

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
(Convênio UFSCar – UNESP Araraquara)

**TOXICIDADE AGUDA, EFEITOS METABÓLICOS E HEMATOLÓGICOS  
SUBLETAIS DO FENOL EM PACU *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)**

**JULIANA SÁ LEAL DE FIGUEIREDO**

**São Carlos – SP**

**2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
(Convênio UFSCar – UNESP Araraquara)

**TOXICIDADE AGUDA, EFEITOS METABÓLICOS E HEMATOLÓGICOS  
SUBLETAIS DO FENOL EM PACU *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)**

**JULIANA SÁ LEAL DE FIGUEIREDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

**São Carlos – SP**

**2008**

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

F475ta

Figueiredo, Juliana Sá Leal de.

Toxicidade aguda, efeitos metabólicos e hematológicos subletais do fenol em pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) / Juliana Sá Leal de Figueiredo. -- São Carlos : UFSCar, 2008.  
58 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Toxicidade. 2. Metabolismo. 3. Fenol. 4. Pacu (Peixe).  
5. CL50. 6. Hematologia. I. Título.

CDD: 612.015 (20ª)

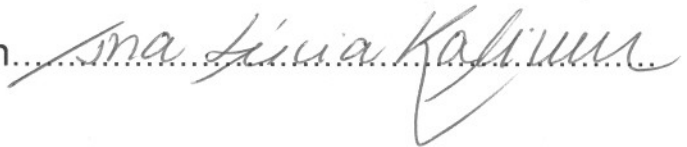
Universidade Federal de São Carlos  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar - UNESP

Defesa de Dissertação de Juliana Sá Leal de Figueiredo

Prof. Dr. Gilberto Moraes .....

Prof. Dr. Claudinei da Cruz.....

Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin.....



Dedico este trabalho aos meus pais, Juvenal e Yara, protagonistas de todas as minhas conquistas e sucessos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, inteligência suprema, causa primeira de todas as coisas.

Ao professor Gilberto Moraes, por me aceitar em seu laboratório de estudos e me conceder a grande oportunidade de realizar este estudo. Pelos ensinamentos científicos diversos e, ainda, por me oferecer sua amizade.

A todos os colegas do laboratório, pelo apoio logístico, sem o qual este trabalho não teria sido realizado e, também pela amizade e cumplicidade, sem as quais este trabalho não teria sido tão prazeroso.

A Joyce, pela amizade, apoio, paciência e, também, por permitir-me compartilhar não só os sucessos como também todas as angústias deste trabalho.

A Fernanda, que me auxiliou em todas as etapas deste trabalho. E, ainda, pela amizade, sinceridade e companheirismo.

Aos meus pais, primeiramente, pelo exemplo de caráter, dignidade e integridade. Pelo amor, paciência, compreensão, apoio financeiro e atenção que me foram dispensados durante estes estudos.

Ao Thomas, que apesar de ter chegado quase no final desta etapa, pelo amor, carinho e atenção, que tornaram os meus dias mais claros e alegres.

Aos meus irmãos, pelo apoio, carinho, amizade e companheirismo de sempre.

Ao seu Toninho, pelo imprescindível apoio durante os experimentos.

Ao Alexandre, pela prestatividade e competência.

Aos professores da fisiologia, por todo o conhecimento que adquiri durante as disciplinas oferecidas pelo programa.

Aos amigos de São Carlos, sempre tão presentes e companheiros.

Aos amigos da fisiologia, com quem compartilhei aulas e ótimas conversas.

Aos amigos de Campo Grande, que mesmo de longe, sempre estiveram ao meu lado.

À CNPQ, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. TOXICOCINÉTICA .....	4
2.1.1 Toxicocinética dos compostos fenólicos .....	6
2.2. TOXICODINÂMICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	10
2.3. PIARACTUS MESOPOTAMICUS .....	11
3. JUSTIFICATIVA .....	12
4. OBJETIVOS .....	13
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
5.1. DESENHO EXPERIMENTAL .....	14
5.1.1. Determinação da toxicidade aguda (CL50-96h) do fenol para o pacu .....	14
5.1.2. Exposição subletal ao fenol e recuperação .....	14
5.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	15
5.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS CELULARES .....	15
5.4. PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS CELULARES .....	16
5.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	16
5.5.1. Intermediários metabólicos em tecidos e plasma .....	16
5.5.1.1. Glicogênio .....	16
5.5.1.2. Glicose .....	17
5.5.1.3. Lactato .....	17
5.5.1.4. Piruvato .....	17
5.5.1.5. Amônia .....	18
5.5.1.6. Aminoácidos livres .....	18
5.5.1.7. Proteínas totais .....	18
5.5.2. Íons plasmáticos .....	18
5.5.3. Ensaio enzimáticos em tecidos .....	18
5.5.3.1. Lactato desidrogenase .....	19
5.5.3.2. Alanina aminotransferase .....	19
5.5.3.3. Aspartato aminotransferase .....	19
5.6. DETERMINAÇÕES HEMATOLÓGICAS .....	20

5.6.1. Hematócrito.....	20
5.6.2. Hemoglobina total.....	20
5.6.3. Contagem de eritrócitos (rbc).....	20
5.6.4. Volume corpuscular médio (vcm).....	20
5.6.5. Hemoglobina corpuscular média (hcm).....	21
5.6.6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (chcm).....	21
6. ESTATÍSTICA.....	21
7. RESULTADOS.....	22
7.1. CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	22
7.2. TOXICIDADE AGUDA DO FENOL PARA O PACU.....	22
7.3. METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DE PACUS APÓS EXPOSIÇÃO SUBLETAL E RECUPERAÇÃO....	22
7.3.1. Metabolismo protéico.....	23
7.3.1.1. Proteínas totais.....	23
7.3.1.2. Aminoácidos livres (aal).....	24
7.3.1.3. Amônia.....	26
7.3.1.4. Alanina aminotransferase.....	26
7.3.1.5. Aspartato aminotransferase.....	27
7.3.2. Metabolismo glicídico.....	28
7.3.2.1. Glicose.....	28
7.3.2.2. Glicogênio.....	30
7.3.2.3. Lactato.....	31
7.3.2.4. Piruvato.....	33
7.3.2.5. Lactato desidrogenase.....	33
7.4. ÍONS PLASMÁTICOS.....	34
7.5. HEMATOLOGIA.....	34
8. DISCUSSÃO.....	42
9. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 : Cinética e dinâmica do agente tóxico no organismo (Azevedo e Lima, 2003)..... 5
- Figura 2 Reação de glicuronidação do fenol (Azevedo e Lima, 2003). ..... 8
- Figura 3 . Reação de sulfatação do fenol (Azevedo e Lima, 2003)..... 9
- Figura 4 . Concentração de proteínas totais no músculo branco de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). ..... 23
- Figura 5 . Concentração de proteínas totais no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). ..... 24
- Figura 6 . Concentração de aminoácidos livres no músculo branco de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). 25
- Figura 7 . Concentração de aminoácidos livres no plasma de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). ..... 25
- Figura 8 . Concentração de aminoácidos livres no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). ..... 26
- Figura 9 . Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALAT) no músculo branco e no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). 27
- Figura 10 . Atividade da enzima aspartato aminotransferase (ASAT) no músculo branco e no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). 28
- Figura 11 . Concentração de glicose no plasma de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). ..... 29
- Figura 12 . Concentração de glicose no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). ..... 29
- Figura 13 . Concentração de glicogênio no músculo branco de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). ..... 30
- Figura 14 . Concentração de glicogênio no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). ..... 31

Figura 15 . Concentração de lactato no plasma de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. (*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). .....	32
Figura 16 . Concentração de lactato no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. (*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). .....	32
Figura 17 . Concentração de piruvato no músculo branco a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. (*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). .....	33
Figura 18 . Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALAT) no músculo branco e no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. (*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). .....	34
Figura 19 . Concentração de hemoglobina total de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. (*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). .....	35
Figura 20 . Hematócrito de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. (*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). .....	35
Figura 21 . RBC de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. (*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P<0,05$ ). .....	36
Figura 22 . Mapa metabólico demonstrando proteólise do tecido muscular e transporte de aminoácidos para o tecido hepático de pacu após exposição subletal ao fenol. ....	43
Figura 23 . Mapa metabólico demonstrando gliconeogênese no tecido hepático a partir dos esqueletos carbonados dos aminoácidos da proteólise do tecido muscular de pacu após exposição subletal ao fenol. ....	44
Figura 24 . Mapa metabólico demonstrando o Ciclo de Cori em pacu após exposição subletal ao fenol. ....	47
Figura 25 . Mapa metabólico demonstrando glicogenólise no tecido muscular e proteólise, gliconeogênese e glicogênese no tecido hepático de pacu após a recuperação. ....	49
Figura 26 . Mapa metabólico demonstrando o Ciclo de Cori em pacu após a recuperação. ....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mortalidade de <i>Piaractus mesopotamicus</i> expostos ao fenol .....	22
Tabela 2 – Intermediários metabólicos no músculo branco de <i>P. mesopotamicus</i> exposto ao fenol por 96 h e submetido a uma semana de recuperação. ....	37
Tabela 3 – Intermediários metabólicos no plasma de <i>P. mesopotamicus</i> exposto ao fenol por 96 h e submetido a uma semana de recuperação.....	38
Tabela 4 – Intermediários metabólicos no fígado de <i>P. mesopotamicus</i> exposto ao fenol por 96 h e submetido a uma semana de recuperação.....	39
Tabela 5 – Valores dos parâmetros hematológicos de <i>Piaractus mesopotamicus</i> expostos ao fenol por 96h. ....	40
Tabela 6 – Atividades enzimáticas em músculo branco e fígado de de <i>P. mesopotamicus</i> exposto ao fenol por 96 h.....	41

## RESUMO

O fenol e seus derivados são encontrados em efluentes e podem atingir o ambiente aquático através das atividades industriais, domésticas e práticas em agricultura. O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda (CL50-96h) do fenol e seus efeitos no metabolismo intermediário e na hematologia de pacu exposto a concentrações subletais por 96 horas e após uma semana de recuperação. Para tanto, foram mensurados, após 96 horas de exposição, no fígado, músculo branco e plasma os seguintes parâmetros: glicose, piruvato, lactato, proteínas, aminoácidos, amônia e glicogênio. Os íons sódio, potássio e cloreto foram mensurados no plasma. Atividade das enzimas ALAT, ASAT e LDH foi determinada no músculo branco e fígado. Os parâmetros hematológicos determinados foram hematócrito, conteúdo de hemoglobina e contagem de eritrócitos. Os índices hematimétricos mensurados foram VCM, HCM e CHCM. Ao final do período de recuperação os intermediários metabólicos foram mensurados nos tecidos. No plasma, além dos intermediários metabólicos também foram medidos os íons. E ainda, os parâmetros hematológicos e os índices hematimétricos foram determinados. Os resultados obtidos mostraram que o fenol apresenta uma CL50-96 horas de 33vmg/L em pacu. Após 96 horas de exposição subletal, ocorreu uma redução no nível de proteínas, um aumento no nível de aminoácidos livres e aumento da atividade das enzimas ALAT e ASAT no músculo branco, o que é sugestivo de proteólise muscular. No plasma e no fígado, os níveis de glicose, aminoácidos livres e lactato aumentaram. A hiperlactemia pode indicar aumento do metabolismo anaeróbico. Os valores de hematócrito, hemoglobina total e contagem de eritrócitos apresentaram-se aumentados, possivelmente, em resposta ao aumento do metabolismo anaeróbico. Os peixes submetidos à recuperação apresentaram glicogenólise muscular e redução dos níveis de piruvato neste tecido. No plasma, a hiperlactemia foi mantida. No fígado, houve uma queda nos níveis de proteína e aumento da concentração de glicose, glicogênio e lactato. Nosso estudo mostrou claramente que a ação estressora do fenol e sua toxicidade afetam funções metabólicas e hematológicas de pacu.

## ABSTRACT

Phenol compounds and their derivatives are usually found in wastewaters. They may rise in aquatic environments from industry, sewage and country-farm wastes. In the present study we intended to determine the acute toxicity of phenol (LC50-96 hours) and its effects on intermediary metabolism and hematology of pacu exposed to sublethal concentration for 96h. In addition, recovery was evaluated after one week. For such, glucose, pyruvate, lactate, protein, amino acids, ammonia and glycogen were gauged in liver, white muscle and plasma after 96h of phenol exposure. Sodium, potassium and chloride were quantified in plasma. Activities of ALAT (alanine aminotransferase), ASAT (aspartate aminotransferase) and LDH (lactate dehydrogenase) were assayed in white muscle and liver. The hematological parameters: hematocrit, hemoglobin concentration and red blood cell counting, plus the hematimetric indices: MCV, MCH, MCHC were determined. At the end of the recovery period the tissue metabolites were quantified, ions concentration was estimated in the plasma and haematological parameters were determined. The results depicted a CL50-96h of 33 mg/L for pacu. After 96h of sublethal exposure to phenol it was observed: protein decrease, free amino acids increase and activity rise of ALAT and ASAT in white muscle. This is very suggestive of muscle proteolysis. In liver and plasma the levels of glucose, free amino acids and lactate were augmented. Hyperlactemia may be a sign of anaerobic metabolism increase. Augmented values of hematocrit, total hemoglobin and red cell counting may be ought to anaerobic metabolism. After recovery, the fish showed muscle glycogenolysis and reduction of pyruvate levels. The hyperlactemia was still remained. In the liver, protein levels were diminished and glycogen, glucose and lactate were increased. In this work, the stress and toxicity caused by phenol in pacu were clearly observed as well as the metabolic and hematologic processes were visibly affected.

## 1. INTRODUÇÃO

A maioria das atividades antropogênicas pode ser fonte de contaminantes para os ecossistemas aquáticos e terrestres. Assim, é de fundamental importância o conhecimento sobre os processos de geração, transporte, biotransformação, efeitos na biota (respostas biológicas) e os destinos finais (acumulação em compartimentos de ecossistemas, órgãos e fluidos específicos da biota, etc) dos compostos químicos, orgânicos e inorgânicos, sólidos, líquidos ou gasosos, que são incorporados continuamente a esses ecossistemas (Mozeto e Zagatto, 2006).

Os efluentes são a principal fonte de entrada, direta e contínua, de poluentes para o ambiente aquático e podem causar efeitos ecotoxicológicos em diferentes níveis de organização biológica (Moens et al., 2007). O fenol e seus derivados são frequentemente despejados em corpos hídricos através de efluentes líquidos de atividades industriais, como, fábricas de papel, de couro, de tinta e de resinas, usina de carvão, manufatura de fenol, refinarias de óleo, indústria têxtil e química, petroquímica e outras, sem o devido tratamento (Krajnović-Ozretić e Ozretić, 1988; Davi e Gnudi, 1999; Mckim et al., 1999). Estes compostos também atingem os corpos aquáticos através de formulações de herbicidas, bactericidas e fungicidas utilizados na agricultura (Layiwola e Linnekar, 1981; Gupta et al., 1983b), por meio de efluentes domésticos urbanos (Key e Scott, 1986; Davi e Gnudi, 1999) e, ainda, por intermédio do benzeno, um poluente comumente encontrado no ambiente, que é metabolizado a compostos fenólicos (Medinsky et al., 1995; McKim et al., 1999; Wan e Winn, 2004). Os efluentes fenólicos são compostos em grande parte de fenol simples (Kotkat et al., 1999), o xenobiótico utilizado neste estudo.

Xenobióticos são compostos químicos estranhos ao organismo, ou seja, não considerados como componente natural do organismo, tais como poluentes ambientais, fármacos e aditivos alimentares (Murray et al., 2006). O fenol foi o xenobiótico selecionado para estes estudos devido ao seu bem caracterizado efeito tóxico sob espécies aquáticas (Key e Scott, 1986; Tišler e Zagorc-Končan, 1997; Sannadurgappa et al., 2007) e a sua ampla ocorrência no ambiente. Alguns compostos fenólicos, dentre os quais o fenol, está entre os contaminantes ambientais mais tóxicos e ubiqüitários (Verma et al., 1981; McKim et al., 1999), logo, são encontrados em uma variedade de efluentes industriais.

Certos poluentes encontrados em efluentes são suscetíveis a reagir com o anel benzênico do fenol em condições ambientais no meio aquático (Patnaik e Khoury, 2004). Durante os processos de tratamento de efluentes líquidos industriais, domésticos e zootécnicos,

por cloração, clorofenóis podem ser formados se esta água contiver compostos fenólicos (Key e Scott, 1986; Davi e Gnudi, 1999). Os clorofenóis, além de serem um risco à saúde humana e conferirem odor e sabor desagradáveis à água potável, até mesmo em baixas concentrações, podem causar toxicidade, persistência e bioacumulação em organismos animais e vegetais (Davi e Gnudi, 1999). O íon nitrito, freqüentemente encontrado em efluentes industriais, é suscetível a atacar o anel benzênico do fenol no ambiente aquático, formando dois isômeros de nitrofenol (2-nitrofenol e 4-nitrofenol), que são tóxicos a humanos e a muitas espécies aquáticas (Patnaik e Khoury, 2004).

Os efluentes tem uma composição complexa e freqüentemente variável, o que dificulta a avaliação de sua toxicidade e dos potenciais efeitos adversos específicos para cada um dos poluentes da mistura (Moens et al., 2007). Logo, os peixes são, normalmente, expostos não só a um tóxico, mas a uma mistura de substâncias simultaneamente. Alguns compostos fenólicos, como o fenol, o pentaclorofenol e o dinitrofenol, são considerados contaminantes ambientais ubiqüitários, portanto, estão presentes em muitos efluentes industriais (Verma et al., 1981) e, podem, com freqüência, ocorrerem ao mesmo tempo. Diferentes tóxicos podem interagir entre si no ambiente aquático, produzindo efeitos sinérgicos, antagônicos e aditivos, ou seja, a toxicidade de um poluente em uma mistura pode ser aumentada, reduzida ou inalterada, respectivamente (Verma et al., 1981). Muitos trabalhos mostram os efeitos provocados por interações sinérgicas, antagônicas e de adição de compostos fenólicos em peixes e organismos aquáticos (Verma et al., 1980; Gupta et al., 1983b; Key e Scott, 1986).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu em 0,003 mg/L a concentração máxima permitida de fenol nos corpos hídricos (Brasil, 2005). Entretanto, concentrações acima deste limite máximo permitido têm sido detectadas em bacias hidrográficas do estado de São Paulo pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2005). Concentrações de 0,003 mg/L a 0,011 mg/L foram encontradas nas seguintes bacias do estado de São Paulo: Pardo, Piracicaba, Capivari, Jundiaí, Alto Tietê, Baixada Santista, Mogi-Guaçu, Sorocaba, Médio Tietê, Ribeira-Iguapé, Baixo Pardo, Turvo, Grande, Tietê, Batalha, Médio Paranapanema, Baixo Tietê, Aguapé e Peixe; e de aproximadamente 0,53 mg/L no Pontal do Paranapanema (CETESB, 2005).

A análise química da água pode não ser suficiente para avaliar a qualidade dos ambientes aquáticos, logo, a utilização da biota é necessária para determinar o nível de aceitabilidade de efluentes em rios, lagos e mares e, os peixes podem oferecer o melhor modelo para atender esses propósitos (Bolis et al., 2001). Os peixes representam o último nível trófico da cadeia alimentar aquática e reagem sensivelmente às alterações ambientais (Lemos et al.,

2007). Em um estudo que compara a toxicidade do fenol em organismos aquáticos de diferentes grupos taxonômicos, Tišler e Zagorc-Končan (1997) constataram que o fenol é mais tóxico ao peixe (*Oncorhynchus mykiss*) do que às bactérias e a espécie de alga unicelular e de crustáceo utilizadas. Os peixes são os principais biomonitores de estresse ou alterações ambientais que podem afetar as populações aquáticas (Lemos et al., 2007).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie que pertence à família Characidae e subfamília Serrasalminae e destaca-se como importante organismo para a realização de testes de avaliação de toxicidade de xenobióticos, pois é uma importante espécie de cultivo e, segundo o IBAMA (1987), na ausência de espécies padronizadas para testes, recomenda-se a utilização de espécies da família Characiformes.

Uma estratégia comum para investigar os efeitos adversos e modos de ação toxicológicos após exposição a efluentes, ou para avaliar contaminação a certas classes de químicos, é o uso de biomarcadores. Durante a última década, uma diversidade de biomarcadores, incluindo uma variedade de alterações moleculares, bioquímicas e celulares, tem sido usados para avaliar efeitos de exposição a contaminantes em ambientes aquáticos (Moens et al., 2007).

Muitos métodos bioquímicos, como determinação da concentração de substratos metabólicos, tais como, glicogênio, glicose, lactato, piruvato, proteínas, aminoácidos livres e amônia são utilizados como indicadores de distúrbios metabólicos em peixes após intoxicação por xenobióticos. O estoque ou a mobilização desses substratos podem ser prejudicados em diversas espécies de peixes após exposição a poluentes (Scott e Sloman, 2004). Portanto, os níveis destes substratos podem ser alterados nos tecidos de peixes, não só pela exposição ao fenol (Swift, 1981; Dangé, 1986; Roche e Bogé 2000; Hori et al., 2006) como também a metais (Malik e Sastry, 1998; Levesque et al., 2002; Sobha et al 2007), e a pesticidas (Oruç e Uner, 1998; Begum e Vijayaraghavan, 1999; Das e Mukherjee, 2003; Begum, 2004; Glusczak et al., 2007; Petri et al., 2006).

Os mecanismos específicos pelos quais muitos desses xenobióticos alteram a disponibilidade de substratos metabólicos não estão claros, mas podem ser o resultado de efeitos tóxicos na concentração e na atividade de enzimas metabólicas (Scott e Sloman, 2004). Alterações da atividade destas enzimas também são utilizadas como indicadores de distúrbio metabólicos em peixes. O efeito estimulatório de compostos fenólicos na atividade de aminotransferases implica distúrbio no metabolismo de proteínas (Roche e Bogé, 2000). As atividades aumentadas das duas principais aminotransferases, ALAT (alanina aminotransferase) e ASAT (aspartato aminotransferase), em tecidos de *Brycon amazonicus* e *Oreochromis aureus*,



tem sido observada após exposição subletal ao fenol (Abdel-Hameid, 2007; Hori et al., 2006). Compostos fenólicos, tais como fenol, 2,4-dinitrofenol e pentaclorofenol, utilizados individualmente ou em combinação, têm um efeito estimulatório na atividade de ALAT e ASAT em vários tecidos de *Notopterus notopterus* (Gupta et al., 1983). Atividade aumentada de LDH (lactato desidrogenase), enzima envolvida na conversão lactato-pituvato, é observada em tecidos de peixes expostos ao fenol (Abdel-Hameid, 2007; Hori et al., 2006).

As variáveis hematológicas também são biomarcadores adequados para avaliar intoxicação por xenobióticos em peixes (Roche e Bogé, 1996; Roche e Bogé, 2000). Diversas alterações hematológicas são reportadas em peixes após exposição ao fenol e seus derivados (Swift, 1981; Roche e Bogé, 1996; Schwaiger et al., 2000; Roche e Bogé, 2000; Avilez et al., 2008). Bogé e Roche (1996) observaram efeitos citotóxicos de compostos fenólicos aos eritrócitos de *Dicentrarchus labrax*.

Valores de hematócrito, concentração de hemoglobina total, contagem de células vermelhas e valores derivados destes parâmetros são utilizados em muitos estudos de monitoramento de poluição ambiental (Nikinmaa, 1992). Marcadores eritrotóxicos são sensíveis ao fenol (Roche e Bogé, 2000).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Toxicocinética**

A toxicocinética é o ramo da toxicologia que busca conhecer o comportamento, no sentido de destino, do tóxico após seu contato com o organismo, desta forma, estuda a descrição de cinéticas de absorção, distribuição e acumulação, metabolismo e eliminação de xenobióticos administrados aos sistemas vivos (Azevedo e Lima, 2003), uma vez que estes parâmetros tóxico-farmacocinéticos são críticos para avaliar a eficácia, a toxicidade e o risco potencial de drogas e químicos (McKim et al., 1993). O destino metabólico das substâncias pode afetar enormemente a sua toxicidade e determinar a sua distribuição e excreção do organismo (Nascimento, 2006).

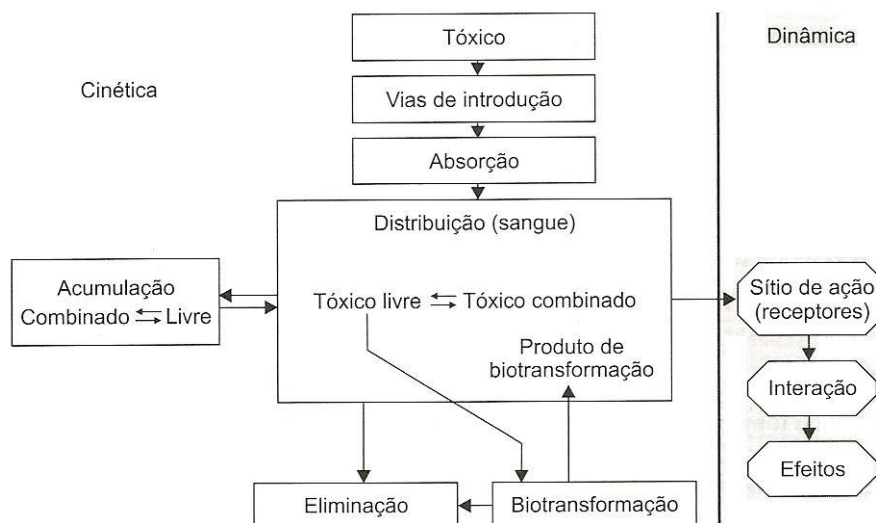


Figura 1 Cinética e dinâmica do agente tóxico no organismo (Azevedo e Lima, 2003).

Uma vez absorvidos, os xenobióticos atingem a circulação sanguínea e distribuem-se pelo organismo (Nascimento, 2006). A maioria das substâncias químicas está sujeita à biotransformação nos diversos organismos, porém, ocasionalmente, um xenobiótico pode ser excretado inalterado (Murray, 2006). A biotransformação é o conjunto de alterações químicas que as substâncias podem sofrer no organismo, geralmente por processos enzimáticos, que visa formar derivados mais polares, mais solúveis em água e, em geral, de maior tamanho e peso molecular, resultando, quase sempre, na diminuição ou na perda de seu efeito tóxico (Azevedo e Lima, 2003). Uma importante característica das enzimas que catalisam as reações de biotransformação é que são induzidas por uma variedade de xenobióticos (Pesonen e Andersson, 1991).

A biotransformação de xenobióticos a metabólitos menos tóxicos é uma função essencial em resposta à exposição tóxica (Gaworecki et al., 2004). No entanto, nem sempre a biotransformação de um químico reduz a sua atividade farmacológica ou tóxica, logo, pode produzir, às vezes, compostos de maior toxicidade (Azevedo e Lima, 2003). O benzeno exerce sua toxicidade, principalmente, através de seus produtos de biotransformação (fenol, hidroquinona e catecol), que são compostos mais reativos que o próprio benzeno (Tsutsui et al., 1997; Wan e Winn, 2004). E ainda, uma substância inativa pode ser transformada em substância terapeuticamente ativa ou tóxica após sofrer biotransformação. Há vários exemplos de substâncias que devem aos produtos de biotransformação a natureza de seus efeitos (Azevedo e Lima, 2003; Nascimento, 2006). A taxa de biotransformação de um xenobiótico é

um dos principais fatores determinantes do seu efeito tóxico ou resposta farmacológica (Layiwola e Linnekar, 1981).

A biotransformação de compostos químicos compreende uma sequência de reações, que podem ser divididas em duas fases. Na fase I os citocromos P450 introduzem grupos funcionais à molécula (Pesonen e Andersson, 1991), formando intermediários que são bons substratos para as subseqüentes reações de conjugação de fase II (Gaworecki et al., 2004). Oxidação, redução e degradação são as principais reações envolvidas na fase I (Azevedo e Lima, 2003). A indução do sistema enzimático citocromo P450, pela exposição a certos xenobióticos, é um processo usado para adaptação do organismo a alterações no ambiente e pode afetar a biotransformação destes compostos, de forma qualitativa e quantitativa (Pesonen e Andersson, 1991).

Na fase II, as moléculas produzidas na fase I são conjugadas enzimaticamente com uma variedade de compostos hidrofílicos, tais como o ácido glicurônico, sulfato, acetato, glutationa ou certos aminoácidos, tornando-os ainda mais hidrossolúveis (Murray, 2006).

O intuito geral das duas fases do metabolismo de xenobióticos consiste em aumentar sua solubilidade em água e, desta forma, facilitar a sua excreção do organismo (Murray, 2006). Em alguns casos as reações de hidroxilação da fase I podem terminar a ação de um fármaco e, em outros são as reações de conjugação da fase II que convertem produtos ativos das reações da fase I em espécies menos ativas ou inativas, que são, posteriormente, excretadas (Murray, 2006).

Em peixes, assim como em mamíferos, o fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação de xenobióticos (Cravedi et al., 1999; Pesonen e Andersson, 1991), embora outros tecidos também possam participar dessa função em grau variável (Azevedo e Lima, 2003). Sulfotransferases fenólicas foram encontradas no fígado e intestino de *Ictalurus punctatus* (Tong e James, 2000). O local onde um composto será biotransformado depende, em partes, do modo de exposição ao tóxico (Medinsky et al., 1995).

### **2.1.1 Toxicocinética dos Compostos Fenólicos**

A biotransformação e a excreção do fenol têm sido reportadas em peixes (Layiwola e Linnekar, 1981; McKim et al., 1993; Swift, 1981; Solem et al., 2003). O fenol pode atingir o peixe através das brânquias, do epitélio mucoso da boca (Verma et al., 1980) ou do trato digestório (Bogé e Roche, 1996), alcançar a corrente sanguínea e por fim, distribuir-se em diferentes tecidos (Verma et al., 1980). Em tecidos de *Oncorhynchus mykiss*, a concentração

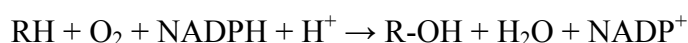
máxima de fenol é alcançada depois de aproximadamente três horas de exposição subletal, quando então, um equilíbrio entre a absorção e a excreção é alcançado e as concentrações teciduais de fenol não são mais aumentadas (Swift, 1981).

A concentração de fenol no tecido renal de *Oreochromis mossambicus* expostos a concentrações subletais de fenol aumenta em função do tempo de exposição e da concentração no tratamento, no entanto, uma ligeira tendência para a eliminação pode ser observada, com o passar do tempo, durante o período de recuperação livre de fenol (Sannadurgappa et al., 2007). As concentrações de exposição ao fenol parecem afetar o mecanismo de destoxificação presentes no rim de *Oreochromis mossambicus* por retardar a eliminação do fenol e aumentar sua bioacumulação neste tecido (Sannadurgappa et al., 2007).

O metabolismo do fenol é de particular interesse porque é o principal metabólito oxidado do benzeno (Medinsky et al., 1995), um conhecido agente mutagênico, carcinogênico (Tsutsui et al., 1997) e hematotóxico (Wan e Winn, 2004), comumente encontrado no ambiente (Medinsky et al., 1995). É necessário que o benzeno seja, primeiramente, biotransformado a metabólitos hidroxilados, tais como fenol e catecol, para exercer sua toxicidade (Wan e Winn, 2004).

### **Reações de Fase I**

As reações de fase I são catalisadas por um diversificado número de enzimas, dos quais o mais importante é o citocromo P450, que compreende uma superfamília de sistemas enzimáticos ligados às membranas do retículo endoplasmático liso de células que se localizam na fração microsomal (Nascimento, 2006). A principal reação envolvida na fase I do metabolismo do fenol é a hidroxilação do anel benzênico (Murray, 2006). Os citocromos P450 ligam-se tanto a xenobióticos (RH) como ao oxigênio molecular e catalisam a transferência de um átomo de oxigênio ao substrato orgânico (RH), enquanto o outro átomo é reduzido a água, segundo a reação descrita (Nascimento, 2006):



Os metabólitos de fenol gerados na fase I são hidroquinona e catecol (Medinsky et al., 1995; Murray, 2006). Estes metabólitos são produzidos pelas reações de fase I da biotransformação hepática do fenol em *Oncorhynchus mykiss* (Kolanczyk e Schmieder, 2002; Solem et al., 2003).

## Reações de Fase II

Os intermediários polihidroxilados, formados na fase I do metabolismo do fenol e, o próprio fenol não biotransformado, são os substratos para as subseqüentes reações de conjugação da fase II. Várias enzimas de fase II, tais como glicuroniltransferases e sulfotransferases, são induzidas por compostos fenólicos e seus metabólitos (Medinsky et al., 1995; Gaworecki et al., 2004). Os produtos de conjugação têm, geralmente, menor toxicidade, maior solubilidade em água e, portanto, são mais prontamente excretáveis (Gaworecki et al., 2004; Nascimento, 2006). As reações de fase II para o metabolismo dos compostos fenólicos são:

### Reações de Glicuronidação

Nestas reações, o ácido UDP-glicurônico (UDPGA) endógeno é o doador de glicuronila a diversos aceptores (Azevedo e Lima, 2003). As enzimas que catalisam esse processo são uma série de glicuroniltransferases microsossomais, presentes no retículo endoplasmático e no citossol (Murray, 2006). A glicuronila é sintetizada em vários tecidos, particularmente na parede intestinal e hepática, o que pode contribuir significativamente para a eliminação pré-sistêmica de substratos como os fenóis (Nascimento, 2006).

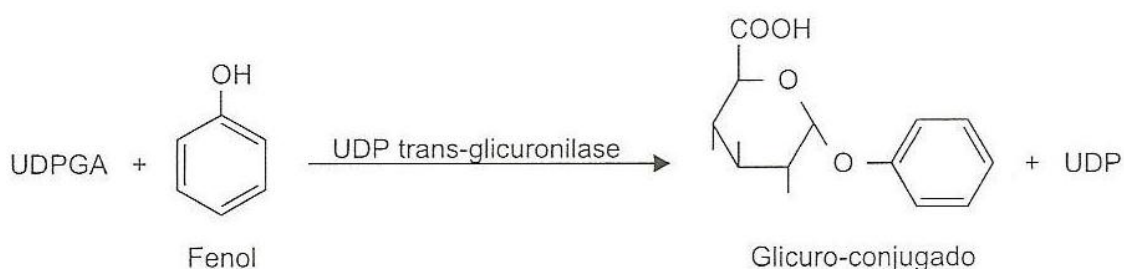


Figura 2 Reação de glicuronidação do fenol (Azevedo e Lima, 2003).

### Reações de Sulfatação

As reações de conjugação com sulfato são catalizadas por enzimas citoplasmáticas, conhecidas como sulfotransferases ou sulfoquinases, que utilizam sulfato de alta energia (3'-fosfoadenosina-5' fosfosulfato - PAPS), como substrato endógeno para a sulfatação dos grupos OH (Nascimento, 2006), logo, este tipo de conjugação é uma importante via para

biotransformação de compostos com grupo –OH fenólico (Tong e James, 2000; Azevedo e Lima, 2003). As sulfotransferases fenólicas catalizam a transferência do grupo sulfato da PAPS para compostos fenólicos e catecólicos, formando ésteres de sulfato (Tong e James, 2000).

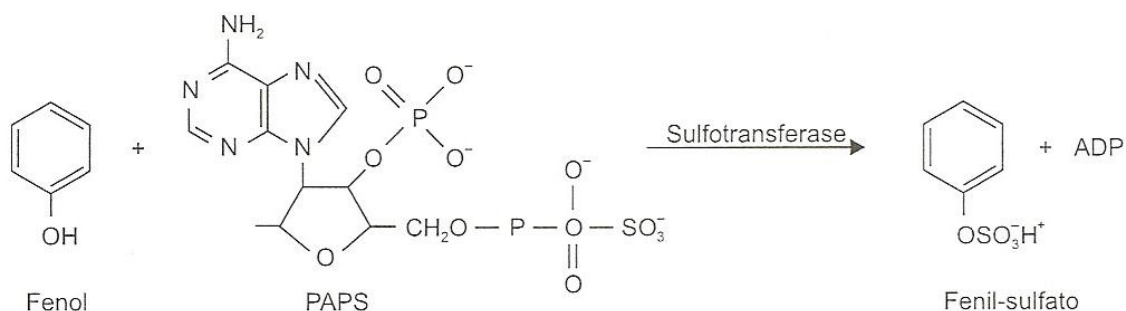


Figura 3 . Reação de sulfatação do fenol (Azevedo e Lima, 2003)

Em peixes, o fenol pode ser metabolizado pelas reações de fase I e ser eliminado na forma de hidroquinona (McKim, 1999), todavia, quando a sua oxidação à hidroquinona é inibida, o fenol pode ser conjugado com o ácido UDP-glicurônico ou PAPS (Medinsky et al., 1995) e ser eliminado como fenil glicuronídeo e fenil sulfato, respectivamente (Nagel, 1983; McKim, 1999). A hidroquinona, formada nas reações de fase I, pode também ser conjugada pelas reações de fase II e ser eliminada como hidroquinona sulfato (Nagel, 1983) ou hidroquinona glicuronídeo (Medinsky et al., 1995). O fenol pode ainda ser eliminado sem ser metabolizado (McKim et al., 1999).

Em *Carassius auratus*, a taxa de eliminação de fenol, seu metabolismo a hidroquinona, e o padrão quantitativo de conjugados são influenciados pela dose administrada e pelo modo de exposição ao xenobiótico (Nagel, 1983). Em um estudo do metabolismo do fenol, *in vivo*, as oito espécies de peixe de água doce utilizadas produziram conjugados de fenil sulfato e quatro dessas espécies produziram glicuronídeos de fenol, demonstrando sulfatação e glicuronidação como caminhos para a destoxificação para o fenol em peixes de água doce (Layiwola e Linnekar, 1981).

As vias de eliminação do fenol e seus metabólitos, em peixes, são as brânquias, bile, urina e pele (McKim et al., 1999). A rota de eliminação de um composto será determinada, em partes, pelo seu grau de polaridade (McKim et al., 1999). Quanto à excreção do fenol e seus metabólitos, em *Oncorhynchus mykiss*, mais de 50% é eliminado através da urina e o restante extra-renalmente (McKim et al., 1999).

## 2.2. Toxicodinâmica dos Compostos Fenólicos

A toxicodinâmica é a área da toxicologia que se ocupa do estudo dos mecanismos de ação dos tóxicos, inclusive no plano molecular, e seus efeitos bioquímicos e fisiológicos (Azevedo e Lima, 2003). Um amplo e variado espectro de efeitos tóxicos dos compostos fenólicos em peixes tem sido reportados. Embora considerável literatura a respeito da toxicidade do fenol em organismos aquáticos esteja disponível, o mecanismo exato de sua toxicidade não é claramente conhecido (Bucher e Hofer, 1993; Saha et al., 1999).

A assimilação e a retenção do fenol por peixes podem afetar o metabolismo intermediário (Gupta et al., 1983b; Sannadurgappa et al., 2007; Hori et al., 2006), alterar o comportamento (Verma et al., 1980; Gupta et al., 1982; Abdel-Hameid, 2007), reduzir a captação de oxigênio (Verma et al., 1980; Saha et al., 1999), prejudicar a reprodução (Mitrovic et al., 1968; Saha et al., 1999), o crescimento (Saha et al., 1999) e provocar uma diminuição do apetite (Saha et al., 1999; Abdel-Hameid, 2007). Esta perda do apetite, induzida pelo fenol, é uma das principais razões da redução do crescimento e do desenvolvimento do peixe após exposição crônica a concentrações subletais de fenol, uma vez que a taxa de alimentação é substancialmente reduzida (Saha et al., 1999).

A alta incidência de alterações histopatológicas em *Oreochromis aureus* exposto ao fenol reflete o efeito degenerativo do fenol em fígado de peixes (Abdel-Hameid, 2007). Severas alterações histopatológicas em brânquias e fígado são reportadas em *Cottus gobio* após exposição subletal ao fenol por 35 dias (Bucher e Hofer, 1993). Tecidos respiratórios, pele, faringe e órgãos parenquimatosos de *Oncorhynchus mykiss*, expostos ao fenol por uma semana, apresentaram danos suficientes para prejudicar a sobrevivência do animal (Mitrovic et al., 1968)

Os compostos fenólicos são, ainda, conhecidos por suas propriedades imunotóxicas (Taysse et al., 1995; Bols et al., 2001), genotóxicas (Jagetia e Aruna, 1997; Tsutsui et al., 1997; Iso et al., 2006), carcinogênicas (Tsutsui et al., 1997) e citotóxicas (Bogé e Roche, 1996; Fent e Hunn, 1996; Tollefsen et al., 2008). Um estudo dos efeitos tóxicos de bromofenóis mostrou que estas substâncias causam malformações letais (falta de batimentos cardíacos) e não-letais (deformação na espinha, edema no saco vitelino e falta de pigmentação) em embriões de *Danio rerio* (Kammann et al., 2006). Roche e Bogé (2000) também constataram efeitos letais e não-letais em *Dicentrarchus labrax* expostos ao fenol e a hidroxifenóis.

O fenol e alguns derivados fenólicos (nonilfenol, bisphenol A, 4-terc-butilfenol e bromofenóis) fazem parte do grupo de químicos disruptivos endócrinos (Kumar e Mukherjee et

al., 1988; Barse et al., 2006; Hassenklöver et al., 2006; Iso et al., 2006). Alguns destes compostos tem efeito estrogênico (Schwaiger et al., 2000; Olsen et al., 2002; Barse et al., 2006), o qual é atribuído à afinidade que estes compostos tem pelos receptores de estrogênio (Olsen et al., 2002). Uma vez que estes compostos têm efeito estrogênico, podem induzir a produção de vitelogenina pelo fígado de machos de *Cyprinus carpio*, afetando direta e indiretamente os órgãos reprodutores e o fígado, incluindo inibição da espermatogênese nas gônadas e alta incidência de alterações histopatológicas em ambos os tecidos (Barse et al., 2006). Em fêmeas de *Cyprinus carpio* o fenol tem um efeito inibitório no desenvolvimento e maturação do ovário (Kumar e Mukherjee et al., 1988).

Um outro mecanismo de ação é reportado para alguns destes compostos disruptivos endócrinos. A secreção de hormônios é controlada pelo influxo de  $Ca^{2+}$ , bromofenóis causam distúrbios da sinalização do  $Ca^{2+}$  celular. A redução da despolarização, induzida pela elevação de  $Ca^{2+}$  pode ter alguma ligação com o efeito disruptivo do sistema endócrino por bromofenóis em organismos marinhos (Hassenklöver et al., 2006).

### **2.3. *Piaractus mesopotamicus***

Entre os organismos aquáticos de importância crescente, os peixes destacam-se por seu valor econômico e, espécies como o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) estão cada vez mais sendo utilizadas em aquicultura devido a sua fácil adaptação aos sistemas de criação, a alta taxa de crescimento e boa aceitação no mercado consumidor. O pacu é produzido em cerca de 80% das pisciculturas comerciais em todos os estados brasileiros e em 77% das pisciculturas do estado de São Paulo (Lopes, 2000).

O pacu é uma espécie migratória encontrada nas Bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai. É um peixe onívoro, que se alimenta principalmente de folhas, caules, flores, frutos e sementes, todavia, havendo necessidade e oportunidade, ele se alimenta de insetos, aracnídeos, moluscos e peixes (Urbinati e Gonçalves, 2005). É um dos peixes mais estudados no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e recebe os nomes de caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu (Urbinati e Gonçalves, 2005).



### 3. JUSTIFICATIVA

O fenol foi o xenobiótico selecionado para estes estudos devido ao seu bem caracterizado efeito tóxico sob espécies aquáticas (Key e Scott, 1986; Tišler e Zagorc-Končan, 1997; Sannadurgappa et al., 2007) e a sua ampla ocorrência no ambiente. Alguns compostos fenólicos, dentre os quais o fenol, está entre os contaminantes ambientais mais tóxicos e ubiqüitários (Verma et al., 1981; McKim et al., 1999).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie que pertence à família Characidae e subfamília Serrasalminae e destaca-se como importante organismo para a realização de testes de avaliação de toxicidade de xenobióticos, pois é uma importante espécie de cultivo e, segundo o IBAMA (1987), na ausência de espécies padronizadas para testes, recomenda-se a utilização de espécies da família Characiformes.

Uma vez que os processos bioquímicos e hematológicos representam parâmetros sensíveis e relativamente precoces de danos por poluentes, foram utilizados como indicadores de toxicidade do fenol em pacu.

#### 4. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Determinar a CL50-96h do fenol para *Piaractus mesopotamicus*;
- Verificar os efeitos metabólicos e hematológicos da exposição subletal ao fenol (10 % da CL50-96h) em *Piaractus mesopotamicus*;
- Verificar os efeitos metabólicos e hematológicos da recuperação de uma semana em *Piaractus mesopotamicus*.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Adaptativa, no Departamento de Genética e Evolução, na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Foram utilizados pacus provindos do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista - CAUNESP (Jaboticabal, SP).

Os exemplares de pacu, com o peso e comprimento médios de  $68,5 \pm 7,8$  g e  $15,4 \pm 0,6$  cm foram aclimatados por quatro semanas em uma caixa de 2000 L com aeração constante a uma temperatura de  $26,5 \pm 1,2$  °C. Durante a aclimação, os peixes foram diariamente alimentados com dieta comercial (35% de proteína bruta) até a saciedade.

### **5.1. Desenho experimental**

#### **5.1.1. Determinação da toxicidade aguda (CL50-96h) do fenol para o pacu**

Setenta e dois peixes coletados aleatoriamente foram igualmente distribuídos em seis caixas de 250 L, para a determinação da CL50-96 h, nas mesmas condições dos subseqüentes experimentos de exposição subletal. Após a transferência para as caixas, os peixes permaneceram por sete dias para aclimação às novas condições e então submetidos às concentrações de 5, 10, 25, 30 e 50 mg/L de fenol. A um sexto grupo, utilizado como controle, não foi adicionado fenol. O sistema de exposição ao fenol foi semi-estático com um período de renovação de 12 horas, ou seja, a cada 12 horas toda a água era renovada e a concentração de fenol na água era repostada. Os peixes foram alimentados até 24 h antes da adição do fenol à água e permaneceram em jejum por todo o período experimental. A mortalidade era registrada a cada 24 horas ao longo das 96 horas de exposição.

#### **5.1.2. Exposição subletal ao fenol e recuperação**

Noventa e seis peixes, coletados aleatoriamente do sistema de aclimação, foram distribuídos em oito caixas de 250 L, na densidade de estocagem de aproximadamente 3,0 g/L. Depois de uma semana de aclimação, os peixes de quatro caixas (duas experimentais e duas réplicas) foram expostos a uma concentração de 3,3 mg/L (10% da CL50-96h) por 96 horas. Quatro caixas nas mesmas condições foram mantidas sem adição de fenol (duas

controle e duas réplicas). Esse sistema foi mantido em regime semi-estático, com um período de renovação de 12 horas. A alimentação foi suspensa 24 horas antes da adição do fenol e, os peixes não foram alimentados durante o período experimental, de acordo com Aguiar et al., (2004), Hori et al, (2006), Glusczak et al., (2007), para evitar diferenças metabólicas devido à possíveis diferentes taxas de alimentação (Reddy et al., 1993; Jyothi e Narayan, 1999). Não foi observada nenhuma mortalidade durante o período experimental.

Após 96 horas de exposição, seis peixes de cada uma das quatro caixas, uma experimental e uma controle e suas respectivas réplicas, totalizando 24 exemplares (n=12), foram amostrados aleatoriamente para coleta de sangue e tecidos. Nas caixas restantes, ao final das 96 horas, a água foi renovada e o fenol não foi mais adicionado e, os peixes permaneceram em recuperação por uma semana. Após este período, procedeu-se, então, a coleta de sangue e tecidos, exatamente como foi realizado no experimento de exposição subletal.

## **5.2. Preparação das amostras**

Os animais amostrados foram anestesiados em solução de óleo de cravo 40 mg/L (Inoue et al., 2003) e o sangue foi coletado, por punção caudal, com seringas heparinizadas. Em seguida, os peixes foram mortos para a retirada de fígado e músculo branco. Parte do sangue total coletado foi utilizada para determinação das variáveis hematológicas e o restante foi imediatamente centrifugado a 13 400g por três minutos para separação do plasma. Os tecidos e o plasma foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C para a determinação da concentração de metabólitos e ensaios enzimáticos.

## **5.3. Preparação dos extratos celulares**

Os intermediários metabólicos de plasma e tecidos foram quantificados em extratos ácidos livres de proteína, em extratos alcalinos ou em extratos neutros.

O extrato ácido foi obtido dos tecidos e do plasma após sua homogeneização em ácido tricloroacético (TCA) 20%, em homogeneizador rotativo a 1000 rpm, em duas séries de 20 segundos, resultando na precipitação de proteínas que foram eliminadas após centrifugação a 13 400g por três min. O precipitado era descartado e o sobrenadante utilizado para as determinações bioquímicas de lactato, piruvato e amônia.

O extrato alcalino foi obtido de tecidos submetidos à digestão em KOH 6,0 N por dois minutos em banho-maria (água fervente). Após digestão total das amostras de músculo e fígado, os extratos foram utilizados nas determinações de glicogênio.

O extrato neutro de tecidos foi obtido após sua homogeneização em água destilada com homogeneizador rotativo a 1000 rpm, em duas séries de 20 segundos, resultando em sua desintegração total. Os fragmentos celulares eram eliminados por centrifugação a 13 400g por três minutos e o sobrenadante, utilizado para as determinações de aminoácidos, proteínas e glicose. O extrato neutro de plasma foi obtido por simples diluição em água destilada. O plasma foi utilizado ainda sem qualquer diluição como plasma total.

#### **5.4. Preparação dos homogeneizados celulares**

Os ensaios enzimáticos foram realizados em homogeneizados crus obtidos de fígado e músculo branco. Frações de tecidos (50 a 100 mg) foram homogeneizados em tampão de homogeneização (50% glicerol e 50% tampão fosfato 10 mM, pH 7.0) na proporção de 1:20, sob banho de gelo em homogeneizador rotativo a 1000 rpm, em duas séries de 20 segundos. Os homogeneizados foram centrifugados duas vezes: a 600g por três minutos e subseqüentemente a 6 000g por oito minutos, a 4 °C e, o sobrenadante foi empregado nas determinações enzimáticas.

#### **5.5. Análises bioquímicas**

##### **5.5.1. Intermediários metabólicos em tecidos e plasma**

###### **5.5.1.1. Glicogênio**

As determinações de glicogênio foram realizadas segundo Bidinotto et al. (1997). Porções de fígado e músculo dos pacus amostrados foram transferidas para tubos de ensaio na proporção de 50 a 100 mg de tecido para um mililitro de KOH 6,0 N. Os tubos foram incubados a 100 °C, em banho-maria, por três a cinco minutos ou até digestão total dos tecidos.

Após a digestão alcalina dos tecidos, 250 µL dos extratos foram transferidos para tubos de ensaio e foram adicionados três mililitros de álcool absoluto e 100 µL de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 % seguidos de agitação. A seguir, os tubos foram centrifugados a 2000 g por três minutos, o sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado ressuscitado em 2,5 mL de água

destilada. Os níveis de açúcares redutores totais foi determinado, em um volume adequado desta solução, pelo método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1956) utilizando-se um padrão contendo 50 nmols de glicose. O conteúdo de glicogênio foi expresso em  $\mu$ mols de glicosil-glicose/mg de tecido.

#### **5.5.1.2. Glicose**

Os níveis de glicose foram estimados através do método enzimático de glicose oxidase (Trinder, 1969). A uma alíquota de amostra, em uma micro-placa de leitura óptica, é adicionado o reagente de glicose oxidase e a placa é incubada a 37 °C por 10 minutos. A leitura foi realizada em um leitor de micro-placas “microplate reader” (Termomax®, Molecular Devices) a 525 nm.

#### **5.5.1.3. Lactato**

Os teores de lactato foram mensurados segundo o método descrito por Harrower & Brown (1972). Uma fração de extrato ácido foi adicionado a um meio de reação contendo 20  $\mu$ L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4 % e 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguido de incubação a 100 °C por cinco minutos e subsequente resfriamento em banho de gelo. A seguir 80  $\mu$ L de p-fenilfenol (1,5 g de p-fenilfenol em 100 mL de solução aquosa de NaOH 2 %) foram adicionados ao meio de reação. Os tubos eram agitados em vortex e mantidos em temperatura ambiente por uma hora. Após este período os tubos foram novamente incubados a 100 °C, por 90 segundos e resfriados em banho de gelo. O produto violáceo resultante foi lido em 570 nm. A concentração de lactato foi estimada contra um padrão de lactato contendo 30 nmols.

#### **5.5.1.4. Piruvato**

Para as determinações de piruvato foi utilizado o método descrito por Lu (1939). A uma alíquota de extrato ácido foram adicionados 250  $\mu$ L de dinitrofenilhidrazina 0,1 % (em solução aquosa de HCl 2,0 N) e os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após este período, foi adicionado ao meio de reação 3 mL de NaOH 1,3 N e a leitura óptica foi realizada em 440 nm. A concentração de piruvato foi determinada contra um padrão de piruvato contendo 20 nmols.

#### **5.5.1.5. Amônia**

A amônia foi estimada por nesslerização (Gentzkow e Masen, 1942). Uma fração de extrato ácido foi transferido para um tubo contendo quantidade suficiente de água destilada para um volume final de 2,0 mL, onde foi adicionado então 500 µL de reativo de Nessler. A leitura óptica foi realizada em 420 nm e a concentração foi determinada contra um padrão contendo 20 nmols.

#### **5.5.1.6. Aminoácidos Livres**

As concentrações de aminoácidos livres foram determinadas segundo o método descrito por Copley (1941). Uma alíquota de extrato neutro foi adicionada a 2,0 mL de solução de nihidrina 0,1% (em propanol) e aquecida por trinta minutos em banho-maria a 40 °C. O produto de reação foi lido em 570 nm e a concentração de aminoácidos livres foi estimada contra um padrão de glicina contendo 100 nmols.

#### **5.5.1.7. Proteínas Totais**

Os teores de proteína total foram determinados segundo o método de Bradford (Kruger, 1994). O reagente de Bradford é adicionado a uma alíquota de amostra em uma micro-placa de leitura fotométrica e a leitura óptica foi realizada em um leitor de micro-placas “microplate reader” (Termomax®, Molecular Devices) a 625 nm.

### **5.5.2. Íons plasmáticos**

As concentrações plasmáticas de sódio e potássio foram determinadas em um fotômetro de chama Digimed (modelo DM-61), contra um padrão de 140 mEq de sódio e de 5 mEq de potássio. As concentrações plasmáticas de íons cloreto foram determinadas colorimetricamente, em 480 nm e a leitura foi realizada contra um padrão de 200 nmols, segundo o método adaptado de APHA (1980). Todos os íons foram mensurados em duplicata, em plasma diluído 1:100.

### **5.5.3. Ensaios enzimáticos em tecidos**

As atividades enzimáticas foram determinadas (em duplicata) no tecido muscular e hepático, sob condições de saturação de substrato.

### **5.5.3.1. Lactato desidrogenase**

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada cineticamente em 340 nm em um meio contendo piruvato (5,0 mM), NADH (0,1 mM) e tampão TRIS (42,5 mM), para um volume final de reação de 2 mL com um pH de 7,5. A reação era realizada a 25 °C, acompanhando-se o consumo de NADH por um minuto (Hochachka et al., 1978). A atividade de LDH foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de NADH expressa em  $\mu\text{mol}$  oxidada por minuto.

### **5.5.3.2. Alanina Aminotrasferase**

A atividade da alanina aminotransferase (ALAT) foi determinada colorimetricamente pelo método adaptado de Reitman e Frankel (1957), em um meio contendo alanina 222 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 11,6 mM, piridoxal fosfato 0,27 mM, arsenato 0.22 mM e tampão fosfato 200 mM para um volume final de reação de 800  $\mu\text{L}$  (pH 7,5). A reação era incubada a uma temperatura de 37 °C por 30 minutos. Passado este período, a reação era interrompida por solução de dinitrofenilhidrazina 0,1 % em HCl 2 N, centrifugada a 13 400g por três minutos a 4 °C e, revelada por NaOH 1,3 N. A leitura óptica foi realizada em 440 nm (Lu, 1939). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de cetoácido em  $\mu\text{mol}$  formado por minuto.

### **5.5.3.3. Aspartato aminotransferase**

A atividade da aspartato aminotransferase (ASAT) foi determinada colorimetricamente pelo método adaptado de Reitman e Frankel (1957), em um meio contendo aspartato 44,4 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 11,6 mM, piridoxal fosfato 0,27 mM, arsenato 0.22 mM e tampão fosfato 200 mM para um volume final de reação de 800  $\mu\text{L}$  (pH 7,5). A reação foi incubada a uma temperatura de 37 °C por 30 minutos. Passado este período, a reação era interrompida por solução de dinitrofenilhidrazina 0,1 % em HCl 2 N, centrifugada a 13 400g por três minutos a 4 °C e, revelada por NaOH 1,3 N. A leitura óptica foi realizada em 440 nm (Lu, 1939). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de cetoácido em  $\mu\text{mol}$  formado por minuto.



## 5.6. Determinações hematológicas

### 5.6.1. Hematócrito

O hematócrito foi determinado pela técnica de centrifugação em microcapilares, preenchidos com a amostra de sangue e depois vedados, em uma das extremidades, com massa de modelar. Os microcapilares foram centrifugados a 12 000g por três minutos e a leitura, dada em porcentagem, foi realizada em um cartão de leitura de hematócrito

### 5.6.2. Hemoglobina Total

Os níveis de hemoglobina total foram determinados, fotometricamente, pela formação de cianometahemoglobina como descrito por Collier (1944). Uma alíquota de 10  $\mu$ L de sangue eram adicionados a 2,0 mL de solução de Drabkin, seguido de homogeneização em agitador vortex. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 540 nm. A concentração de hemoglobina total foi calculada pela expressão matemática:

$$\text{Hb (g\%)} = Ab_{\text{amostra}} \times 0,143 \times \text{diluição}$$

### 5.6.3. Contagem de eritrócitos (RBC)

Os eritrócitos foram contados em uma câmara de Neubauer. A partir de uma alíquota de 10  $\mu$ L de sangue total, foi feita uma diluição de 1:200 (V/V) em solução de citrato de formol. Essa mistura foi aplicada na câmara e os eritrócitos foram contados em cinco quadrados (correspondentes a 80 quadrados menores, pois cada quadrado maior tem 16 quadrados menores). Para obter o número de eritrócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue foram acrescentados quatro zeros à soma total do número de eritrócitos contados nos cinco grupos de quadrados (Lima, 1969). Os valores foram expressos em milhões de eritrócitos por  $\text{mm}^3$ .

### 5.6.4. Volume Corpuscular Médio (VCM)

O VCM foi calculado a partir da seguinte expressão:

$$\text{VCM } (\mu\text{mm}^3) = [(\text{Hematócrito/RBC}) \times 10]$$

### **5.6.5. Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)**

O HCM foi calculado a partir da seguinte expressão:

$$\text{HCM (pg/célula)} = [(\text{Hb total/RBC}) \times 10]$$

### **5.6.6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)**

O CHCM foi calculado a partir da seguinte expressão:

$$\text{CHCM (\%)} = [(\text{Hb total/Hematócrito}) \times 10]$$

## **6. ESTATÍSTICA**

As variáveis metabólicas e hematológicas foram avaliados quanto à sua normalidade através do teste de Cramer-von Mises, aceitando-se um intervalo de confiança de 95%. As diferenças entre o grupo controle e grupo exposto foram avaliadas por ANOVA “one-way” e submetidas ao Teste de Tukey para amostras paramétricas, ou ANOVA “one-way non-parametric” e submetidas ao Teste de Kruskal-Wallis para amostras não-paramétricas. Para a análise estatística dos dados foi empregado o programa SAS v.8.0.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Condições Ambientais

As variáveis de qualidade de água das caixas experimentais mantiveram-se constantes ao longo de todos os períodos experimentais. A temperatura manteve-se em  $26,5 \pm 1,2$  °C; o oxigênio dissolvido (OD) em  $5,5 \pm 0,8$  mg/L; o pH em  $7,4 \pm 0,2$ ; a condutividade em  $89,5 \pm 8,8$   $\mu$ S/cm; a dureza em  $29,0 \pm 0,5$  mg/L (como CaCO<sub>3</sub>); a alcalinidade em  $55,4 \pm 2$  mg/L (como CaCO<sub>3</sub>) e a amônia em  $0,22 \pm 0,02$  mg/L.

Durante os experimentos de determinação de CL50-96 h, assim como no experimento de exposição subletal, os peixes produziram quantidades excessivas de muco. A pele dos peixes apresentava uma espessa camada de muco e a água de exposição apresentava-se turva.

### 7.2. Toxicidade aguda do fenol para o pacu

Durante o teste de toxicidade, não houve mortalidade no grupo controle, 5, 10 e 25 mg/L. No grupo 30 mg/L, cinco peixes morreram em 24 horas e no grupo 50 mg/L, todos os peixes morreram, também em 24 horas.

Tabela 1 Mortalidade de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao fenol

Concentração de Fenol (mg/L)	Mortalidade Final	Mortalidade (%)
0	0	0
5	0	0
10	0	0
25	0	0
30	6	50
50	12	100

CONCENTRAÇÃO LETAL 50% (CL(I) 50-96h) = 33,0 mg/L

### 7.3. Metabolismo intermediário de pacus após exposição subletal e recuperação

### 7.3.1. Metabolismo Protéico

#### 7.3.1.1. Proteínas Totais

Os níveis de proteínas totais no músculo branco tiveram uma redução significativa, de 45% após 96 horas de exposição e mantiveram-se inalterados após a recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentadas na tabela 2 e na figura 4. O conteúdo de proteínas totais no plasma não teve diferença significativa nem na exposição, nem na recuperação e, os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 3. No fígado a concentração de proteínas totais não teve alteração significativa após a exposição subletal, porém, apresentou uma redução de 19% ao final do período de recuperação. Os valores estão apresentados na tabela 4 e na figura 5.

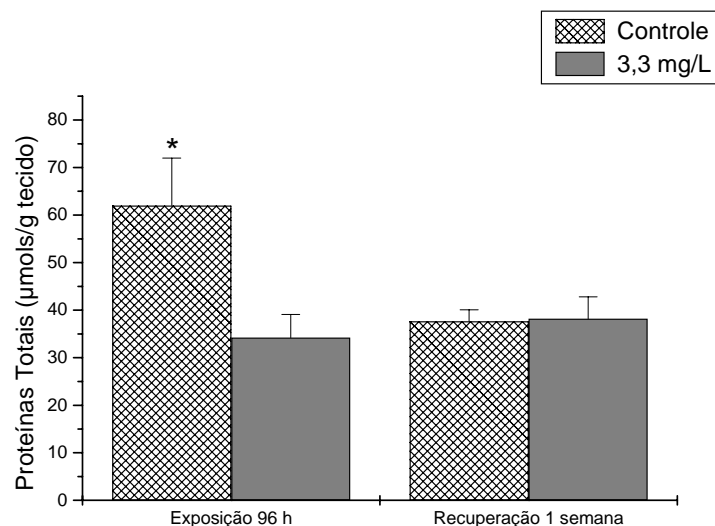


Figura 4 . Concentração de proteínas totais no músculo branco de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

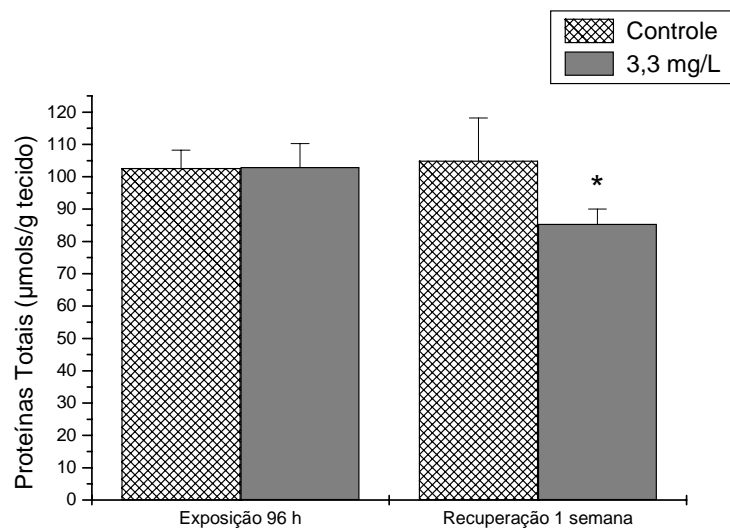


Figura 5 . Concentração de proteínas totais no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

### 7.3.1.2. Aminoácidos Livres (AAL)

O conteúdo de aminoácidos livres teve um aumento de 35 % no tecido muscular após a exposição subletal e manteve-se inalterado na recuperação, os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 2 e na figura 6. Os aminoácidos plasmáticos aumentaram em 45 % após a exposição subletal e não foram alterados na recuperação, os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 3 e na figura 7. Os níveis de aminoácidos livres no tecido hepático aumentaram após o período de exposição, em aproximadamente 12 %, porém, não tiveram alteração após a recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 4 e na figura 8.

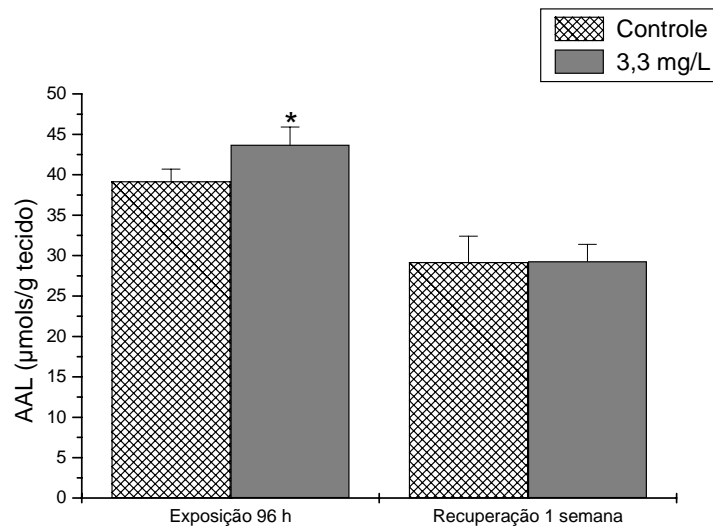


Figura 6 . Concentração de aminoácidos livres no músculo branco de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

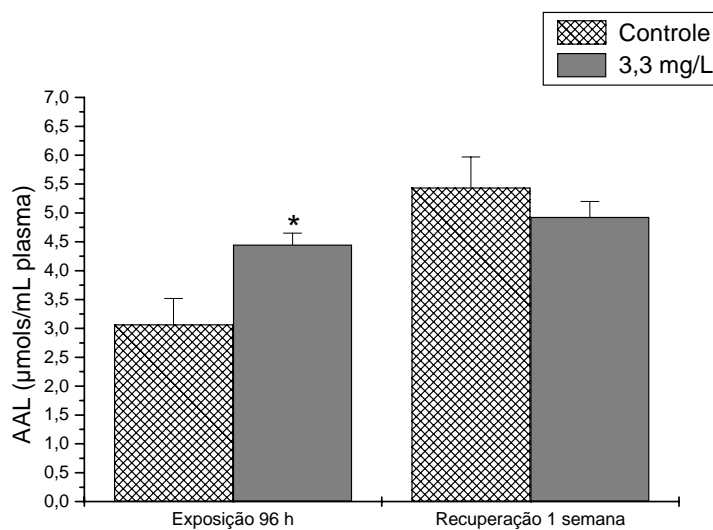


Figura 7 . Concentração de aminoácidos livres no plasma de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

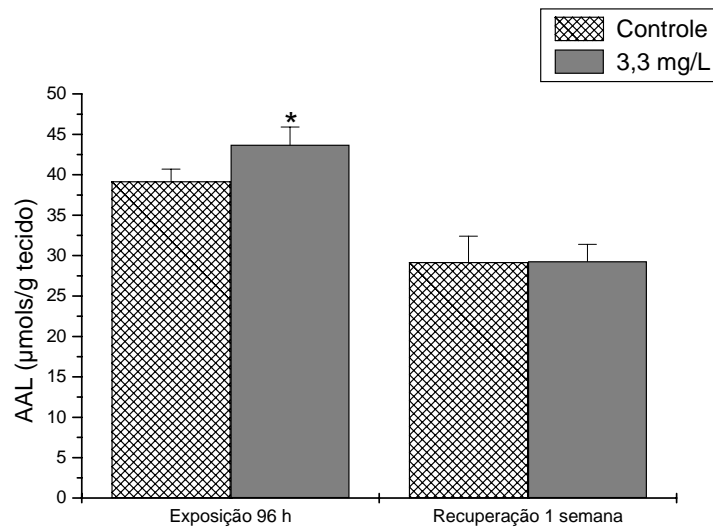


Figura 8 . Concentração de aminoácidos livres no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

### 7.3.1.3. Amônia

As concentrações de amônia no músculo branco, plasma e fígado dos animais expostos ao fenol por 96 h e dos animais submetidos a recuperação não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos controles. Os valores médios e o desvio padrão estão relacionados nas tabelas 2, 3 e 4.

### 7.3.1.4. Alanina Aminotransferase

A atividade da enzima alanina aminotransferase em músculo branco e fígado de pacu apresentou um aumento significativo em ambos os tecidos, após 96 h de exposição subletal, de, respectivamente, 33% e 23%. A atividade destas enzimas não foram mensuradas em tecidos de pacus submetidos à recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão relacionados na tabela 6 e na figura 9.

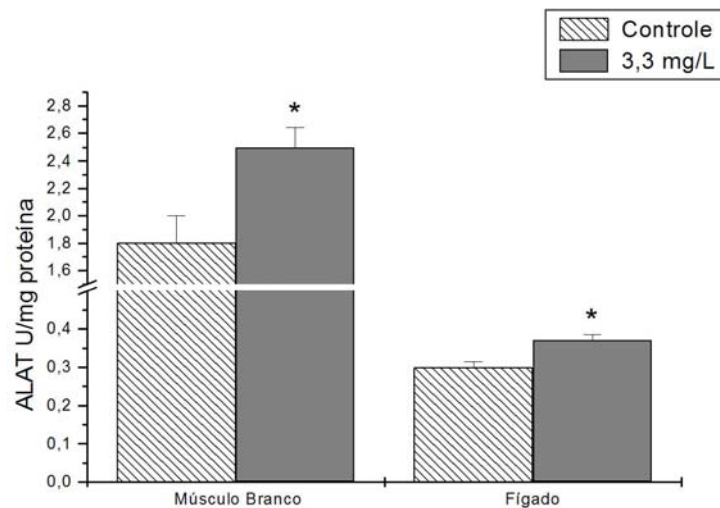


Figura 9 . Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALAT) no músculo branco e no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

#### 7.3.1.5. Aspartato Aminotransferase

A atividade da enzima aspartato aminotransferase em músculo branco e fígado de pacu apresentou um aumento significativo em ambos os tecidos, após 96 h de exposição subletal, de, respectivamente, 25% e 30%. A atividade destas enzimas não foram mensuradas em tecidos de pacus submetidos à recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão relacionados na tabela 6 e na figura 10.



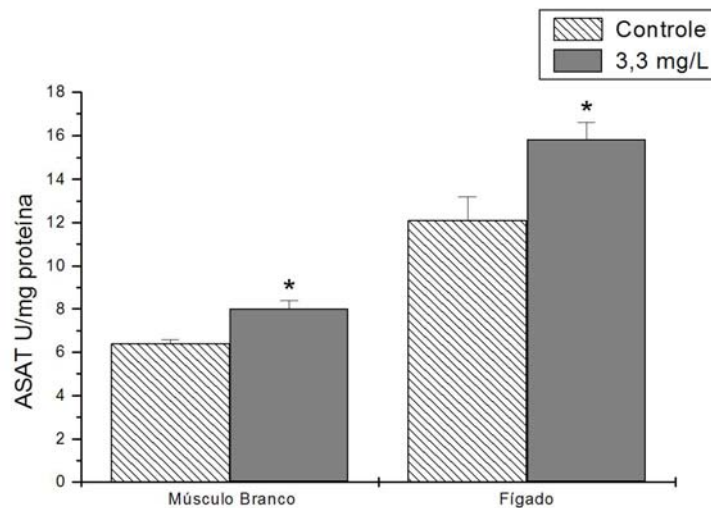


Figura 10 . Atividade da enzima aspartato aminotransferase (ASAT) no músculo branco e no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

### 7.3.2. Metabolismo Glicídico

#### 7.3.2.1. Glicose

Os níveis de glicose no músculo branco dos animais expostos e dos animais sob recuperação não apresentaram diferenças significativas em relação aos respectivos controles. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 2. A glicose plasmática apresentou um aumento significativo de 38% nos peixes expostos ao fenol por 96 h, porém não houve diferença significativa nos animais sob recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 3 e na figura 11. No tecido hepático, a concentração de glicose teve um aumento significativo nos animais expostos e nos animais submetidos a recuperação em relação aos grupos controles, de 50% e 14%, respectivamente. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 4 e na figura 12.

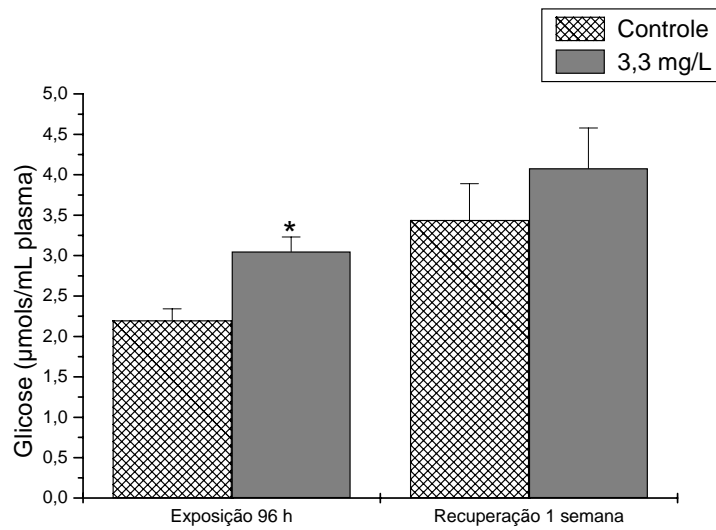


Figura 11 . Concentração de glicose no plasma de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

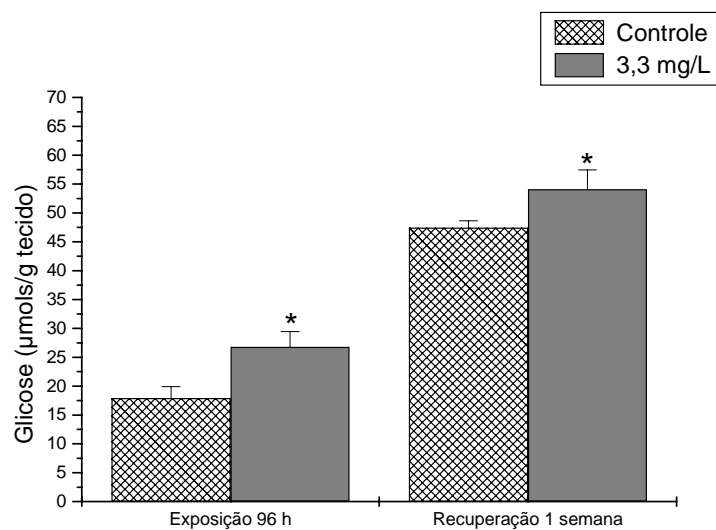


Figura 12 . Concentração de glicose no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

### 7.3.2.2. Glicogênio

No músculo branco, os níveis de glicogênio dos animais expostos por 96 h não tiveram alteração significativa, todavia, os animais sob recuperação apresentaram uma redução significativa de 16%. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 2 e na figura 13. A concentração de glicogênio hepático, nos peixes expostos não apresentou diferenças significativas, contudo, nos animais submetidos a recuperação, estes níveis tiveram um aumento significativo de 40%. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 4 e na figura 14.

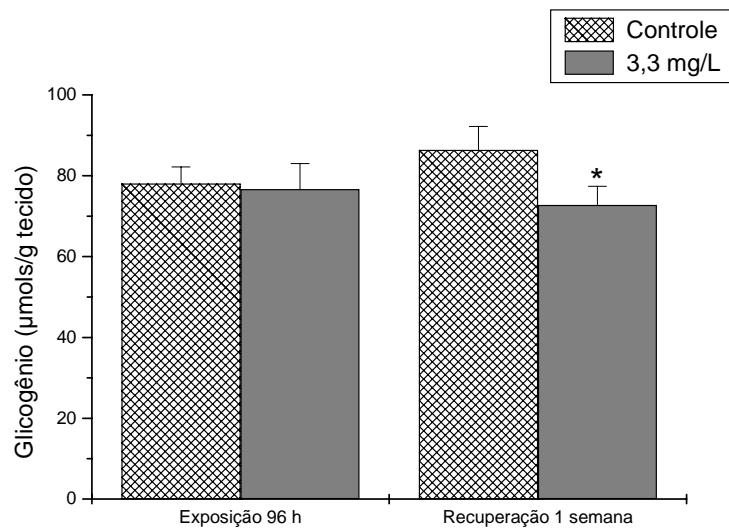


Figura 13 . Concentração de glicogênio no músculo branco de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

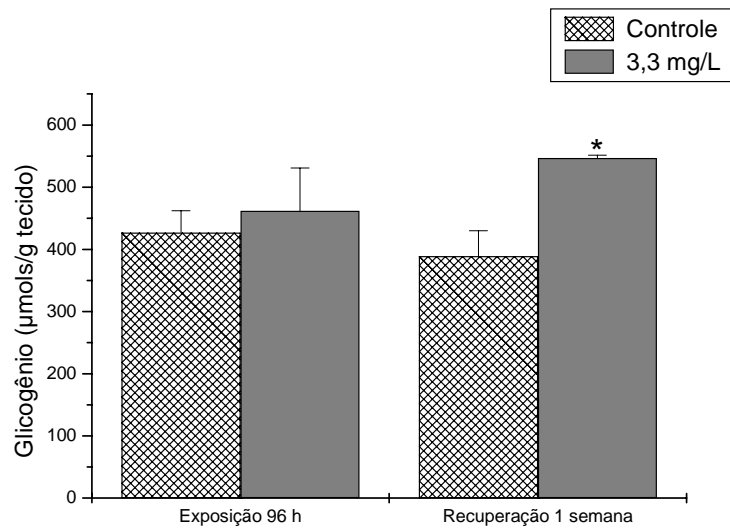


Figura 14 . Concentração de glicogênio no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

### 7.3.2.3. Lactato

O lactato muscular não apresentou diferenças significativas nos peixes expostos nem nos peixes sob recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 2. No plasma, os teores de lactato apresentaram aumento significativo nos animais de ambos os tratamentos, exposição e recuperação, de 64% e 62%, respectivamente. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 3 e na figura 15. A concentração de lactato hepático teve um aumento de 10% nos animais expostos e de 27% no animais sob recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 4 e na figura 16.

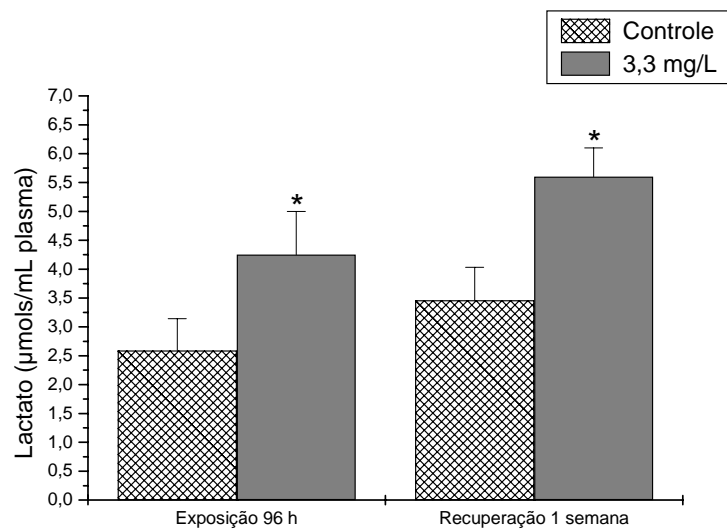


Figura 15 . Concentração de lactato no plasma de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

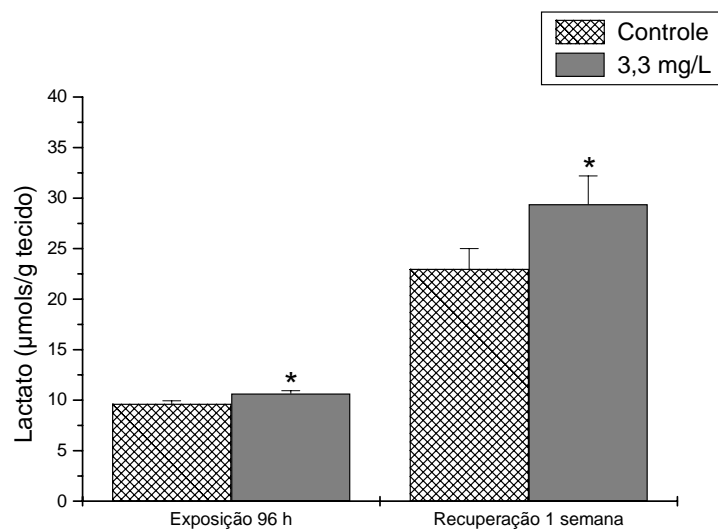


Figura 16 . Concentração de lactato no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

#### 7.3.2.4.Piruvato

Os níveis de piruvato muscular não foram significativamente diferente do seu controle nos peixes expostos, porém, nos animais submetidos a recuperação estes níveis tiveram uma redução de 27%. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 2 e na figura 17. A concentração de piruvato no plasma e no fígado não apresentou diferença significativa nos animais de nenhum dos tratamentos. Os valores médios e o desvio padrão estão relacionados nas tabelas 3 e 4 .

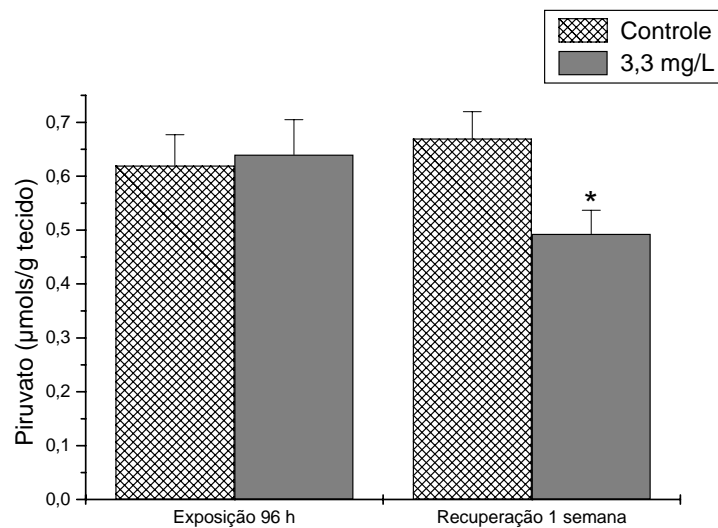


Figura 17 . Concentração de piruvato no músculo branco a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

#### 7.3.2.5.Lactato Desidrogenase

A atividade da enzima lactato desidrogenase em músculo branco e fígado de pacu apresentou um aumento significativo em ambos os tecidos, após 96 h de exposição subletal, de, respectivamente, 16% e 29%. A atividade destas enzimas não foram mensuradas em tecidos de pacus submetidos à recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão relacionados na tabela 6 e na figura 18.

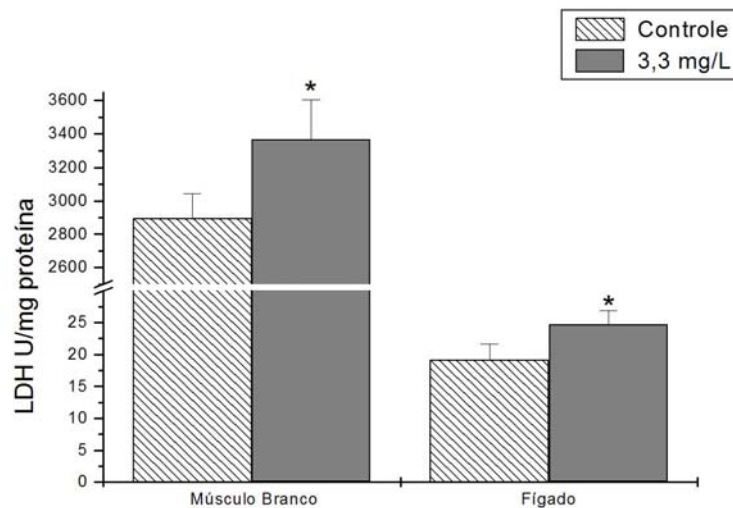


Figura 18 . Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALAT) no músculo branco e no fígado de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

#### 7.4. Íons Plasmáticos

As concentrações de sódio, potássio e cloreto no plasma não tiveram alterações significativas, em relação aos seus respectivos controles em nenhum dos tratamentos. Os dados estão relacionados na tabela 3.

#### 7.5. Hematologia

O conteúdo de hemoglobina total em pacus expostos teve um aumento de 24% em relação ao grupo controle e, nos peixes sob recuperação não houve diferença significativa. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 5 e na figura 19. O hematócrito apresentou um aumento de 24% nos animais expostos e não teve alteração significativa após a recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 5 e na figura 20. O número de células vermelhas apresentou um aumento significativo de 25% no peixes expostos, no entanto, não houve alteração significativa no peixes submetidos à recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 5 e na figura 21. Os índices hematimétricos (VCM, HCM E CHCM) não tiveram alterações significativas nem após a

exposição, nem após a recuperação. Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 5.

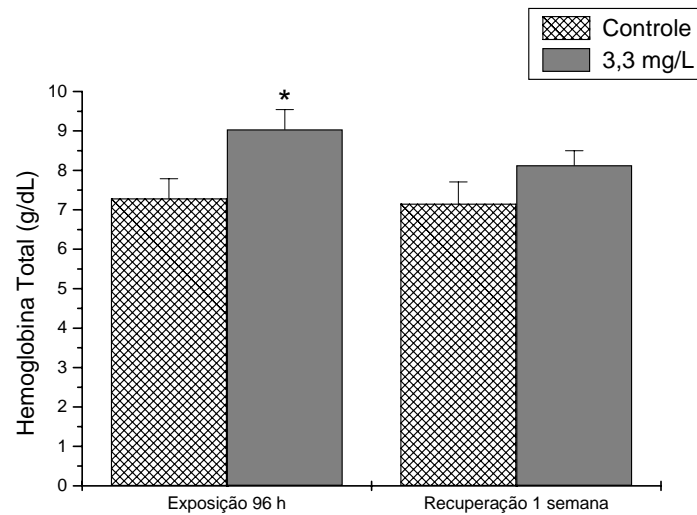


Figura 19 . Concentração de hemoglobina total de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h e após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

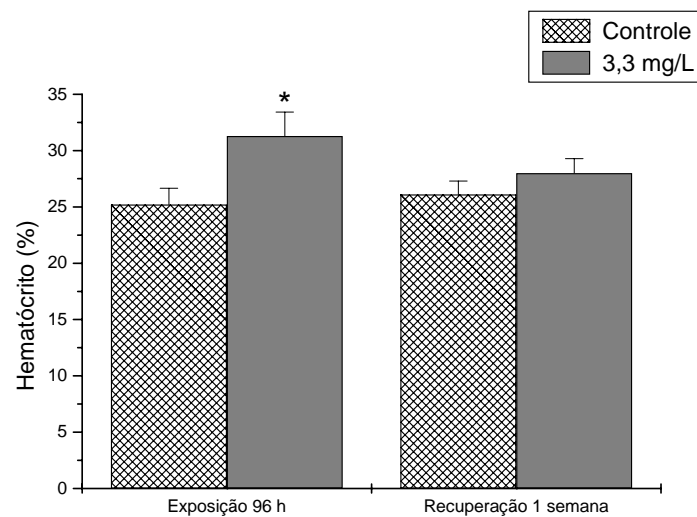


Figura 20 . Hematócrito de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).



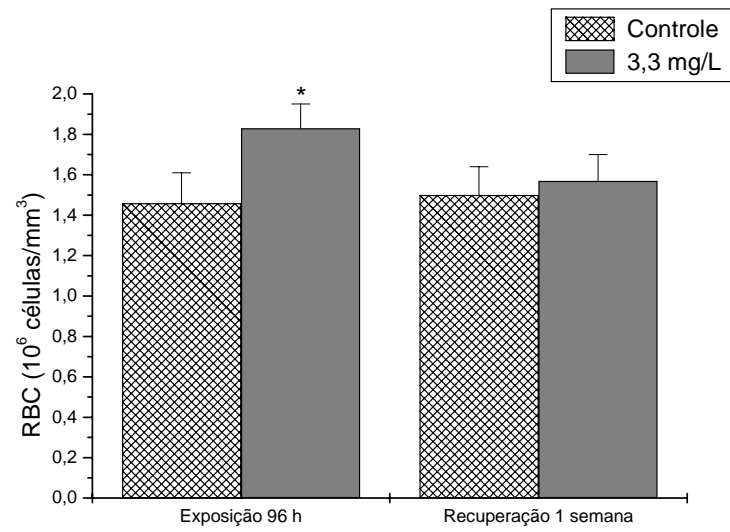


Figura 21 . RBC de pacu exposto a 3,3 mg/L de fenol durante 96 h após uma semana de recuperação. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representa diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2 – Intermediários metabólicos no músculo branco de *P. mesopotamicus* exposto ao fenol por 96 h e submetido a uma semana de recuperação.

Metabólitos	MÚSCULO BRANCO			
	Exposição		Recuperação	
	Controle	3,3 mg/L	Controle	3,3 mg/L
Proteínas	62,0 ± 10,0	34,2 ± 4,9*	37,7 ± 2,44	38,2 ± 4,6
AAL	10,6 ± 1,2	14,4 ± 2,2*	21,8 ± 1,6	22,6 ± 2,1
Amônia	34,0 ± 4,7	28,3 ± 3,8	34,2 ± 2,9	33,2 ± 4,1
Glicose	1,95 ± 0,17	1,98 ± 0,14	1,75 ± 0,18	1,57 ± 0,07
Glicogênio	78,0 ± 4,1	76,7 ± 6,3	86,4 ± 5,8	72,9 ± 4,6*
Lactato	44,6 ± 4,5	46,6 ± 8,3	33,5 ± 3,0	33,4 ± 4,6
Piruvato	0,62 ± 0,06	0,64 ± 0,06	0,67 ± 0,05	0,49 ± 0,04*

As concentrações de glicogênio estão expressas em  $\mu\text{mol}$  de glicosil-glicose/g de tecido; de proteína estão expressas em mg de proteína/g; os demais intermediários estão expressos em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=12$ ). (\*) indicam diferenças significativas em relação ao controle para  $P<0,05$ .

Tabela 3 – Intermediários metabólicos no plasma de *P. mesopotamicus* exposto ao fenol por 96 h e submetido a uma semana de recuperação.

Metabólitos	PLASMA			
	Exposição		Recuperação	
	Controle	3,3 mg/L	Controle	3,3 mg/L
Proteínas	13,6 ± 1,72	16,1 ± 1,6	22,8 ± 2,10	24,4 ± 3,48
AAL	3,07 ± 0,45	4,45 ± 0,2*	5,44 ± 0,53	4,93 ± 0,27
Amônia	3,27 ± 0,51	3,17 ± 0,34	3,80 ± 0,19	3,80 ± 0,47
Glicose	2,21 ± 0,14	3,05 ± 0,18*	3,44 ± 0,45	4,08 ± 0,52
Lactato	2,60 ± 0,55	4,25 ± 0,75*	3,45 ± 0,57	5,60 ± 0,45*
Piruvato	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,20 ± 0,01
Sódio	156 ± 7,32	154 ± 12,3	175 ± 12,6	196 ± 12,2
Potássio	5,10 ± 0,55	4,43 ± 0,58	6,21 ± 0,45	5,92 ± 0,60
Cloreto	143 ± 5,40	146 ± 4,3	140 ± 9,20	152 ± 7,48

Concentrações de proteína expressas em mg de proteína/mL de plasma; os demais intermediários estão expressos em  $\mu\text{mol/mL}$  de plasma. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=12$ ). (\*) indicam diferenças significativas em relação ao controle para  $P<0,05$ .

Tabela 4 – Intermediários metabólicos no fígado de *P. mesopotamicus* exposto ao fenol por 96 h e submetido a uma semana de recuperação.

<b>FÍGADO</b>				
<b>Metabólitos</b>	<b>Exposição</b>		<b>Recuperação</b>	
	Controle	3,3 mg/L	Controle	3,3 mg/L
Proteínas	103 ± 5,5	103 ± 7,3	105 ± 13,2	85,4 ± 4,6*
AAL	39,2 ± 1,5	43,7 ± 2,2*	29,2 ± 3,2	29,3 ± 2,5
Amônia	47,7 ± 6,5	46,8 ± 6,2	40,6 ± 3,3	39,5 ± 3,3
Glicose	17,9 ± 2,0	27,0 ± 2,7*	47,4 ± 1,2	54,1 ± 3,3*
Glicogênio	427 ± 35,3	462 ± 69,0	389 ± 41,0	547 ± 37,5*
Lactato	9,64 ± 0,3	10,7 ± 0,3*	23,1 ± 2,1	29,4 ± 2,5*
Piruvato	0,76 ± 0,06	0,76 ± 0,06	0,78 ± 0,05	0,76 ± 0,03

Concentrações de glicogênio expressas em  $\mu\text{mol}$  de glicosil-glicose/g de tecido; de proteína estão expressas em mg de proteína/g de tecido; os demais intermediários estão expressos em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=12$ ). (\*) indicam diferenças significativas em relação ao controle para  $P<0,05$ .

Tabela 5 – Valores dos parâmetros hematológicos de *Piaractus mesopotamicus* expostos ao fenol por 96h e após uma semana de recuperação.

Parâmetros	Exposição		Recuperação	
	Controle	3,3 mg/L	Controle	3,3 mg/L
Hemoglobina total (g/dL)	7,3 ± 0,5	9,0 ± 0,5*	7,15 ± 0,55	8,13 ± 0,37
Hematócrito (%)	25,2 ± 1,4	31,3 ± 2,1*	26,1 ± 1,2	28,0 ± 1,28
RBCC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,46 ± 0,1	1,8 ± 0,1*	1,5 ± 0,14	1,57 ± 0,13
VCM (µmm <sup>3</sup> )	173 ± 17,0	171 ± 11,3	162 ± 14,6	168 ± 11,3
HCM (pg/célula)	50,0 ± 2,9	49,4 ± 5,1	46,8 ± 4,6	49,2 ± 4,6
CHCM (%)	2,9 ± 0,2	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,18	2,97 ± 0,19

RBCC – contagem de células vermelhas sanguíneas; VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (n=12). (\*) indicam diferenças significativas em relação ao controle para P<0,05.

Tabela 6 – Atividades enzimáticas em músculo branco e fígado de de *P. mesopotamicus* exposto ao fenol por 96 h.

Parâmetros	Exposição			
	Músculo Branco		Fígado	
	Controle	3,3 mg/L	Controle	3,3 mg/L
ALAT	1,8 ± 0,2	2,5 ± 0,14*	0,3 ± 0,015	0,37 ± 0,015*
ASAT	6,4 ± 0,2	8,0 ± 0,4*	12,1 ± 1,1	15,8 ± 0,8*
LDH	2895 ± 148	3364 ± 242*	19,2 ± 2,4	24,7 ± 2,2*

As atividades das enzimas ALAT, ASAT e LDH no músculo branco e fígado estão expressas em nmol/min/mg de proteína; Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão ( $n=12$ ). (\*) indicam diferenças significativas em relação ao controle para  $P<0,05$ .

## 8. DISCUSSÃO

A CL50-96h do fenol para juvenis de pacu (33,0 mg/L) mostrou-se relativamente alta considerando-se que em peixes esse nível varia de 5 a 48 mg/L (Gupta et al., 1982). A CL50-96h observada em *Brycon amazonicus* exposto ao fenol é de 17,4 mg/L (Hori et al., 2006). Em *Notopterus notopterus* é de 12,53 mg/L (Verma et al., 1980) e em *Oreochromis mossambicus* é 35,0 mg/L (Sannandurgappa et al., 2007). Os resultados obtidos com pacu exposto ao fenol mostraram que esta espécie tem uma resistência relativamente alta a este xenobiótico. A diferença entre os valores de CL50 de fenol para diferentes espécies de peixes é, possivelmente, devida a diferentes sensibilidades e taxas de absorção (Saha et al., 1999). Outra possível razão para a tolerância ao fenol pode ser a presença de mecanismos eficientes de desintoxicação (Bucher e Hofer, 1993).

A profusa liberação de muco é uma reação comum de peixes em ambientes tóxicos, que ocorre pela superfície corporal e brânquias (Bols et al., 2001; Oruç e Uner, 1998). Produção excessiva de muco é observada em várias espécies de peixe, quando expostas a concentrações sub-letais de fenol (Mitrovic et al., 1968; Verma et al., 1980; Gupta et al., 1982; Bucher and Hofer, 1993; Saha et al., 1999). Substâncias tóxicas podem causar efeitos não só na quantidade de muco produzido por peixes, como também nas propriedades físicas, na liberação e, provavelmente, na composição (Bols et al., 2001). O muco é produzido, possivelmente, para minimizar o efeito irritante do tóxico (Verma et al., 1980).

A exposição de pacu e outras espécies à concentração subletal de fenol por 96 horas resultou em alterações significativas em seu perfil metabólico. A mesma redução de proteínas encontrada no tecido muscular de pacu também foi reportada em *Rhamdia quelen* exposto a concentrações subletais do herbicida glifosato por 96 h (Gluszczak et al., 2007) e em *Clarias batrachus* exposto ao carbofuram (1/3 CL<sub>50</sub>-96 h) por um período de seis dias (Begum, 2004). Já em *Oreochromis mossambicus* exposto a duas concentrações subletais de fenol (2,3 e 3,5 mg/L), essa redução só ocorre após 20 dias de exposição (Sannadurgappa et al., 2007). Em teleósteos, o músculo esquelético age como uma grande reserva de aminoácidos, uma vez que as proteínas representam o substrato primário para produção de energia nestes organismos (Tripathi e Verma, 2003). E ainda, sob condições de estresse, muitos organismos mobilizam proteínas para utilizá-las em várias reações catabólicas (Ramesh e Saravanan, 2008).

Nos pacus, a diminuição de proteína muscular foi acompanhada do aumento na concentração de aminoácidos neste tecido, no plasma e no fígado, o que poderia indicar proteólise muscular, sugerindo aumento da demanda energética deste tecido em consequência

do estresse da exposição ao fenol e exibindo uma preferência metabólica pelo consumo de proteínas. O aumento da demanda metabólica, sob estresse tóxico, ocorre, provavelmente, para favorecer a síntese hepática de enzimas de destoxificação (Scott e Sloman, 2004; Begum e Vijayaraghavan, 1995; Hori et al., 2006), processo que requer altos níveis de energia (Begum e Vijayaraghavan, 1995).

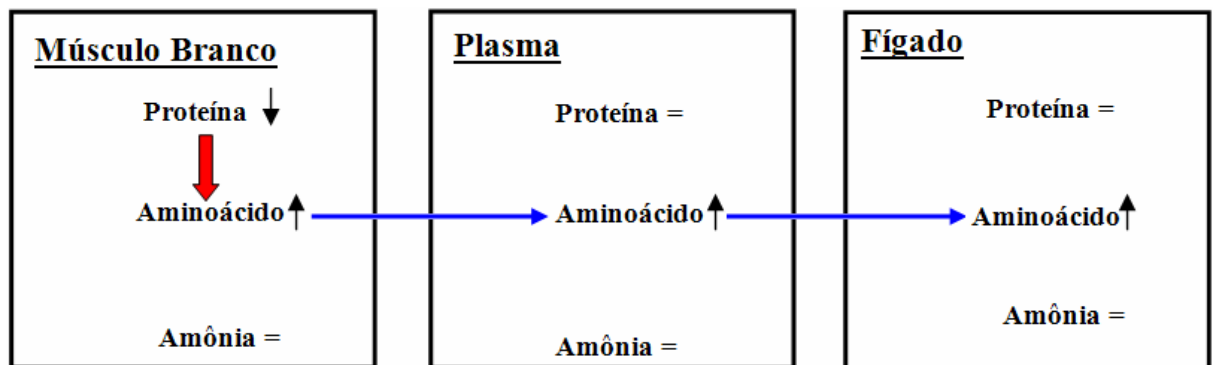


Figura 22 Mapa metabólico demonstrando proteólise do tecido muscular e transporte de aminoácidos para o tecido hepático de pacu após exposição subletal ao fenol.

Essa hipótese é corroborada pelo aumento nas atividades das aminotransferases ALAT e ASAT, não só do tecido muscular, mas também do tecido hepático. Resultados semelhantes foram reportados em músculo e fígado de *Clarias batrachus* após exposição a carbofuran (1/3 CL50-96 h) por seis dias (Begum, 2004). O aumento da atividade de ASAT nestes dois tecidos e de ALAT no tecido muscular foi reportada em *Brycon amazonicus* expostos a 10% CL50-96 h de fenol por 96 h (Hori et al., 2006). Barse e colaboradores (2006) reportaram aumento da atividade de ALAT em *Cyprinus carpio* devido à intoxicação por 4-terc-butilfenol e, sugerem que o catabolismo de aminoácidos e o aumento da gliconeogênese são atribuídos ao aumento da atividade desta enzima.

Scott e Sloman (2004) sugerem que o aumento de aminoácidos, acompanhado pelo aumento na atividade de ALAT e ASAT em peixes intoxicados, indica uma mudança em direção às vias catabólicas do metabolismo de proteína, possivelmente favorecendo mobilização de reservas de energia para destoxificação. Essas aminotransferases participam



diretamente da transferência de grupos amino e da disponibilização de cetoácidos para o processo catabólico, que encontra-se aumentado em situações de estresse.

É interessante notar que apesar do aumento da atividade catabólica de proteínas, observada em pacus expostos ao fenol, não se observaram alterações nos níveis de amônia em nenhum dos tecidos estudados. Isto é sugestivo de que os processos de excreção de amônia não são inicialmente alterados pelas concentrações ambientais de fenol utilizadas.

Os níveis de glicose plasmática aparecem aumentados em pacu em consequência da exposição ao fenol. Hiperglicemia é constantemente observada em peixes sob estresse químico causado por concentrações subletais de fenol (Swift, 1981; Krajnović-Ozretić e Ozretić, 1988) e vários outros xenobióticos (Sancho et al., 1997; Jyothi e Narayan, 1999; Oruç e Uner, 1999; Das e Mukherjee, 2003; Aguiar et al., 2005; Tintos et al., 2008). Esse quadro metabólico, associado à observação de uma elevação da glicose hepática e de uma inalterabilidade dos níveis hepáticos e musculares de glicogênio sugere, contudo, que os esqueletos carbonados de aminoácidos, oriundos da proteólise muscular, são potenciais substratos para uma provável gliconeogênese hepática.

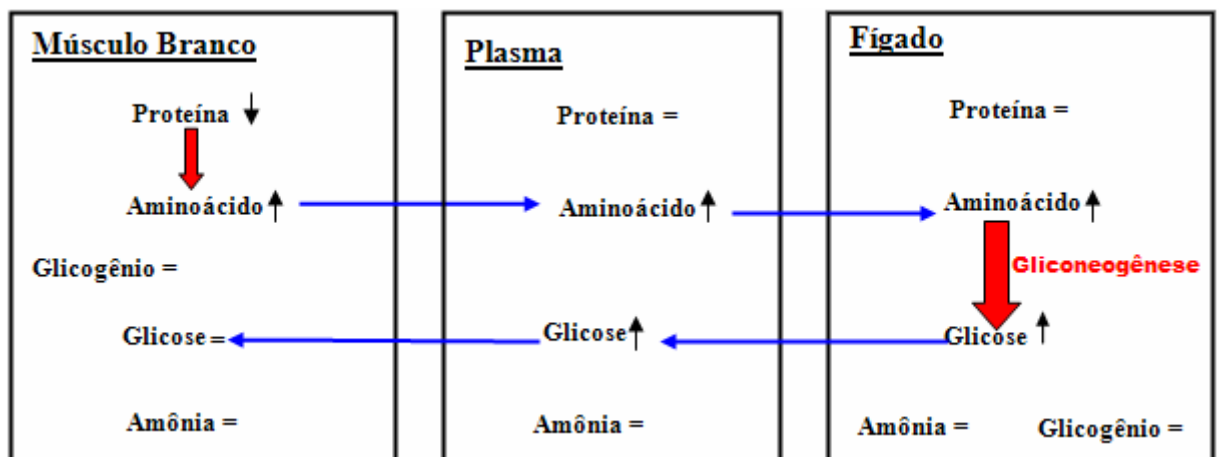


Figura 23 . Mapa metabólico demonstrando gliconeogênese no tecido hepático a partir dos esqueletos carbonados dos aminoácidos da proteólise do tecido muscular de pacu após exposição subletal ao fenol.

Baixas concentrações de fenol (20% da CL50-96h) também não induzem glicogenólise hepática e muscular em *Oreochromis aureus* após 7 dias de exposição (Abdel-

Hameid, 2007). Resultados similares aos observados no presente trabalho, concernentes ao aumento da glicemia, associado com a manutenção dos estoques de glicogênio no músculo branco e o aumento da proteólise observada neste tecido, foram obtidos por Almeida e colaboradores (2001), em *Oreochromis niloticus* exposto ao cádmio (1/60 CL50-96h) por 7 dias. Estes autores sugerem que os aminoácidos oriundos da proteólise são potenciais substratos para a gliconeogênese que, possivelmente, mantém a hiperglicemia em *Oreochromis niloticus*. Todavia, essa gliconeogênese nem sempre é observada. Aumento de glicose no plasma seguido da redução das reservas de glicogênio é reportado em peixes expostos à xenobióticos (Oruç e Uner, 1998; Oruç e Uner, 1999; Aguiar et al., 2004; Tintos 2008), o que sugere glicemiação através de fosforólise do glicogênio.

Embora os efeitos do cortisol no metabolismo glicídico e protéico variem acentuadamente em diferentes espécies de peixe (Tripathi e Verma, 2003), alguns dos efeitos clássicos deste hormônio, como, a proteólise muscular, o aumento de aminoácidos no plasma e no fígado, o provável aumento da gliconeogênese hepática e a hiperglicemia, foram observados no metabolismo de pacu após 96 horas de exposição ao fenol e, podem ter sido mediados pela ação deste hormônio. Na ausência de corticosteróides adrenais, as reservas de proteína não são convertidas a carboidratos suficientemente rápido para manter níveis normais de açúcar no sangue (Lardy et al., 1965). Níveis aumentados de cortisol são reportados em *Dicentrarchus labrax* após três dias de exposição a concentrações sub-letais de fenol administradas intraperitonealmente (Roche e Bogé, 2000; Roche e Bogé, 1996).

A lactemia aumentada em pacu ao final das 96 horas de exposição ao fenol persistiu até o final do período de recuperação. Os mesmos resultados foram encontrados em *Rhamdia quelen* após exposição subletal de 96 horas ao herbicida clomazona e recuperação de 96 horas (Crestani et al., 2006). Outros trabalhos tem também observado hiperlactemia em peixe após estresse químico por xenobióticos (Sancho et al., 1997; Crestani et al., 2006; Tintos et al., 2008). O produto final da via glicolítica, o piruvato, sob condições de anaerobiose ou de suprimento de oxigênio diminuído, é reduzido a lactato. O aumento de lactato plasmático a partir de tecidos fermentativos, como o músculo branco, é esperado como consequência metabólica de hipóxia celular (Aguiar et al., 2004).

Em *Oreochromis mossambicus* exposto ao fenol, observa-se um aumento do movimento opercular médio em função da concentração de fenol (Saha et al., 1999). Aumento da atividade opercular confirma que o fenol, até mesmo em baixas concentrações, interfere na respiração, resultando em um tipo de estresse por hipoxemia (Saha et al., 1999). O efeito de poluentes, dissolvidos nas brânquias, pode não somente restringir a troca de gases, mas seu

efeito irritante pode também interferir com a ventilação (Hughes, 1981). Efeitos do fenol na cadeia respiratória tem sido reportado. A atividade da enzima 5-nucleotidase de tecidos de *Notopterus notopterus* é inibida após exposição subletal ao fenol, o que representa, possivelmente, um efeito desacoplador da fosforilação oxidativa (Gupta et al., 1983a).

Apesar de neste trabalho não ter sido realizada uma avaliação histológica dos pacus, alguns estudos têm sugerido que hiperlactemia em peixes submetidos a xenobióticos pode estar relacionada a danos histopatológicos de brânquias (Sancho et al., 1997), órgão de contato imediato com os xenobióticos e por onde estes são absorvidos por difusão (Verma et al., 1980; Kishino e Kobayashi, 1995; McKim et al., 1999). As lesões causadas nesta estrutura respiratória podem trazer conseqüências imediatas ao metabolismo intermediário. Uma das que se podem imediatamente apresentar é o prejuízo da respiração celular. Alterações histopatológicas em brânquias são reportadas em *Cottus gobio* e *Oncorhynchus mykiss* após exposição a concentrações subletais e letais de fenol (Mitrovic et al., 1968; Bucher e Hofer, 1993). E ainda, Oruç e Uner, (1998) sugerem que a formação de uma película de muco, na superfície corporal e nas brânquias, associada a alterações nos tecidos respiratórios, podem levar a um estresse por hipoxemia em peixe sob exposição tóxica.

É interessante destacar o fato de os níveis aumentados de lactato plasmático ocorrerem em paralelo aos níveis hepáticos de lactato, situação metabólica que também persistiu até o final do período de recuperação. Este fato sugere que o lactato muscular foi, tanto quanto o esqueleto de aminoácidos, provenientes da proteólise muscular após o período de exposição e da proteólise hepática após o período de recuperação, fonte carbonada nos processos de gliconeogênese de pacu exposto ao fenol. Esta estratégia metabólica é conhecida como ciclo de Cori, que pode ser intensificada após processos de hiperlactemia.

Esta situação metabólica pode ser corroborada pelo aumento de LDH, tanto muscular quanto hepática, enzima diretamente envolvida na conversão lactato-piruvato. A elevação da atividade desta desidrogenase, no fígado e músculo de pacu exposto ao fenol por 96 horas, substancia a proposta de fermentação devida a um possível processo hipoxêmico. Aumento da atividade de LDH nestes tecidos também foi reportado em *Oreochromis aureus* expostos a 11,6 e 23,2 mg/L de fenol por sete dias (Abdel-Hameid, 2007).

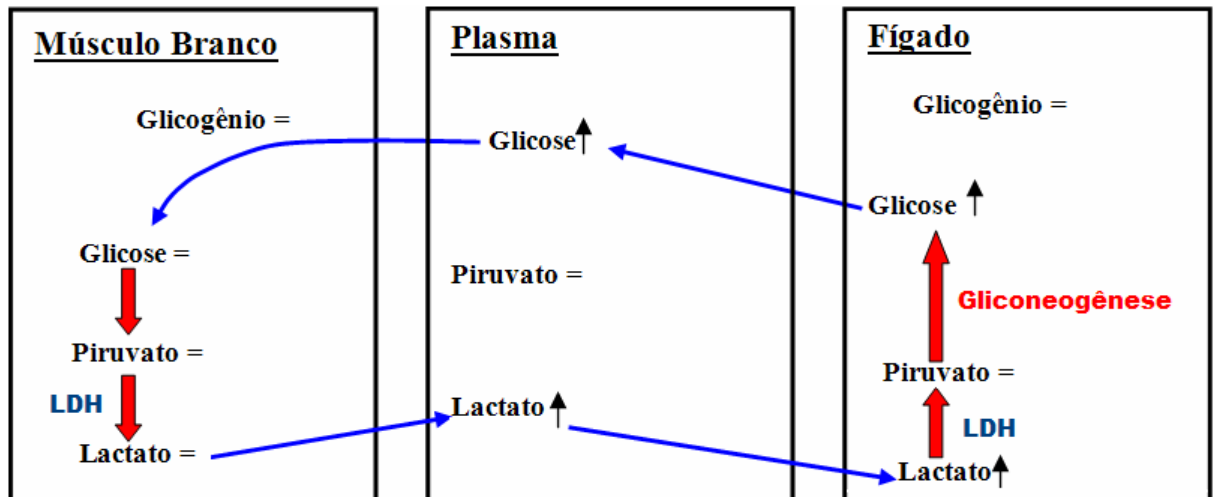


Figura 24 . Mapa metabólico demonstrando o Ciclo de Cori em pacu após exposição subletal ao fenol.

Não foram observadas alterações nas concentrações de sódio, potássio e cloreto plasmáticos. Esses dados são sugestivos de que não houve alterações osmóticas no sangue. A hipocloremia, como resposta generalizada a estressores, pode não ter sido detectada em pacu ao final das 96 h de exposição porque é uma reação associada ao choque inicial ao estressor, porém, pode ter ocorrido durante as primeiras horas de exposição (Swift, 1981).

A diminuição de processos aeróbicos por prejuízos respiratórios pode levar ao aparecimento de outras estratégias para garantir a sobrevivência. Entre elas, existem aquelas ligadas aos eritrócitos, células envolvidas no transporte de oxigênio. Foi observado um aumento do número de eritrócitos (RBC) em pacus expostos ao fenol, que foi, possivelmente, decorrente de uma contração esplênica. Em muitas espécies de peixes, o baço age como um reservatório de eritrócitos (Perry e McDonald, 1993). A eritrocitemia observada em pacu explica o aumento nos valores observados de Hct (hematócrito), assim como nos teores de Hb total (hemoglobina total).

Aumento de RBC, Hb total e Hct também é observado em *Monopterus albus* até 24 h de exposição a concentrações sub-letais de ensosulfan, porém, esses parâmetros diminuem gradualmente até o final das 96 h (Siang et al., 2007). A elevação do Hct ocorre em *Brycon amazonicus* exposto a 2 mg/L de fenol por 96h (Avilez et al., 2008). Estes autores sugerem que esta elevação é, provavelmente, devida ao aumento da necessidade de oxigênio, decorrente da demanda metabólica aumentada. Outros estudos também sugerem que o aumento nos valores dos parâmetros hematológicos, representam, possivelmente, um aumento

da necessidade de transporte de oxigênio como resposta adaptativa à intoxicação de peixes (*Salmo salar* e *Monopterus albus*) por endosulfan (Petri et al., 2006; Siang et al., 2007). Contraditoriamente, em *Dicentrarchus labrax*, submetido a injeções intrabdominais periódicas de fenol e compostos fenólicos (no máximo 10 % da dose letal), o Hct é reduzido e os teores de Hb não são alterados, o que é atribuível a um quadro de anemia (Roche e Bogé, 1996).

Valores constantes na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) descartam a possibilidade de um aumento do hematócrito por aumento do volume celular. Variações intra-eritrocitárias são usualmente acompanhadas da movimentação de sódio, potássio e cloreto (Borgese et al., 1987), o que não foi observado no presente trabalho. Nossos resultados são similares aos encontrados em *Salmo salar* exposto ao endosulfan, que apresentaram aumento no Hct e Hb total sem alterações na concentração de sódio, potássio e cloreto (Petri et al., 2006). Após o período de recuperação, nenhuma alteração significativa foi encontrada para os parâmetros hematológicos, apesar da persistente lactemia, o que é sugestivo de adaptação ao processo de intoxicação.

Já os peixes submetidos à recuperação, apresentaram uma redução dos níveis de proteínas no fígado. Os mesmos resultados foram encontrados em *Clarias batrachus* após exposição subletal ao carbofuran (Begum, 2004), sugerindo proteólise hepática aumentada. Os aminoácidos provenientes da proteólise do tecido hepático, possivelmente, foram substratos para uma provável gliconeogênese deste tecido.

Uma redução das reservas de glicogênio no tecido muscular, associada a um aumento destas reservas no fígado é sugestivo de glicogenólise muscular e glicogênese hepática. A mobilização de reservas de glicogênio do músculo e de proteínas no fígado podem ser atribuídas ao aumento da demanda energética decorrente dos mecanismos de destoxificação, que, possivelmente, ainda estão ocorrendo no período de recuperação.

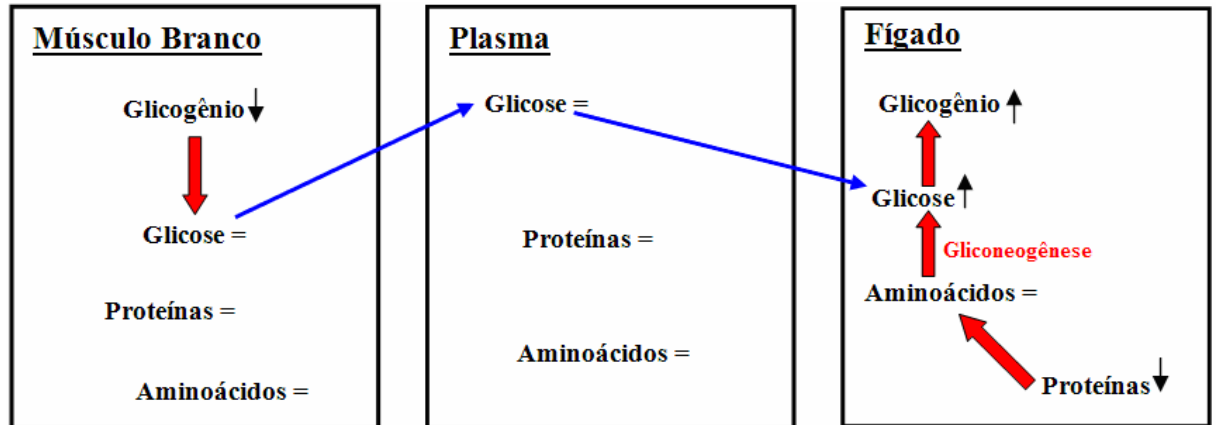


Figura 25 Mapa metabólico demonstrando glicogenólise no tecido muscular e proteólise, gliconeogênese e glicogênese no tecido hepático de pacu após a recuperação.

A hiperlactemia apresentada por pacu, observada após a exposição subletal, persistiu até o final do período de recuperação. E ainda, após a recuperação, uma redução no nível de piruvato muscular ocorreu, sugerindo aumento da conversão deste substrato a lactato, reforçando a hipótese de redução do metabolismo oxidativo no tecido muscular. A atividade da LDH não foi mensurada após a recuperação, portanto, possivelmente, o Ciclo de Cori também está ocorrendo neste período.

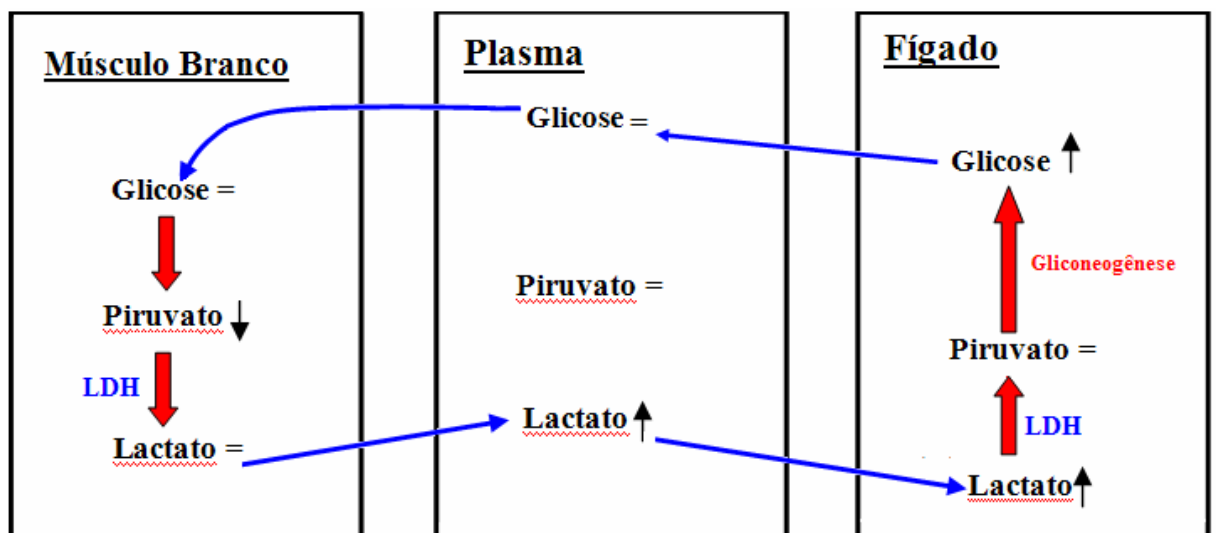


Figura 26 Mapa metabólico demonstrando o Ciclo de Cori em pacu após a recuperação.

## 9. CONCLUSÕES

- O *Piaractus mesopotamicus* mostrou-se relativamente resistente à ação tóxica do fenol, uma vez que apresentou um valor de CL50-96h alto quando comparado a outras espécies.

- O perfil metabólico e hematológico de *Piaractus mesopotamicus* é alterado após exposição subletal ao fenol:

- ✓ Reduzidos níveis de proteína no tecido muscular, associados à manutenção das reservas de glicogênio e à hiperglicemia, sugerem a utilização de proteínas como substrato energético em resposta ao estresse causado pela exposição de pacu ao fenol.
- ✓ O aumento da lactemia, associado ao aumento da atividade da enzima LDH no tecido muscular e hepático é sugestivo de redução do metabolismo aeróbico, com prevalência de fermentação láctica. Esse quadro é corroborado pelo perfil hematológico em que se observa um aumento do número de eritrócitos que ocorre, provavelmente, para compensar possíveis deficiências do quadro respiratório.
- ✓ Um possível aumento da demanda metabólica em função do estresse causado pela exposição ao fenol resultou em um quadro hepático metabólico gliconeogênico responsável pela manutenção da hiperglicemia observada, que foi mantido tanto por um processo proteolítico muscular quanto pelo Ciclo de Cori, típico de situações de hipóxia.

- O perfil metabólico de *Piaractus mesopotamicus* é alterado após a recuperação:

- ✓ Uma significativa redução das reservas de glicogênio no tecido muscular e de proteínas no tecido hepático, deve ter ocorrido em função da demanda metabólica, que provavelmente continua aumentada durante o período de recuperação, devido aos processos de destoxificação que, possivelmente ainda estão ocorrendo neste período.
- ✓ A hiperlactemia apresentada em pacus após 96 horas de exposição subletal persistiu até o final do período de recuperação, no entanto, os parâmetros hematológicos não tiveram alteração significativa, o que indica adaptação às condições de intoxicação.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEID, N.A.H. Physiological and histopathological alterations induced by phenol exposure in *Oreochromis aureus* juveniles. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.7, p. 131-138, 2007.
- AGUIAR, L.H., MORAES, G., AVILEZ, I.M., ALTRAN, A.E., CORRÊA, C.F. Metabolical effects of Folidol 600 on neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Environ. Res.**, v. 95, p. 224-230, 2004.
- ALMEIDA, J.A., NOVELLI, E.L.B., DAL PAI SILVA, M., ALVES JÚNIOR, R. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environ. Pollut.**, v. 114, p. 169-175, 2001.
- APHA (American Public Health Association). **Standard methods for examination of water and wastes**. 12 ed., Washington, DC: Joint editorial board, 1980.
- AVILEZ, I.M., HORI, T.S.F., ALMEIDA, L.C. HACKBARTH, A., JAYME DA CUNHA BASTOS NETO, VERA BASTOS, L.F.C., MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 148, p. 136-142, 2008.
- AZEVEDO, F.A., LIMA, I.V. Toxicocinética. In: AZEVEDO, F.A., CHASIN, A.A.M. (Org.) **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003. p. 27-89.
- BARSE, A.V., CHAKRABARTI, T., GHOSH, T.K., PAL, A.K., JADHAO, S.B. One-tenth dose of CL<sub>50</sub> of 4-tert-butylphenol causes endocrine disruption and metabolic changes in *Cyprinus carpio*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 86, p. 172-179, 2006.
- BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alteration in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. **Aquat. Toxicol.**, v. 66, p. 83-92, 2004.
- BEGUM, G., VIJAYARAGHAVAN, S. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish *Clarias batrachus* L. during dimethoate exposure. **Fd. Chem. Toxic.**, v. 33, p. 423-426, 1995.
- BIDINOTTO, P.M., MORAES, G., SOUZA, R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Bol. Tec. CEPTA**, v. 10, p. 53-60, 1997.
- BOGÉ, G., ROCHE, H. Cytotoxicity of phenolic compounds on *Dicentrarchus labrax* erythrocytes. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 57, p. 171-178, 1996.
- BOLIS, C.L., PICCOLELLA, M., DALLA VALLE, A.Z., RANKIN, J.C. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacol. Res.**, v. 44, p. 265-280, 2001.
- BOLS, N.C., BRUBACHER, J.L., GANASSIN, R.C., LEE, L.E.J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 25, p. 853-873, 2001.



BORGESSE, F., GARCIA-ROMEU, F., MOTAIS, R. Control of cell volume and ion transport by  $\beta$ -adrenergic catecholamines in erythrocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Physiol.**, v. 382, p. 123-124, 1987.

BRASIL, 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Portaria n. 357, de 17 de março 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

BUCHER, F., HOFER, R. Histopathological effects of sublethal exposure to phenol on two variously pre-stressed populations of bullhead (*Cottus gobio* L.). **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 51, p. 309-316, 1993.

CETESB **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo**. 2004. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua\\_geral.html](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua_geral.html). Acesso em: 15 mar. 2005.

CHAGNON, N., HLOHOWSKYJ, I. Effects of phenol exposure on the thermal tolerance ability of the central stoneroller minnow. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 42, p. 614-619, 1989.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, Vancouver, v. 20, p. 550-552.

COPLEY, N.G. Alloxan and ninhydrin test. **Analyst**. v. 66, p. 492-493, 1941.

CRAVEDI, J.P., LAFUENTE, A., BARADAT, M., HILLENWEK, A., PERDU-DURAND, E. Biotransformation of pentachlorophenol, aniline and biphenyl in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes: comparison with *in vivo* metabolism. **Xenobiotica**, v. 29, p. 499-509, 1999.

CRESTANI, M., MENEZES, C., GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., LAZZARI, R., DUARTE, M.F., MORSCH, V.M., PIPPI, A.L., VIEIRA, V.P. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 65, p. 48-55, 2006.

DAS, B.K., MUKHERJEE, S.C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical enzymatic and hematological consequences. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 134, p. 109-121, 2003.

DAVI, M. L.; GNUDI, F. Phenolic compounds in surface water. **Wat. Res.**, v. 33, p. 3213-3219, 1999.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., ROBERTS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-358, 1956.

FENT, K., HUNN, J. Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). **Mar. Environ. Res.**, v. 42, p. 377-382, 1996.

GAWORECKI, K.M., RICE, C.D., VAN DEN HURK, P. Induction of phenol-type sulfotransferase and glucuronosyltransferase in channel catfish and mummichog. **Mar. Environ. Res.**, v. 58, p. 525-528, 2004.

GENTZKOW, C.J., MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol. Chem.**, v. 143, p. 531-544, 1942.

GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., MORAES, B.S., SIMÕES, R.R., SCHETINGER, M.R.C., MORSCH, V.M., LORO, V.L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 146, p. 519-524, 2007.

GUPTA, P.K., MUJUMDAR, V.S., RAO, P.S., DURVE, V.S. Toxicity of phenol, pentachlorophenol and sodium pentachlorophenolate to a fresh water teleost *Lebistes reticulatus* (Peters). **Acta Hydrochim. Hydrobiol.**, v. 10, p. 177-181, 1982.

GUPTA, S., DALELA, R.C., SAXENA, P.K. Effects of phenolic compounds on 5-nucleotidase in some tissues of *Notopterus notopterus* (Pallas): a biochemical study. **Toxicol. Lett.**, v. 17, p. 167-173, 1983a.

GUPTA, S., DALELA, R.C., SAXENA, P.K. Effect of phenolic compounds on in vivo activity of transaminases in certain tissues of the fish *Notopterus notopterus*. **Environ. Res.**, v. 32, p. 8-13, 1983b.

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.U. Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Env. Sci. Technol.**, v. 12, p. 417, 1978.

HARROWER, J.R., BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **J. Appl. Physiol.**, v 32, p. 224-228, 1972.

HASSENKLÖVER, T., PREDEHL, S., PILLI, J., LEDWOLORZ, J., ASSMANN, M., BICKMEYER, U. Bromophenols, both present in marine organisms and in industrial flame retardants, disturb cellular  $Ca^{2+}$  signaling in neuroendocrine cells (PC12). **Aquat. Toxicol.**, v. 76, p. 37-45, 2006.

HOCHACHKA, P.W., GUPPY, M., GUDERLY, H.E., STOREY, K.B. HULBERT, W.C. Metabolic biochemistry of water-vc air breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. **Can J. Zool.**, v. 56, p. 736-750, 1978.

HORI, T.S.F., AVILEZ, I.M., INOUE, L.K., MORAES, G. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon amazonicus* (teleostei: characidae) juveniles. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 143, p. 67-72, 2006.

HUGES, G.M., 1981. Effects of low oxygen and pollution on the respiratory systems of fish. In: PICKERING, A.D. (Org). **Stress and fish**. New York: Academic Press Inc., 1981. p. 121-146.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Avaliação da toxicidade aguda para peixes \_\_\_\_\_. In: **Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, DF, 1987. Parte D. 3.

INOUE, L.A.K.A., SANTOS-NETO, C., MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon amazonicus* (Gunther, 1869). **Cienc. Rural**, v. 33, p. 943– 947, 2003.

- ISO, T., WATANABE, T., IWAMOTO, T., SHIMAMOTO, A., FURUICHI, Y. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 206-210, 2006.
- JAGETIA, G.C., ARUNA, R. Hydroquinone increases the frequency of micronuclei in a dose-dependent manner in mouse bone marrow. **Toxicol. Lett.**, v. 93, p. 205-213, 1997.
- JYOTHI, B., NARAYAN, G. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, p. 417-421, 1999.
- KAMMANN, U., VOBACH, M., WOSNIOK, W. Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 51, p. 97-102, 2006.
- KEY, P.B., SCOTT, G.I. Lethal and sublethal effects of chlorine, phenol, and chlorine-phenol mixtures on the mud crab, *Panopeus herbstii*. **Environ. Health Perspect.**, v. 69, p. 307-312, 1986.
- KISHINO, T., KOBAYASHI, K. Relation between toxicity and accumulation of chlorophenols at various pH, and their absorption mechanism in fish. **Water Res.**, v. 29, p. 431-442, 1995.
- KOLANCZYK, R.C., SCHMIEDER, P.K. Rate and capacity of hepatic microsomal ring-hydroxylation of phenol to hydroquinone and catechol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology**, v. 176, p. 77-90, 2002.
- KOTKAT, H.M., RADY, A.A., JANOS, N. Sublethal effects of phenol on the phospholipid fatty acid composition of carp erythrocyte plasma membrane. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 42, p. 35-29, 1999.
- KRAJNOVIĆ-OZRETIĆ, M., OZRETIĆ, B. Toxic effects of phenol on Grey Mullet, *Mugil auratus* Risso. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 40, p. 23-29, 1988.
- KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. In: WALKER, J.M (Ed.). **Basic Protein and Peptide Protocols**. Totowa: Human Press, 1994. (Methods in molecular biology, v. 32).
- KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. In: WALKER, J.M (Ed.), Methods in Molecular Biology, v. 32: **Basic protein and peptide protocols**. Human Press Inc., Totowa, NJ, 1994.
- KUMAR, V., MUKHERJEE, D. Phenol and sulfide induced changes in the ovary and liver of sexually maturing common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquat. Toxicol.**, v. 13, p. 53-60, 1988.
- LARDY, H.A., PAETKAU, V., WALTER, P. Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis: the role of mitochondria in supplying precursors of phosphoenolpyruvate. **National Academy of Sciences**, v. 53, p. 1410-1415, 1965.
- LAYIWOLA, P.J., LINNECAR, D.F.C. The biotransformation of [<sup>14</sup>C]phenol in some freshwater fish. **Xenobiotica**, v. 11, n. 3, p. 167-171, 1981.

- LEMOS, C.T., RÖDEL, P.M, TERRA, N.R., OLIVEIRA, N.C.D, ERDTMANN, B. River genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 66, p. 391-401, 2007.
- LEVESQUE, H.M., MOON, T.W., CAMPBELL, P.G.C., HONTELA, A. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquat. Toxicol.**, v. 60, p. 257-267, 2002.
- LIMA, A.O., SOARES, J.B., GRECO, J.B., GALIZZI, J., CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicado à clínica**. 4. ed. RJ: Guanabara Koogan, 1969. p. 653.
- LOPES, R.B. **Caracterização dos lagos de pesca esportiva frente à qualidade de água e ao manejo empregado**. Dissertação (mestrado) SP. Unesp-Ilha Solteira, 2000.
- LU, G.D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state: I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.**, v. 33, p. 249-254, 1939.
- MALIK, D.S., SASTRY, K.V., HAMILTON, D.P. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). **Environ. Int.**, v. 24, p. 433-438, 1998.
- MCKIM, J.M., KOLANCZYK, R.C., LIEN, G.J., HOFFMAN, A.D. Dynamics of renal excretion of phenol and major metabolites in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, v. 45, p. 265-277, 1999.
- MCKIM, J.M. JR., MCKIM, J.M. SR., NAUMANN, S., HAMMERMEISTER, D.E., HOFFMAN, A.D., KLAASSEN, C.D. In vivo microdialysis sampling of phenol and phenyl glucoronide in the blood of unanesthetized rainbow trout: implications for toxicokinetic studies. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 20, p. 190-198, 1993.
- MEDINSKY, M.A., KENYON, E.M., SCHLOSSER, P.M. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. **Toxicology**, v. 105, p. 225-233, 1995.
- MITROVIC, V.V., BROWN, V.M., SHURBEN, D.G., BERRYMAN, M.H. Some pathological effects of sub-acute and acute poisoning of rainbow trout by phenol in hard water. **Water Res.**, v. 2, p. 249-254, 1968.
- MOENS, L.N., SMOLDERS, R., VAN DER VEN, K., VAN REMORTEL, P., DELFAVERO, J., DE COEN, W.M. Effluent impact assessment using microarray-based analysis in common carp: A systems toxicology approach. **Cremosphere**, v. 67, p. 2293-2304, 2007.
- MOZETO, A.A., ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. (Org). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos:Rima, 2006. p. 15-36.

- MURRAY, R.K. Metabolismo de xenobióticos. In: MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. (Org.). **Harper: bioquímica ilustrada**. 26. ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 626-632.
- NAGEL, R. Species differences, influence of dose and application on biotransformation of phenol in fish. **Xenobiotica**, v. 13, p. 101-106, 1983.
- NASCIMENTO, E. Mecanismos bioquímicos dos agentes químicos: biotransformação. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. p. 39-53.
- NIKINMAA, M. How does environmental pollution affect red cell function in fish? **Aquat. Toxicol.**, v. 22, p. 227-238, 1992.
- OLSEN, C.M., MEUSSEN-ELHOLM, E.T.M., HOLME, J.A., HONGSLO, J.K. Brominated phenols: characterization of strogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7. **Toxicol. Lett.**, v. 129, p. 55-63, 2002.
- ORUÇ, E.Ö., ÜNER, N. Effects of azinphosmethyl on some biochemical parameters in blood, muscle, and liver tissues of *Cyprinus carpio* (L.). **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 62, p. 65–71, 1998.
- ORUÇ, E.Ö., ÜNER, N. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolism in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. **Environ. Pollut.**, v. 105, p. 267-272, 1999.
- PATNAIK, P., KHOURY, J.N. Reaction of phenol with nitrite ion: pathways of formation of nitrophenols in environmental waters. **Wat. Res.**, v. 38, p. 206-210, 2004.
- PESONEN, M., ANDERSSON, T. Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. **Xenobiotica**, v. 21, p. 461-471, 1991.
- PERRY, S.F., MCDONALD, G. Gas Exchange. In: EVANS, D.H. (Org.). **The physiology of fishes**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 251-278.
- PETRI, D., GLOVER, C.N., YLVING, S., KOLÅS, K., FREMMERSVIK, G., WAAGBØ, R., BERNTSSEN, M.H.G. Sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan as assessed by haematology, blood biochemistry, and growth parameters. **Aquat. Toxicol.**, v. 80, p. 207-216, 2006.
- RAMESH, M., SARAVANAN, M. Haematological and biochemical responses in a freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to chlorpyrifos. **International Journal of Integrative Biology**, v. 3, p. 80-83, 2008.
- REDDY, M.M., KUMAR, V.A., REDDY, P.S., REDDY, S.L.N. Phenol induced metabolic alterations in the brain and muscle of a fresh water fish *Channa punctatus* during sublethal toxicosis. **Ecotoxicol. Environ. Monit.**, n. 3, p. 13–17, 1993.

- REITMAN, S., FRANKEL, S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. **Am. J. Clin. Pathol.**, n. 28, p. 56–63, 1957.
- ROCHE, H., BOGÉ, G. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. **Mar. Environ. Res.**, n. 41, p. 27-43, 1996.
- ROCHE, H., BOGÉ, G. In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 125, p. 345-353, 2000.
- SAHA, N.C., BHUNIA, F., KAVIRAJ, A. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 63, p. 195-202, 1999.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E. Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 36, p. 57-65, 1997.
- SANNADURGAPPA, D., RAVINDRANATH, N.H., ALADAKATTI, R.H. Toxicity, bioaccumulation and metabolism of phenol in the freshwater fish. **J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.**, n. 18, p. 65-77, 2007.
- SCHWAIGER, J., SPIESER, O.H., BAUER, C., FERLING, H., MALLOW, U., KALBFUS, W., NEGELE, R.D. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquat. Toxicol.**, n. 51, p. 69-78, 2000.
- SCOTT, G.R., SLOMAN, K.A. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquat. Toxicol.**, n. 68, p. 369-392, 2004.
- SIANG, H.Y., YEE, L.M., SENG, C.T. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behavior and some hematological parameters of Asian swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew). **Pest. Biochem. Physiol.**, n. 89, p. 46-53, 2007.
- SOBHA, K.; POORNIMA, A.; HARINI, P.; VEERAI AH, K. A study on biochemical changes in the fresh water fish, *Catla catla* (Hamilton) exposed to the heavy metal toxicant cadmium chloride. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 1, p. 1-11, 2007.
- SOLEM, L.E., KOLANCZYK, R.C., MCKIM, J.M. An in vivo microdialysis method for the qualitative analysis of hepatic phase I metabolites of phenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, v. 62, p. 337-347, 2003.
- SWIFT, D.J. Changes in selected blood component concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, exposed to hypoxia or sublethal concentrations of phenol or ammonia. **J. Fish Biol.**, v. 19, p. 45-61, 1981.
- TAYSSE, L., TROUTAUD, D., KHAN, N.A., DESCHAUX, P. Structure activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicology**, v. 98, p. 207-214, 1995.

- TIŠLER, T., ZAGORC-KONČAN, J. Comparative assesment of toxicity of phenol, formaldehyde, and industrial wastewater to aquatic organism. **Water Air Soil Pollut.**, v. 97, p. 315-322, 1997.
- TINTOS, A., GESTO, M., MÍGUEZ, J.M., SOENGAS, J.L.  $\beta$ -Naphthoflavone and benzo(a)pyrene treatment affect liver intermediary metabolism and plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 69, p. 180-186, 2008.
- TOLLEFSEN, K.E., BLIKSTAD, C., EIKVAR, S., FINNE, E.F., GREGERSEN, I.K. Cytotoxicity of alkylphenols and alkylated non-phenolics in a primary culture of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 69, p. 64–73, 2008.
- TONG, Z., JAMES, M.O. Purification and characterization of hepatic and intestinal phenol sulfotransferase with high affinity for benzo[a]pyrene phenols from channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 376, p. 409-419, 2000.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annal. Clin. Biochem.**, v. 6, p. 24–27, 1969.
- TRIPATHI, G., VERMA, P. Pathway-specific response to cortisol in the metabolism of catfish. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 136, p. 463-471, 2003.
- TSUTSUI, T., HAYASHI, N., MAIZUMI, H., HUFF, J., BARRET, J.C. Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. **Mutat. Res.**, v. 373, p. 113-123, 1997.
- URBINATI, E.C., GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L.C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 225-246.
- VERMA S.R., RANI, S., TYAGI, A.K., DALELA, R.C. Evaluation of acute toxicity of phenol and its chloro- and nitro-derivates to certain teleosts. **Water Air Soil Pollut.**, v. 14, p. 95-102, 1980.
- VERMA S.R., RANI, S., DALELA, R.C. Synergism, antagonism, and additivity of phenol, pentachlorophenol, and dinitrophenol to a fish (*Notopterus notopterus*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 10, p. 365-370, 1981.
- VERMA, S.R., RANI, S., DALELA, R.C. Effect of phenol on in vivo activity of tissue transaminases in the fish *Notopterus notopterus*. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 6, p. 171-176, 1982.
- WAN, J., WINN, L.M. The effects of benzene and the metabolites phenol and catechol on c-Myb and Pim-1 signaling in HD3 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 201, p. 194-201, 2004.