antioxidante nas brânquias e um detalhamento do envolvimento dos hormônios do estresse na mobilização das reservas energéticas e na osmorregulação destes organismos expostos aos hidrocarbonetos.

Estes resultados reforçam a importância da utilização de biomarcadores para a avaliação e monitoramento de locais impactados com gasolina, visto que baixas concentrações de hidrocarbonetos são suficientes para promover alterações significativas no organismo dos animais expostos, servindo de alerta antes do comprometimento de populações inteiras. A carência de dados sobre os efeitos da gasolina, em espécies de peixes dulcícolas neotrópicos faz deste trabalho uma fonte importante de informações. Assim, os contínuos vazamentos de gasolina não podem ser ignorados, visto que, a exposição aguda à FSG prejudica a homeostase dos peixes e provavelmente exposições crônicas podem comprometer a sobrevivência dos animais colocando em risco a população como um todo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamson, A., Andersson, C., Jönsson, M.E., Fogelberg, O., Örberg, J., Brunström, B., Brandt, I., 2007. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish - A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. *Aquat. Toxicol.* 85, 1-8.
- Achuba, F.I., Osakwe, S.A., 2003. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 29, 97-103.
- Adams, S.M., Shugart, L.R., Southworth, G.R., Hinton, D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stresses. In: McCarthy, J.F.; Shugart, L.R. (Ed.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton: Lewis Publishers, pp. 333-353.
- Adeyemi, O., Oginni, O., Osubor, C.C., Adeyemi, O., Oloyede, O.B., Oladiji, A.T., Adebayo, E.A., 2009. Effect of water contaminated with phthalate, benzene and cyclohexane on *Clarias gariepinus* cellular system. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1941–1944.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K. Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochi. Biophys. Acta.* 1523, 37-48.
- Ahmad, I. Pacheco, M., Santos, M.A., 2003. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction. *Ecotox. Environ. Safe.* 54, 7–15.
- Alkindi, A.Y.A., Brown, J.A., Waring, C.P., Collins, J.E., 1996. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. *J. Fish Biol.* 49, 1291-1305.
- Aluru, N., Vijayan, M.M., 2006. Aryl hydrocarbon receptor activation impairs cortisol response to stress in rainbow trout by disrupting the rate-limiting steps in steroidogenesis. *Endocrinology.* 147, 1895-1903.
- Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325-331
- Benedetti, M., Martuccio, G., Fattorini, D., Canapa, A., Barucca, M., Nigro, M., Regoli, F., 2007. Oxidative and modulatory effects of trace metals on

- metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquat. Toxicol.* 85, 167-175.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. Grune & Stratton, New York.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61,882-890.
- Bindon, S.D., Gilmour, K.M., Fenwick, J.C., Perry, S.F., 1994. The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 197, 47–63.
- Bloom J. C., Brandt, J.T. 2008. Toxic responses of the blood. In: Casarett L.J, Doull J. (Ed.), *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 7.ed. New York: Mac Graw Hill. pp. 455-484.
- Bols, N.C., Schirmer, K., Joyce, E.M., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., Whyte, J.J. 1999. Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in a trout liver cell line. *Ecotox. Environ. Safe.* 44, 118-128.
- Brauner, C.J., Val, A.L., 2006. Oxygen Transfer. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. (Ed.), *The Physiology of tropical fishes*. Fish Physiology series. Vol. 21. Elsevier. pp. 277-300.
- Bruckner, J.V. Satheesh Anand, S., Alan Warren, D. 2008. Toxic effects of solvents and vapors. In: Casarett L.J, Doull J. (Ed.), *Toxicology: the basic science of poisons*. 7.ed. New York: Mac Graw Hill. pp. 1157-1188.
- Bury, N.R.; Jie, L.; Flik, G.; Lock, R.A.C.; Wendelaar-Bonga, S.,E., 1998. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. *Aquat. Toxicol.* 40, 193-202.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40–46.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480.
- Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Phys. A* 151, 437– 442.

- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A., Wunderlin, D.A., 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ. Pollut.* 157, 3025–3033.
- CETESB 2010, Site oficial. São Paulo/SP. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/postos/> - acesso em maio de 2010.
- Che, W., Zhang, Z., Zhang, H., Wu, M., Liang, Y., Liu, F., Li, N., 2007. Compositions and oxidative damage of condensate, particulate and semivolatile organic compounds from gasoline exhausts. *Environ. Toxicol. Phar.* 24, 11-18.
- Claiborne, J.B., Edwards, S.L., Morrison-Shetlar, A.I., 2002. Acid–Base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.* 293, 302-319.
- CONAMA, 2005 – Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução N° 357 de 17 de março de 2005. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005> (acesso em maio de 2010).
- CONAMA, 2000 - Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente, Resolução N° 273, de 29 de novembro de 2000. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/> (acesso em maio de 2010).
- Corseuil H.X., Kaipper B.I.A., Fernandes M., 2004. Effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol. *Water Res.* 38, 1449–1456.
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *J. Exp. Biol.*, 203, 379-387.
- Davison, W., Franklin, C.E., Mckenzie, J.C., Dougan, M.C.R., 1992. The effects of acute exposure to the water soluble fraction of fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). *Comp. Biochem. Phys. C* 102, 185-188.
- Davison, W., Franklin, G.E., Mckenzie, J.C., Carey, P.W., 1993. The effects of chronic exposure to the water soluble fraction of fuel oil on an antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. *Comp. Biochem. Phys. C*, 104, 67-70.

- Di Giulio, R.T.; Benson, W.H.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. 2nd ed. Washington: Taylor & Francis, pp. 523-561.
- Duarte, R.M., Honda, R.T., Val, A.L., 2010. Acute effects of chemically dispersed crude oil on gill ion regulation, plasma ion levels and haematological parameters in tambaqui (*Colossoma macropomum*) *Aquat. Toxicol.* 97, 134–141.
- Eggens, M.L., Galgani, F., Klungøyr, J., Everts, J., 1992. Hepatic EROD activity in dab, *Limanda limanda*, in the German Bight using an improved plate-reader method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91, 71-75.
- Evans, D.H., Claiborne, J.B., 2009. Osmotic and ionic regulation in fish. In: Evans, D.H. (Ed.), *Osmotic and Ionic Regulation – Cells and Animals*. Boca Raton, Taylor & Francis Group, pp. 295-366.
- Evans, D.H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ. Health Persp.* 71, 47-58.
- Fabbri, E., Capuzzo, A., Moon, T.W., 1998. Review - The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comp. Biochem. Phys. C*, 120, 177-192.
- Fernandes, M.N., Perna-Martins, S.A. 2001. Epithelial gill cells in the armored catfish, *Hypostomus* CF. *plecostomus* (Loricariidae). *Rev. Brasil. Biol.* 61, 69-78.
- Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J.L., Míguez, J.M., 2006. Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Phys. C* 144, 173–183.
- Gesto, M., Tintos, A., Rodríguez-Illamola, A., Soengas, J.L., Míguez, J.M., 2009. Effects of naphthalene, β -naphthoflavone and benzo(a)pyrene on the diurnal and nocturnal indoleamine metabolism and melatonin content in the pineal organ of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 92, 1–8.
- Di Giulio, R.T. e Hilton, D.E., 2008. Introduction. Di Giulio, R.T. e Hilton, D.E. (Eds). *The Toxicology of Fishes*. New York, CRC Press. 1, 3-8.

- Gómez, S.E., Giust, A., Beltrami, C.R., Naya, J.G., 2003. Resistencia a diversos combustibles derivados del Petroleo en *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Cyprinodontiformes). *Bioikos*, PUC-Campinas, 17, 57-64.
- Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill Morphology and Acid-Base Regulation in Freshwater Fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 119(A), 1, 107–115.
- Halliwell, B. Gutteridge, J.M.C., 2005. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ed. Clarendon Press, Oxford, pp. 936.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken, pp. 319-368.
- Heath, A.G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. 2 ed. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito N., Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Phys. B* 136, 593-620.
- Hwang, P.P., Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Phys. A* 148, 479– 497.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.* 25, 563–575.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M., 2006. Stress in Fish. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. *The Physiology of Fishes*. 3 ed. New York: CRC Press. 9, 319-342.
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolf, S., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange – Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids*. 26, 853-856.
- Jimenez, B.D., Stegeman, J.J., 1990. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: Adams, S.M. (Ed.). *Biological Indicators of Stress in Fish*. Bethesda: American Fisheries Symposium 8. pp. 67-79.
- Jönsson, E.M., Brandt I., Brunström B., 2002. Gill filament-based EROD assay for monitoring waterborne dioxin-like pollutants in fish. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3340-3344.

- Jönsson M. E., Brunström B., Brandt I., 2009. The zebrafish gill model: Induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation. *Aquat. Toxicol.* 91 62–70.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 20, 6183-6188.
- Khan, R.A., 1998. Influence of petroleum at a refinery terminal on winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 770-777.
- Lingwood, D., Harauz, G., Ballantyne, J.S., 2006. Decoupling the Na⁺K⁺-ATPase in vivo: A possible new role in the gills of freshwater fishes. *Comp. Biochem. Phys. A* 144, 451-457.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mayer-Gostan, N. Wendelaar Bonga, S.E., Balm, P.H.M., 1987. Mechanisms of hormone actions on gill transport. *Vertebrate Endocrinology Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press. Vol.2. pp 221-238.
- McCord, J.E., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Ministério da Saúde, 2004. Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004. Disponível em http://www.funasa.gov.br/web%20Funasa/Legis/pdfs/portarias_m/pm_518_2004.pdf (acesso em maio de 2010).
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 78, 294-299.
- Mommsen, T.P., Vijayama, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 9, 211-268.
- Nicodem, D.E., Guedes, C.L.B., Correa, R.J., 1998. Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a Brazilian intermediate crude oil. *Mar. Chem.* 63, 93-104.
- Nolan, D.T., 2000. Skin response of fish to stressors. Ph.D. Thesis. Catholic University of Nijmegen, Holand.

- Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2008. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Sci. Total Environ.* 396, 70-78.
- Pacheco, M.; Santos, M.A., 2001a. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotox. Environ.Safe.* 49, 64-75.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2001b. Tissue distribution and temperature-dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactato and glucose levels. *Environ. Int.* 26, 149-155.
- Pandey S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.* 309, 105–115.
- Pathiratne, A., Chandrasekera, L.W.H.U., Pathiratne, K.A.S., 2009. Use of biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to assess the impacts of pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. *Environ. Monit. Assess.* 156, 361–375.
- Perry, S.F., 1997. The Chloride Cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 325-47.
- Petrobrás, 2003. Impacto das futuras especificações na formulação da gasolina brasileira. *Boletim Técnico Petrobras*, Rio de Janeiro, 46, 256 – 269.
- Pollino, C.A., Georgiades, E., Holdway, D.A., 2009. Physiological changes in reproductively active rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) following exposure to naphthalene. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1265–1270.
- Pollino, C.A., Holdway, D.A., 2003. Hydrocarbon-induced changes to metabolic and detoxification enzymes of the Australian Crimson-Spotted rainbowfish (*Melanotania fluviatilis*). *Environ Toxicol.* 18, 21-28.
- Poleksic, V., Mitrovic-Tutundžic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. 1994. In: Müller, R., Lloyd, R., (Ed.) *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Fishing News Books, Oxford, pp 339-352.
- Quabius, E.S., Balm, P.H.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 472–482.

- Rand, G.M., Wells, P.G., McCarty, L.S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G.M., (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. 2nd ed. Washington: Taylor & Francis. pp. 3-67.
- Rodrigues, R.V., Miranda-Filho, K.C., Gusmão, E.P., Moreira, C.B., Romano, L.A., Sampaio, L.A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci. Total Envir.* 408, 2054–2059.
- Sampson, B.J., Beckman, J.S., 2001. Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu,Zn superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 8-13.
- Schlenk, D., Handy, R., Steinert, S., Depledge, M.H., Benson, W. Biomarkers. In: Di Giulio, R.T. e Hilton, D.E. (Eds). *The Toxicology of Fishes*. New York, CRC Press. 16, 683-732.
- Schwaiger J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Tribskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquatic Ecosyst. Stress Recov.* 6, 75-86.
- Silva, D.A.M., Buzitis, J., Krahn, M.M., Bicego, M.C., Pires-Vanin, A.M.S., 2006. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 175–183.
- Simonato, J.D., Albinati, A.C., Martinez, C.B.R., 2006. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 505–511.
- Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotox. Environ. Safe.* 69, 112-120.
- Siwela, A.H., Nyathi, C.B., Naik, Y.S., 2009. Metal Accumulation and Antioxidant Enzyme Activity in *C. gariepinus*, Catfish, and *O. mossambicus*, Tilapia, Collected from Lower Mguza and Wright Dams, Zimbabwe. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 648–651.
- Shukla, P., Gopalani, M., Ramteke, D.S., Wate, S.R., 2007. Influence of salinity on PAH uptake from water soluble fraction of crude oil in *Tilapia mossambica*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 601–605.

- Sloman, K.A., Desforges, P.R., Gilmour, K.M., 2001. Evidence for a mineralocorticoid-like receptor linked to branchial chloride cell proliferation in freshwater rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 204, 3953-3961.
- Standard Methods for examination of water and wastewaters, eighteenth ed., 1992. Direct Photometric Method, 5530 D. American Public Health Association.
- Stegeman, J.J., Brower, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P. & Bergman, H .L. (Ed.), *Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Eds. Lewis Publishers. Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol Res.* 29, 1715-1733.
- Sturve, J., Hasselberg, L., Falth, H., Celander, M., Förlin, L., 2006. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat. Toxicol.* 78, 73-78.
- Teuschler, L.K., Gennings, C., Hartley, W.R., Carter, H., Thiyagarajah, A., Schoeny, R., Cubbison, C., 2005. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere.* 58,1283–1291.
- Tiburtius, E.R.L, Peralta-Zamora, P., Leal, E.S., 2004. Contaminação de águas por BTEX e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Quim. Nova.* 27, 441-446.
- Tiburtius, E.R.L., Peralta-Zamora, P., Emmel, A., Leal, E.S., 2005. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. *Quim. Nova.* 28, 61-64.
- Tintos, A., Gesto, M. Míguez, J.M., Soengas, J.L., 2007. Naphthalene treatment alters liver intermediary metabolism and levels of steroid hormones in plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotox. Environ. Safe.* 66, 139–147.
- Tuvikene, A., 1995. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ann. Zool. Fenn.* 32, 295–309.

- USEPA - U.S. Environmental Protection Agency. 2002. Toxicological review of benzene (noncancer effects) - (CAS No. 71-43-2). In support of summary information on the integrated risk information system, Washington, DC. EPA/635/R-02/001.
- USEPA 8310 - Method 8310 polynuclear aromatic hydrocarbons. <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8310.pdf>
acesso: maio de 2010.
- USEPA 5021 - Method 5021 volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis. <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5021.pdf>
acesso: maio de 2010.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.* 13, 57-149.
- Vanzella T.P., Martinez C.B., Cólus I.M., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res-Gen Tox En.* 631, 36-43.
- Vijayan, M.M., Pereiral, C., Forsyth, R.B., Kennedy, C.J., Iwama, G.K., 1997. Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with β -naphthoflavone. *Life Sci.* 61, 117-127.
- Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. *Phy. Rev.* 77, 591-620.
- Wendelaar Bonga, S.E. e Lock, R.A.C., 2008. The osmoregulatory system. In: Di Giulio, R.T. e Hilton, D.E. (Eds). *The Toxicology of Fishes*. New York, CRC Press. 8, 401-415.
- Wenju, X. Yuanyou, L. Qingyang, W. Shuqi, W. Huaiping, Z., Wenhua, L., 2009. Effects of phenanthrene on hepatic enzymatic activities in tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂). *J. Environ. Sci.* 21, 854-857.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 347-570.

- Wilhelm Filho D, Gonzalez-Flecha B, Boveris A., 1994. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. *Braz. J. Biol. Med. Res.* 27, 2879-2882.
- Ya-wei F., Qi-xing, Z., 2009. Toxic effects of toluene, ethylbenzene and xylene in waters on zebrafish *Brachydanio rerio*. *Asian J. Ecotox.* 4, 136-141.
- Zhang, J.F., Shen, H., Xu, T.L., Wang, X.R., Li, W.M., Gu, Y.F., 2003. Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system on fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 234-239.
- Zhang, J. F., Wang,X.R., Guo, H.Y., Wu, J.C., Xue, Y.Q., 2004. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 58, 110–116.