

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 E RESPOSTAS METABÓLICAS E HEMATOLÓGICAS
DO BAGRE DO CANAL (*Ictalurus punctatus*, RAFINESQUE, 1818) EXPOSTO A
CONCENTRAÇÃO SUB-LETAL DE FENOL E RECUPERAÇÃO**

FERNANDA DIAS DE MORAES

São Carlos – SP

2009

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 E RESPOSTAS METABÓLICAS E HEMATOLÓGICAS
DO BAGRE DO CANAL (*Ictalurus punctatus*, RAFINESQUE, 1818) EXPOSTO A
CONCENTRAÇÃO SUB-LETAL DE FENOL E RECUPERAÇÃO**

FERNANDA DIAS DE MORAES

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

2009

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

M827ta

Moraes, Fernanda Dias de.

Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque, 1818) exposto a concentração sub-letal de fenol e recuperação / Fernanda Dias de Moraes. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

92 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Toxicologia. 2. Metabolismo. 3. Fenol. 4. Estresse. 5. *Ictalurus punctatus*. 6. Peixe. I. Título.

CDD: 615.9 (20^a)

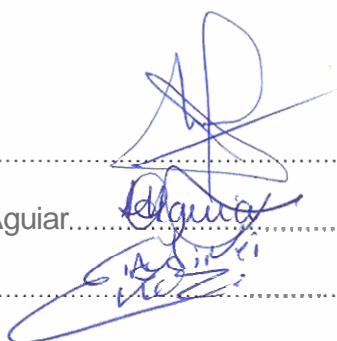
Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Convênio UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Fernanda Dias de Moraes

Prof. Dr. Gilberto Moraes.....

Profa. Dra. Lucia Helena de Aguiar.....

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

Handwritten signatures in blue ink are placed over the dotted lines. The top signature is for Prof. Dr. Gilberto Moraes, the middle one for Profa. Dra. Lucia Helena de Aguiar, and the bottom one for Prof. Dr. Claudinei da Cruz.

Orientador
Prof. Dr. Gilberto Moraes

*Aos meus amados pais, Samuel e Estela,
e ao meu querido irmão Rafael*

“O temor do Senhor é o princípio do saber”.

Pv. 1:7a

AGRADECIMENTOS

Agradeço e louvo ao meu Deus, hoje e sempre.

Agradeço ao meu orientador, professor Gilberto, que fez jus a sua condição de me ensinar e orientar enquanto eu buscava desenvolver o meu conhecimento. Ensinou-me muito além da bioquímica e o fez pela amizade, serenidade e prontidão.

Aos meus queridos amigos, Cleujosí, Cláucia, Diego, Fernando, Francine, Franmir, Gustavo, Ive, Joyce, Lícia, Lívia, Lucas, Luciana, Marcelo e Rodrigo, por estarem sempre prontos a me ensinar, por compartilharem suas vidas comigo e por serem bons amigos, dentro e fora do laboratório.

A Juliana, que com tranqüilidade e amizade, acalmou meus ânimos diante de tantos desafios na bancada. E ainda, por me fazer companhia nessa etapa final e corrigir este trabalho.

A Priscila, minha companheira de experimento, por trabalhar com amizade e disciplina.

A Araceli, por sua amizade, pela disposição e por corrigir este trabalho.

Aos meus pais, Samuel e Estela, porque sempre priorizaram, investiram e acreditaram nos meus estudos. Diante de tantos livros e idéias, pude perceber que o mais importante eu já aprendi e foi com vocês!

Ao meu irmão Rafael, pelas tímidas, mas doces palavras de apoio, pela compreensão e, principalmente, por ser um grande amigo-irmão.

Ao meu querido Danilo, pelo amor expresso em companheirismo, amizade e carinho. Por todos os seus abraços, festivos ou calmantes, pelos seus conselhos e por cuidar de mim em São Carlos. E ainda, por me ajudar na digitação dos dados e formatação deste trabalho.

Aos meus familiares e aos meus amigos de Pederneiras, pelo incentivo e pelas orações.

Ao Seu Toninho, por toda ajuda, amizade e gentileza, que me permitiram retirar o experimento do papel e pô-lo em prática.

Ao Claudinei, por me auxiliar no teste de toxicidade aguda, por aceitar o meu pedido para compor a banca examinadora, pelas contribuições a este trabalho e pela amizade conferida.

A prof. Dra. Lúcia por compor a banca examinadora e por suas contribuições.

Aos professores da Fisiologia, pelo conhecimento passado e idéias inculcadas.

Ao secretário Alexandre, pela gentileza e disposição.

A Capes, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O fenol e seus derivados são compostos orgânicos aromáticos provenientes de efluentes industriais, domésticos e de práticas em agricultura. São encontrados tanto em corpos de água doce como em salgada e podem induzir toxicidade aos animais expostos. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da exposição sub-letal ao fenol ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ou 10% da CL50) sobre as variáveis hematológicas e metabólicas de juvenis do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) após 96 h de exposição e recuperação por 7 e 14 dias. No fígado, no músculo e plasma foram quantificados amônia, lactato, piruvato, glicose, aminoácidos livres, proteína, triglicerídeos e ácidos graxos. O teor de glicogênio foi determinado no fígado e músculo. Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALAT), aspartato aminotransferase (ASAT), lactato desidrogenase (LDH), fosfatase ácida (FAC) e fosfatase alcalina (FALC) foram ensaiadas no músculo branco e fígado. A acetilcolinesterase (AChE) foi ensaiada no cérebro e no músculo branco. As variáveis hematológicas avaliadas foram hematócrito, conteúdo de hemoglobina e contagem de células vermelhas (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Alterações hematológicas foram observadas após 7 dias de recuperação. Após 96 h de exposição, as atividades da ASAT e ALAT hepática e muscular e a concentração de proteína indicaram proteólise nestes tecidos. No músculo, verificou-se lipólise muscular. No tecido hepático, os dados são sugestivos de gliconeogênese. Após 7 dias de recuperação, os resultados indicaram proteólise, lipólise e persistência dos processos gliconeogênicos. Após a recuperação por 14 dias, observou-se glicogenólise muscular e hepática, assim como proteólise muscular. Alterações nas atividades das fosfatases ácida e alcalina foram sugestivas de possíveis danos nas membranas celulares. A atividade da enzima AChE cerebral apresentou-se reduzida após recuperação por 14 dias. No músculo, observou-se aumento na atividade desta enzima na recuperação por 7 e 14 dias. Estes resultados indicam que as alterações observadas parecem ocorrer devido ao aumento da demanda metabólica e de outros mecanismos que respondem pela homeostasia do animal frente ao fenol ambiental.

ABSTRACT

Phenol and its derivatives are aromatic organic compounds and there are present in the mill, domestic waste and crop science. Moreover, phenol could induce toxicity in both freshwater and seawater fish and other animals. The aim of this work was evaluating hematological features, intermediary metabolism and muscular and cerebral acetylcholinesterase enzyme activity in juveniles channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to 1.5 mg L⁻¹ of phenol (10% LC50) for 96 h and after 7 or 14 days of recovery. Ammonia, lactate, pyruvate, glucose, amino acids, protein, triglycerides and fatty acids concentrations were measured in liver, muscle and plasma. Glycogen concentration was determined in liver and muscle. Aspartate aminotransferase (ASAT), alanine aminotransferase (ALAT), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (FAC) enzymes activities were assayed in liver and muscle. Acetylcholinesterase activity was assayed in white muscle and brain. Hematological features were analyzed through hematocrit, haemoglobin concentration, red cell count (RBC), mean corpuscular volume (VCM), mean corpuscular haemoglobin (HCM) and mean corpuscular haemoglobin concentration (CHCM). Hematological alterations were observed after 7 days of recovery. After 96 h, ALAT and ASAT activities and protein concentration indicated proteolysis liver and muscle. The triglycerides and fatty acids concentration suggested lipolysis in muscle. The results also indicated gluconeogenesis in liver. Gluconeogenesis follows over 7 days of recovery and glycemia was kept constant. After 7 days of recovery, the results suggested proteolysis and lipolysis in liver. After 14 days of recovery, the results indicated glycogenolysis and muscle and liver. Reductions of protein and amino acid concentrations plus ASAT activity rising in muscle, also suggested proteolysis. Alterations in FAC and ALP activities in muscle and liver were observed. These results suggest membrane cell damage. Reduction in cerebral AChE activity was observed after 14 days recovery. In other hand, an increase of muscular AChE was observed after 7 and 14 days recovery. In conclusion, the alterations observed in this work seem to be due to increased metabolic demand and other mechanisms that respond to homeostasis in fish.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Estressores que podem atuar sobre os peixes de forma a provocar neles uma série de respostas primárias, secundárias e terciárias. Adaptado de Barton, 2002. .. 17
- FIGURA 2: Representação da estrutura molecular do fenol 22
- FIGURA 3: Representação do bague do canal (*Ictalurus punctatus*). Fonte: *www.dec.ny.gov* 28
- FIGURA 4: Esquema ilustrativo do desenho experimental da exposição ao fenol e das recuperações por 7 e 14 dias. 33
- FIGURA 5- Relação concentração de fenol e mortalidade de bague do canal (*Ictalurus punctatus*) durante o teste de toxicidade aguda. 44
- FIGURA 6: Atividade específica da ALAT hepática (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 57
- FIGURA 7: Atividade específica da ASAT hepática (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 58
- FIGURA 8: Atividade específica da LDH hepática (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 58
- FIGURA 9: Atividade específica da FAC hepática (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 59
- FIGURA 10: Atividade específica da FALC hepática (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 59
- FIGURA 11: Atividade específica da ALAT muscular (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 61
- FIGURA 12: Atividade específica da ASAT muscular (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus

respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 62

FIGURA 13: Atividade específica da LDH muscular ($\text{UI mg de proteína}^{-1}$) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 62

FIGURA 14: Atividade específica da FAC muscular ($\text{UI mg de proteína}^{-1}$) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 63

FIGURA 15: Atividade específica da FALC muscular ($\text{UI mg de proteína}^{-1}$) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*). 63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1– Mortalidade de bagre do canal (<i>Ictalurus punctatus</i>) submetido a teste preliminar de toxicidade aguda (n=10).	43
TABELA 2 – Mortalidade de bagre do canal (<i>Ictalurus punctatus</i>) submetido a teste definitivo de toxicidade aguda (n=9).	44
TABELA 3: Médias e desvios-padrão das variáveis hematológicas do bagre do canal após exposição ao fenol e recuperação por 7 e 14 dias.....	46
TABELA 4: Médias e desvios-padrão dos intermediários metabólicos de fígado do bagre do canal após exposição ao fenol e após recuperação por 7 e 14 dias.	49
TABELA 5: Médias e desvios-padrão dos intermediários metabólicos de plasma do bagre do canal após exposição ao fenol e recuperação por 7 e 14 dias.	52
TABELA 6: Médias e desvios-padrão dos intermediários metabólicos de músculo branco do bagre do canal após exposição ao fenol e recuperação por 7 e 14 dias.	55
TABELA 7: Atividade específica da AChE no músculo branco e cérebro do bagre do canal após exposição ao fenol e após recuperação por 7 e 14 dias.....	64
TABELA 8: Valores da CL50 de algumas espécies de peixe expostas ao fenol.....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Estresse em peixes	16
2.2 Peixes como bioindicadores e testes de toxicidade.....	17
2.3 Ferramentas bioquímicas	18
2.3.1 Enzimas.....	19
2.3.2 Variáveis hematológicas	21
2.4 Fenol no ambiente aquático	22
2.5 Biotransformação do fenol em peixes.....	23
2.6 Toxicidade dos fenóis	24
2.7 <i>Ictalurus punctatus</i>	28
3 JUSTIFICATIVA	29
4 OBJETIVO.....	30
4.1. Estratégias empregadas.....	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Aclimação dos animais	31
5.2 Teste de toxicidade aguda – CL50;96h.....	31
5.3 Exposição sub-letal ao fenol	32
5.4 Recuperação por 7 e 14 dias	33
5.5 Variáveis de qualidade da água.....	34
5.6 Variáveis hematológicas	35
5.7 Intermediários metabólicos.....	36
5.8 Ensaio enzimáticos.....	39
5.9 Análise estatística.....	42
6 RESULTADOS	43
6.1 Toxicidade aguda do fenol para o bagre do canal.....	43
6.2 Variáveis hematológicas	45
6.3 Metabolismo intermediário.....	47
6.3.1 Fígado	47
6.3.2 Plasma.....	50
6.3.3 Músculo Branco.....	53
6.3.4 Ensaio enzimáticos.....	56
6.3.4.1 Fígado	56
6.3.4.2 Músculo.....	60
6.3.4.3 Cérebro.....	64
7 DISCUSSÃO.....	65
7.1 Teste de toxicidade aguda.....	65
7.2 Variáveis hematológicas	66
7.3 Metabolismo intermediário.....	68

7.3.1 Exposição sub-letal ao fenol por 96 horas	68
7.3.2 Recuperação por 7 dias	76
7.3.3 Recuperação por 14 dias	77
7.4 Fosfatases ácida e alcalina	78
7.5 Acetilcolinesterase – AChE	79
8 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE A.....	90
APÊNDICE B.....	91
APÊNDICE C.....	92

1 INTRODUÇÃO

Em meados do século XIX, após a Revolução Industrial, a poluição antropogênica aumentou de forma descontrolada, com aumento dos lançamentos de resíduos industriais e domésticos no ambiente aquático. Entretanto, somente a partir da década de 1960 é que a poluição se tornou um fato reconhecido internacionalmente, devido aos problemas causados ao homem e ao ambiente (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

A partir disso, o conhecimento a respeito dos processos de geração, transporte, transformação, destino final e os efeitos de uma variedade de compostos químicos, orgânicos e inorgânicos, que são incorporados aos ecossistemas aquáticos e terrestres, começaram a ser mais estudados (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Dentre as maiores fontes de poluição no ambiente aquático, destacam-se os lançamentos de efluentes líquidos industriais e domésticos sem o devido tratamento (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Segundo MOENS (2007) os efluentes são fontes diretas e contínuas de depósitos de poluentes na água e podem causar danos em todos os níveis biológicos, desde o molecular até o ecossistema. BEGUM (2004) admite ainda que as descargas de resíduos industriais, domésticos e agrícolas podem afetar especialmente os peixes, principalmente àqueles que habitam locais onde há baixa diluição de efluentes.

Um conjunto de substâncias químicas que estão comumente presentes em muitos efluentes industriais são os fenóis. Dentre estes, o fenol puro tem aparecido em grande escala (KOTKAT et al., 1999). Devido à sua toxicidade, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) limitou o lançamento de fenóis em corpos de água doce e salina pela resolução CONAMA n.º 357 de 17/03/2005. Em água doce de classe I e II, destinadas a proteção de comunidades aquáticas, consumo humano após tratamento e à aquicultura, a concentração máxima permitida de fenóis é de $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ (BRASIL, 2005). Contudo, concentrações de fenol acima do permitido têm sido encontradas em algumas bacias hidrográficas do estado de São Paulo (CETESB, 2008).

Sendo assim, o tratamento impróprio destes compostos e o seu despejo no ambiente aquático podem resultar em deterioração da biota aquática. Por isso, os organismos aquáticos, como os peixes, crustáceos, bactérias e algas, são cada vez mais

utilizados para se avaliar a qualidade da água, pois estão relacionados às variações do ambiente aquático. (TISLER e ZAGORC-KONCAN, 1997).

BEGUM (2004) afirma que quando um tóxico entra no organismo de animais aquáticos, muitas respostas bioquímicas e fisiológicas ocorrem, podendo ser adaptativas ou indicadoras de toxicidade. As respostas bioquímicas são sensíveis e aparecem rapidamente em uma situação estressora. Por isso, elas têm sido freqüentemente utilizadas como ferramenta de monitoramento de poluentes. Com elas, podem-se ainda compreender os mecanismos de ação do poluente e delinear possíveis formas para minimizar os efeitos danosos aos animais.

Os peixes são muito utilizados em ensaios toxicológicos, pois estão amplamente distribuídos no ambiente aquático, possuem habilidade para responder a poluição ambiental, têm importância econômica e são relativamente fáceis de serem transportados e mantidos sob condições laboratoriais (AGRAHARI e GOPAL, 2009).

O bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) é um teleósteo de água doce, originário dos Estados Unidos, México e Canadá. Esta espécie foi introduzida em quase todos os países do mundo que possuem piscicultura em desenvolvimento, incluindo o Brasil, onde despertou o interesse comercial, devido à qualidade da carne, rápido crescimento e fácil manejo (SOUZA, 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRESSE EM PEIXES

O conceito de estresse já levantou muitas discussões entre os estudiosos da área, mas todos eles sempre tinham em comum a premissa de que uma ação estimuladora sobre um sistema biológico provocaria uma reação subsequente (PICKERING, 1981).

BARTON (2002) define estresse como uma resposta adaptativa que permite ao peixe enfrentar um estressor, de forma a manter o estado homeostático. Esse estressor poderia ser físico (manuseio, confinamento, transporte, captura), qualquer estímulo perceptível (presença de um predador na água), ou químico (acidificação, exposição a xenobióticos) (FIGURA 1). Entende-se por xenobiótico qualquer composto químico estranho ao organismo, que não é considerado como componente natural do mesmo, como poluentes ambientais, fármacos, entre outros.

Dessa forma, é possível definir estresse como um mecanismo de compensação fisiológica que um organismo adota em resposta a um estressor, cujo objetivo é manter o equilíbrio homeostático. Contudo, quando o agente estressor excede a tolerância limite para compensar a situação de estresse, o resultado é morte do indivíduo. Na natureza, os organismos aquáticos estão comumente expostos a concentrações sub-letais de poluentes. Como consequência, muitos processos reversíveis e irreversíveis podem ser estabelecidos a fim de manter a homeostasia (SANCHO et al., 2009).

As respostas de peixes a estressores ambientais podem ser agrupadas em respostas primárias, que são aquelas referentes às respostas neuroendócrinas iniciais, como a liberação de catecolaminas e corticosteróides; as respostas secundárias são evidenciadas pelas alterações de substratos plasmáticos e tissulares (como glicogênio, lactato, glicose, entre outros), alterações hematológicas, osmorregulatórias, etc; e as respostas terciárias, se referem às alterações no desempenho do animal como um todo, como no crescimento, no comportamento, na suscetibilidade à doenças e na sobrevivência (FIGURA 1) (BARTON, 2002).

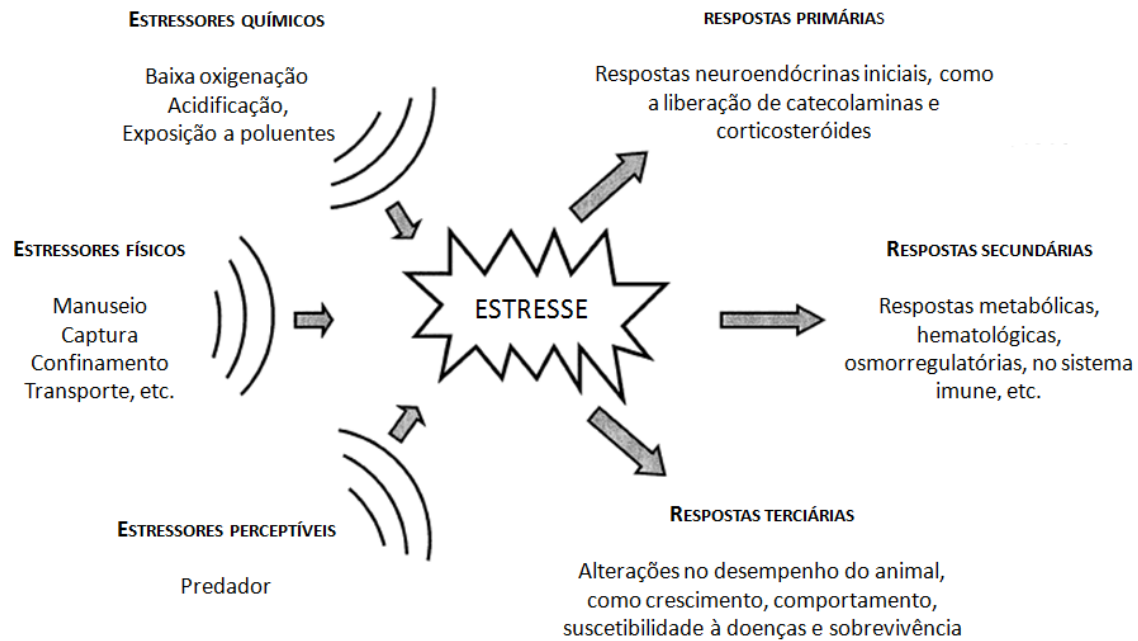


FIGURA 1: Estressores que podem atuar sobre os peixes de forma a provocar neles uma série de respostas primárias, secundárias e terciárias. Adaptado de Barton, 2002.

2.2 PEIXES COMO BIOINDICADORES E TESTES DE TOXICIDADE

Nos últimos anos, os peixes têm sido frequentemente utilizados como organismos indicadores para investigar os efeitos biológicos de poluentes no ambiente aquático. Os primeiros relatos sobre a utilização de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos datam da década de 1920, sendo que os peixes foram os primeiros organismos a serem utilizados (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; AGRAHARI e GOPAL, 2009).

Alguns motivos têm norteado a utilização de peixes em ensaios toxicológicos, entre eles: os peixes estão amplamente distribuídos no ambiente aquático, possuem habilidade para responder a poluição ambiental, têm importância econômica, já que são fontes de alimento, e são relativamente fáceis de serem transportados e mantidos sob condições laboratoriais (AGRAHARI e GOPAL, 2009). Além disso, são modelos úteis

para entender como as perturbações externas podem afetar as funções biológicas em outros vertebrados (SANCHO et al., 2009).

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em um curto período, geralmente de um a quatro dias. Os critérios de avaliação são a mortalidade para peixes e imobilidade para invertebrados. Uma das formas de se expressar os resultados é em CL50 (Concentração Letal para 50% de uma determinada população) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Entretanto, no ambiente aquático, devido a fatores de diluição, os organismos estão expostos a concentrações sub-letais de contaminantes, que não levam à morte do organismo, mas podem causar distúrbios fisiológicos e comportamentais em longo prazo.

Por isso, foram desenvolvidos os testes de toxicidade crônica, os quais permitem avaliar os efeitos adversos mais sutis nos organismos expostos. Os ensaios de toxicidade crônica podem ser de três tipos: testes com todo o ciclo de vida de uma espécie; testes com parte do ciclo de vida, geralmente um estágio mais sensível e crítico; e testes funcionais, que se baseiam no fato de peixes e outros organismos responderem à exposição de concentrações sub-letais da substância tóxica. As respostas medidas nos testes funcionais referem-se a alterações fisiológicas, hematológicas, histológicas, comportamentais, enzimáticas, entre outras. Contudo, estes efeitos podem ser transitórios e desaparecer com a recuperação do ambiente (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

2.3 FERRAMENTAS BIOQUÍMICAS

As análises de tecidos e fluidos corpóreos, como metabólitos, enzimas e outros variáveis bioquímicas, têm sido utilizados para se estudar a interação da substância química com o sistema biológico (AZEVEDO e CHASIN, 2003). Neste contexto, surgiram os biomarcadores, que são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas em alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DEPLEDGE, 1993 apud ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Além disso, a utilização de constituintes bioquímicos e atividades enzimáticas têm sido exploradas, pois estas variáveis são altamente sensíveis, conservadas entre as espécies e são ferramentas utilizadas como indicadores de estresse (AGRAHARI e GOPAL, 2009).

Segundo SCOTT e SLOMAN (2004) as alterações no metabolismo de peixes, decorrentes da exposição à xenobióticos, podem ser verificadas através das alterações nas concentrações de substratos metabólicos, como glicose, glicogênio, lactato, lipídeos, proteínas, entre outros. No entanto, 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 atividade de enzimas metabólicas. Dessa forma, as alterações da atividade destas enzimas são igualmente importantes para se compreender as alterações metabólicas em peixes.

2.3.1 ENZIMAS

O estudo das atividades enzimáticas tem importância na identificação de alterações nos sistemas biológicos, pois são as enzimas que catalisam as reações e tem elevado grau de especificidade sobre seu substrato. Alterações da atividade das enzimas podem ser utilizadas como indicadores de distúrbio metabólicos ou de danos teciduais (MOTTA, 2000).

As aminotransferases (ASAT e ALAT) são responsáveis pela transferência de grupos amino durante a degradação ou síntese de aminoácidos. Participam da interconversão dos aminoácidos a piruvato e oxaloacetato, sendo ponte entre o metabolismo de aminoácidos e de carboidratos. Estão amplamente distribuídas nos tecidos, com maior atividade no fígado, músculo, entre outros. Alterações nas atividades destas enzimas podem indicar alterações no metabolismo de proteínas ou desordens nos tecidos, como lesão hepatocelular, evidenciadas pelo aumento dessas enzimas no plasma (MOTTA, 2000; OKECHUKWU e AUTA, 2007).

A LDH, lactato desidrogenase, é uma enzima citoplasmática responsável pela interconversão lactato-piruvato, presente em quase todas as células. Alterações na

atividade desta enzima podem indicar alterações no metabolismo de carboidratos, evidenciado por processo anaeróbico e gliconeogênico, ou danos teciduais, como lesão no miocárdio, comprovado pelo aumento dessa enzima no plasma (MOTTA, 2000).

As fosfatases pertencem a um grupo de enzimas não específicas que hidrolisam fosfomonoésteres. A fosfatase ácida (FAC) é uma enzima lisossomal que atua em meio ácido e está amplamente distribuída nos tecidos. Por outro lado, a fosfatase alcalina (FALC) é uma enzima ligada à membrana celular e atua em pH alcalino. Assim como a fosfatase ácida, está amplamente distribuída nos tecidos. É notadamente presente no fígado, na mucosa intestinal, no baço e nos ossos. Quando extravasa para o plasma, sua origem é, principalmente, dos ossos e do fígado. Nos ossos, a atividade da fosfatase alcalina está ligada à formação dos mesmos (osteoblastos) e no fígado, a enzima está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos biliares (MOTTA, 2000).

Em peixes, já se conhece a existência da atividade da fosfatase ácida e alcalina no fígado, rins, brânquias, músculo, intestino e plasma. Além disso, a atividade da FAC foi verificada nas células de Sertoli da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) e nas células epiteliais dos ductos eferentes do peixe-rei (*Odonthestes perugia*) (PORAWSKI et al., 2004). Sabe-se ainda que a FALC está envolvida com processos osmorregulatórios, transporte de membrana e formação dos ossos (MAJHI et al., 2006). Assim, muito se tem estudado sobre estas enzimas e inúmeras funções têm sido levantadas a partir destes estudos (MOLINA et al., 2005; BARSE et al., 2006; MAJHI et al., 2006; OKECHUKWU e AUTA, 2007; AGRAHARI e GOPAL, 2009; SANCHO et al., 2009).

O fígado, por ser o sítio principal de biotransformação de xenobióticos, está vulnerável às agressões químicas. Na maioria dos casos, diante destas agressões, enzimas celulares são liberadas dos hepatócitos em necrose para a corrente sangüínea. Muitas destas enzimas, como a FAC e FALC, são utilizadas como indicadores de danos teciduais e disfunções do fígado (KHAN e SARWAR, 2003).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável por hidrolisar a Acetilcolina (ACh) em acetato e colina, inativando-a. Esta enzima está presente na fenda sináptica das fibras ganglionares simpáticas e parassimpáticas, nos terminais das fibras pós-ganglionares parassimpáticas e em sinapses do sistema nervoso central. Está presente

também nas junções neuromusculares, entre a terminação pré-sináptica e a membrana muscular pós-sináptica. A ACh permanece na fenda sináptica por poucos milissegundos, tempo suficiente para produzir um potencial de ação. Dessa forma, a ação da AChE é a rápida remoção da ACh, impedindo assim, que este neurotransmissor excite novamente a célula pós-sináptica. A atividade desta enzima tem sido muito utilizada em testes ecotoxicológicos para avaliar o impacto de inseticidas carbamatos e organofosforados sobre a função neurológica em peixes (PERKINS e SCHLENK, 2000; AGUIAR et al., 2004; SCOTT e SLOMAN, 2004; ALMEIDA et al., 2005).

2.3.2 VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS

O estudo das características sanguíneas em peixes permite determinar os efeitos de produtos tóxicos na água e demais alterações ambientais. Avaliações hematológicas podem, da mesma forma, serem úteis para monitorar a saúde do peixe (CLAUSS et al., 2008). Como as alterações hematológicas provocadas por estressores já estão bem documentadas em peixes (SWIFT, 1981; ROCHE e BOCHÉ, 2000), a hematologia tornou-se uma ferramenta útil no diagnóstico de perturbações homeostáticas (FELDMAN et al., 2000).

O hematócrito (Hct), a concentração de hemoglobina total (Hb) e a contagem de eritrócitos (RBC) são variáveis hematológicas sensíveis a mudanças fisiológicas ocasionadas pelo estresse (HOAR et al., 1992). NIKINMAA (1992) afirma que os dados coletados a partir do sangue dos peixes podem ser considerados ferramentas muito úteis para o monitoramento ambiental, pois respondem a uma variedade de tóxicos do ambiente e podem ser facilmente coletados dos animais. Alterações na RBC e na concentração de hemoglobina podem ser indicativos de hemodiluição ou hemoconcentração e anemias ou policitemias provocadas por estresse (PICKERING, 1981).

Além destas três variáveis, os índices que derivam deles são igualmente importantes para se estudar o efeito de poluentes no ambiente aquático (NIKINMAA, 1992) e para se verificar quadros patológicos (CLAUSS et al., 2008). Estes índices são o

volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). O VCM expressa o volume do eritrócito em micra cúbicos ($1\text{mL} = 10^{12} \mu\text{m}^3$), sendo que as anemias podem ser classificadas conforme este índice em macrocíticas, normocíticas e microcíticas. O HCM expressa o conteúdo hemoglobínico de um eritrócito em micromicrogramas (10^{12}g), indica como está a função respiratória e pode variar conforme o volume celular. O CHCM é dado pela quantidade de hemoglobina em 100 mL de sangue e pode indicar o estado osmorregulatório do eritrócito (BROBECK, 1976).

2.4 FENOL NO AMBIENTE AQUÁTICO

O fenol e seus derivados são compostos orgânicos aromáticos (FIGURA 2). São poluentes ubiqüitários que podem atingir fontes de águas naturais através de efluentes de diversas indústrias químicas, tais como a de carvão, refinaria de óleo, farmacêutica, de resina, de tinta, indústria têxtil, de couro, petroquímica, de produtos agrícolas, de plástico e produtoras de explosivos (LAYIWOLA e LINNECAR, 1981; MCKIM et al., 1999; SAHA et al., 1999).

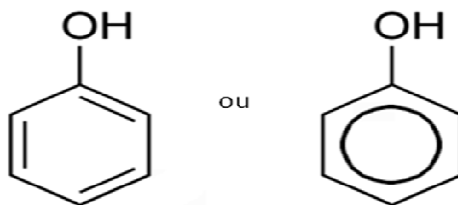


FIGURA 2: Representação da estrutura molecular do fenol

As substâncias fenólicas são tóxicas à vida aquática e também conferem odor e gosto desagradáveis à água potável. O perigo da contaminação ocorre quando os efluentes não são purificados adequadamente (LAYIWOLA e LINNECAR, 1981).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) limitou o lançamento de fenóis em corpos de água doce e salina através da resolução CONAMA n°. 357 de

17/03/2005 (BRASIL, 2005). Em água doce de classe I e II, destinadas a proteção de comunidades aquáticas, consumo humano após tratamento e à aqüicultura, a concentração máxima permitida de fenóis é de 0,003 mg L⁻¹. Entretanto, concentrações de fenol acima do permitido têm sido encontradas em bacias hidrográficas do estado de São Paulo (CETESB, 2008).

A exposição dos peixes ao fenol pode se dar não somente em corpos de águas naturais, mas ainda em sistemas artificiais de cultivo, como pisciculturas, uma vez que estes sistemas podem utilizar águas de sistemas naturais sujeitas à contaminação por fenol.

2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DO FENOL EM PEIXES

O fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação de xenobióticos, embora outros também possam participar dessa função em grau variável, como o intestino, os pulmões, rins e pele (LANDIS e XIU, 1995; AZEVEDO e CHASIN, 2003). A biotransformação consiste em um conjunto de alterações químicas que visam aumentar a solubilidade em água (polaridade) do xenobiótico e facilitar sua eliminação do organismo. Assim, a biotransformação reduz a meia-vida do xenobiótico e minimiza o seu potencial tóxico. Por outro lado, muitos xenobióticos são tóxicos em razão de seus metabólitos. A biotransformação que gera subprodutos mais tóxicos é chamada de toxificação ou ativação metabólica. O benzeno exerce sua toxicidade, principalmente, por seus produtos de biotransformação (fenol, hidroquinona e catecol) que são compostos mais tóxicos que o próprio benzeno (TSUTSUI et al., 1997; WAN e WINN, 2004).

Nos peixes, assim como nos mamíferos, a maior parte das enzimas de biotransformação de xenobióticos está localizada no fígado (CRAVEDI et al., 1999) e a metabolização de fenóis em peixes é reportada em diversos trabalhos (NAGEL, 1983; LAYIWOLA e LINNECAR, 1981; CRAVEDI et al., 1999; TONG e JAMES, 2000; GAWORECKI et al., 2004). A biotransformação pode ser dividida em 2 etapas, chamadas de fase I e II. Na fase I, pode ocorrer hidroxilação do fenol e os produtos formados são hidroquinona e catecol (KOLANCZYK e SCHMIEDER, 2002). LAYIWOLA e LINNECAR (1981) observaram que, em oito espécies de peixes de água

doce, as vias de metabolização do fenol utilizadas na fase II foram a sulfoconjugação e glicuroconjugação, sendo que a conjugação com o sulfato foi mais frequente. O fenol pode ainda ser eliminado sem ser metabolizado (MCKIM et al., 1999). Hepatócitos da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) incubados com 10 e 60 μ M de pentaclorofenol apresentam conjugados de sulfato e glucoronídeos resultantes da biotransformação (CRAVEDI et al., 1999). NAGEL (1983) mostrou que além destes dois metabólitos, o conjugado sulfato quinol apareceu como resultado da biotransformação do fenol na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), no peixe-dourado (*Carassius auratus*) e no *Leuciscus ideus melabotus*.

Compostos fenólicos podem induzir a atividade de sulfotransferases e glicurotransferases hepáticas no bagre do canal (GAWORECKI et al., 2004), que é a espécie deste estudo. TONG e JAMES (2000) mostraram ainda que esta espécie apresenta enzimas sulfotransferases fenólicas, no fígado e intestino. Estes autores afirmam que as sulfotransferases são mais ativas que a glicurotransferases, por terem mais afinidade por compostos fenólicos. Além disso, as sulfotransferases estão mais ativas no intestino que no fígado.

2.6 TOXICIDADE DOS FENÓIS

O fenol entra no organismo dos peixes através das brânquias, intestino, pele e membranas mucosas e, uma vez na corrente sanguínea, consegue ser distribuído para diferentes partes do corpo, afetando vários sistemas e podendo provocar diversos problemas fisiológicos ou levar o animal à morte, dependendo da concentração de exposição (RAVICHANDRAN e ANANTHARAJ, 1984; SAHA et al., 1999). A absorção de clorofenóis pelos peixes ocorre por difusão passiva, na forma indissociada e através da formação de uma ponte de hidrogênio entre o grupo hidroxila dos clorofenóis e elementos biológicos da membrana plasmática das brânquias (KISHINO e KOBAYASHI, 1995). Apesar dos processos de biotransformação e eliminação, o fenol pode se acumular nos tecidos. A tilápia mossambica (*O. mossambicus*) exposta a concentrações sub-letais de fenol apresenta acumulação de fenol no rim, após 30 dias de exposição (SANNADURGAPPA et al., 2007). A bioacumulação de fenol é igualmente

observada nas brânquias, fígado e músculo da Tilápia nilótica (*O. niloticus*) exposta ao fenol por 16 semanas (GAD e SAAD, 2008).

Os mecanismos de ação dos fenóis são múltiplos e muitas vezes antagônicos (ROCHE e BOGÉ, 2000). Diversos estudos mostram que os fenóis são genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (TSUTSUI et al., 1997; YIN et al., 2006; GAD e SAAD, 2008). Em um estudo *in vitro*, o fenol provocou mutações genéticas, aberrações cromossômicas e troca de cromátides-irmãs em células embrionárias de hamsters (TSUTSUI et al., 1997). Em peixes, BOLOGNESI e col. (2006) observaram aumento de micronúcleos em eritrócitos expostos ao bisfenol A e a alquifenóis. Indução de micronúcleos é da mesma forma observada em eritrócitos da tilápia nilótica (*O. niloticus*) exposta a concentrações sub-letais de fenol (GAD e SAAD, 2008).

Os fenóis podem ainda provocar distúrbios no crescimento, na reprodução e funcionar como um interferente endócrino. SAHA e col. (1999) observaram que a Tilápia mossâmbica submetida a concentrações sub-letais de fenol, apresenta redução de apetite, do crescimento, da fecundidade e maturidade. Indução de vitelogenina e redução no índice somático dos testículos foram observados em carpas machos (*Cyprinus carpio*) expostas ao 4-terc-butilfenol, por 28 dias (BARSE et al., 2006). Por outro lado, fêmeas de carpas expostas ao fenol apresentam inibição no desenvolvimento e maturação do ovário. Além disso, verificou-se aumento do colesterol hepático e ovariano, indicando assim, alterações no controle de liberação de gonadotropinas (KUMAR e MUKHERJEE, 1988).

A tilápia nilótica exposta a concentrações sub-letais de fenol apresenta redução no consumo de alimento e conseqüentemente no crescimento, biomassa e peso corporal final. A disfunção endócrina provocada pelo fenol foi observada pela redução dos hormônios tireoidianos triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄) (GAD e SAAD, 2008). Em matrinxã (*B. amazonicus*), o fenol não altera a concentração de cortisol plasmático após 96 h de exposição, mas danifica a habilidade do animal em responder a um estressor secundário (HORI et al., 2008).

Alterações na atividade das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, peroxidase e glutathiona peroxidase são observadas em eritrócitos do robalo (*Dicentrarchus labrax*), submetidos a injeções intraperitoneais de fenol, como indicativo de estresse oxidativo (ROCHE e BOGÉ, 2000). No peixe-dourado (*Carassius auratus*),

exposto a concentrações sub-letais de 2,4 diclorofenol e ao 2,4,6 triclorofenol, apresenta igualmente alterações nas atividades de enzimas hepáticas indicadoras de estresse oxidativo (ZHANG et al., 2004; LI et al., 2007). Contudo, no matrinxã exposto ao fenol, não é observado estresse oxidativo nos eritrócitos e no fígado, sendo que somente na recuperação pode-se observar alteração no metabolismo oxidante dos hepatócitos (AVILEZ, 2008).

O fenol pode provocar alterações comportamentais, como perda do equilíbrio e hiperatividade seguida de letargia, como reportado em *Oryzias latipes* exposta a concentrações sub-letais de fenol (RICE et al. 1997). SCOTT e SLOMAN (2004) reconhecem que poluentes ambientais podem alterar o comportamento de peixes e relacionam estas alterações a disfunções neurológicas, como modificação na atividade de colinesterases. O fenol altera a atividade da acetilcolinestase (AChE) cerebral e muscular em *Channa punctatus* e no matrinxã (REDDY et al., 1993; AVILEZ, 2008).

As alterações histopatológicas são observadas no fígado da tilápia azul (*Oreochromis aureus*) exposta ao fenol (ABDEL-HAMEID, 2007). Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) apresenta lesões nas brânquias, no fígado e na pele, quando expostas ao fenol por uma semana (MITROVIC et al., 1968). Inflamação de células hepáticas e alterações de caráter degenerativo são observadas no fígado da carpa exposta a concentrações sub-letais de terc-butilfenol (BARSE et al., 2006). Danos histopatológicos às brânquias, ao fígado e rim são igualmente observados em matrinxã exposto ao fenol (AVILEZ, 2008).

As variáveis hematológicas respondem à intoxicação por fenóis. A espécie *Dicentrarchus labrax* injetada intra-peritonealmente com fenol apresenta hematócrito constante, mas a concentração total de hemoglobina aumenta nesta espécie (ROCHE e BOGÉ, 2000). Por outro lado, aumento do hematócrito é observado em truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) exposta a concentrações sub-letais de fenol por quatro horas (SWIFT, 1981). A elevação do hematócrito é igualmente observado no matrinxã exposto ao fenol (AVILEZ et al., 2008) e no pacu (*Piaractus mesopotamicus*), no qual também se verifica aumento da hemoglobina total e da RBC, sem alterações dos índices hematimétricos (FIGUEIREDO, 2008).

A citotoxicidade dos fenóis foi demonstrada por FENT e HUNN (1996), que avaliaram diversos poluentes orgânicos ambientais, inclusive os fenóis, em culturas de hepatócitos de truta arco-íris. Este estudo mostrou que os alquifenóis provocam redução do metabolismo celular e perda da integridade da membrana da célula. (TOLLEFSEN et al., 2007). ROGE e BOGÉ (1996) igualmente demonstraram que compostos fenólicos (alquifenol, dinitrofenol, nitrofenol e fenol) são citotóxicos a eritrócitos de *Dicentrarchus labrax* e que a toxicidade desses compostos depende da sua estrutura química, sendo o fenol o menos tóxico.

As alterações no metabolismo intermediário de peixes expostos aos fenóis têm sido freqüentemente constatadas. O matrinxã exposto ao fenol apresenta elevação da atividade de transaminases no músculo e no fígado, assim como aumento na concentração de amônia hepática, indicando proteólise nestes tecidos. Ainda nesta espécie, verifica-se aumento da lactato desidrogenase (LDH) hepática e redução do lactato plasmático, sugestivo de gliconeogênese hepática (HORI et al., 2006). O fenol provoca glicogenólise na tilápia mossâmbica exposta ao fenol (DANGÉ, 1986a). Em outro estudo e nesta mesma espécie, concentrações sub-letais de fenol provocam elevações nas atividades da alanina aminotransferase (ALAT) e aspartato aminotransferase (ASAT), em fígado e músculo, e reduzem os teores de aminoácidos e proteína total nestes tecidos, após 10 semanas de exposição (DANGÉ, 1986b).

SANNADURGAPPA e col. (2007) observaram alterações metabólicas indicativas de catabolismo proteico, glicídico e lipídico em músculo e fígado da tilápia mossâmbica exposta ao fenol. A carpa exposta à concentração sub-letal ($0,68 \text{ mg L}^{-1}$) de 4-terc-butilfenol, por 28 dias, apresenta redução da fosfatase ácida (FAC) em músculo branco, todavia a atividade desta enzima aumenta quando em concentrações mais elevadas de fenol ($1,38$ e $2,3 \text{ mg L}^{-1}$). A fosfatase alcalina (FALC) no músculo está reduzida nesta espécie e, paralelamente às fosfatases, alterações de transaminases, como o aumento da ALAT e redução da ASAT muscular, são observadas (BARSE et al., 2006). Elevações nas atividades das enzimas ALAT, ASAT e LDH são reportados em músculo e fígado de pacu exposto ao fenol. No fígado, o aumento de lactato e glicose, agregado a elevação da LDH muscular, foram sugestivos de gliconeogênese hepática (FIGUEIREDO, 2008).

2.7 *ICTALURUS PUNCTATUS*

O bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (FIGURA 3) é um teleósteo de água doce, pertencente à família *Ictaluridae* e ordem Siluriformes, de origem do Golfo do México e do vale do Mississippi nos Estados Unidos e de províncias do Canadá e México (WELLBORN, 1988).

Esta espécie não apresenta escamas, possui barbilhões sensitivos, tem hábito alimentar onívoro e habita corpos de água com lama ou areia. Em época de reprodução, os cuidados parentais, como produção do ninho, aeração dos ovos e defesa contra predadores são realizadas pelo macho (WELLBORN, 1988).

No América do Norte, a criação do bagre do canal teve início na década de 60 e, atualmente, é considerada a espécie mais produzida na região, juntamente com o Salmão do atlântico. O bagre do canal está entre uma das espécies mais importantes comercialmente, ao lado da tilápia, do salmão do Atlântico e da truta arco-íris (FAO, 2006). Além disso, a espécie foi introduzida em quase todos os países do mundo que possuem piscicultura em desenvolvimento, incluindo o Brasil, onde despertou o interesse comercial, devido à qualidade da carne, rápido crescimento, fácil manejo e domesticação, alta resistência a condições ambientais adversas e fácil aceitação de ração comercial (SOUZA, 2005).



FIGURA 3: Representação do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*). Fonte: www.dec.ny.gov

3 JUSTIFICATIVA

O fenol é um xenobiótico que pode atingir corpos de águas naturais, impactar a biota aquática e provocar a ela danos em longo prazo. Além disso, o fenol pode afetar sistemas aquáticos, como os de criação artificial de peixes. Sob esta óptica, é pertinente a avaliação de espécies comerciais de peixes, como o bagre do canal; espécie de grande relevância em diversos países, inclusive no Brasil.

O bagre do canal é uma espécie bentopelágica, que vive a maior parte do tempo no fundo, sob o sedimento. Não há estudos que relatam sobre o efeito do fenol sobre espécies de fundo, tampouco sobre as suas respostas adaptativas diante deste estressor.

Dessa forma, o grau de contaminação pode ser avaliado, por exemplo, através de respostas adaptativas metabólicas e hematológicas. Seu grau de sensibilidade e sua natureza relativamente precoce frente a situações adversas permitem considerá-las ferramentas úteis ao monitoramento de poluentes e à avaliação da sanidade dos animais.

4 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos causados pelo fenol ambiental sobre o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) após 96 h de exposição e após a recuperação por 7 e 14 dias.

4.1. ESTRATÉGIAS EMPREGADAS

- a. Determinar a toxicidade aguda (CL50;96h) do fenol para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*);
- b. Avaliar os efeitos da exposição sub-letal ao fenol e da recuperação sobre as variáveis hematológicas;
- c. Avaliar os efeitos da exposição sub-letal ao fenol e da recuperação sobre o metabolismo intermediário;
- d. Avaliar os efeitos da exposição sub-letal ao fenol e da recuperação sobre as atividades das fosfatases ácida e alcalina, no fígado e músculo;
- e. Avaliar os efeitos da exposição sub-letal ao fenol e da recuperação sobre atividade da acetilcolinesterase cerebral e muscular.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Para a realização deste trabalho, foram utilizados exemplares jovens de *Ictalurus punctatus* (Teleostei: Ictaluridae) adquiridos da piscicultura Paulista, Piracicaba-SP, Brasil. Os peixes permaneceram em tanques de 250L e foram monitorados por três meses em um sistema aberto com temperatura de 26 ± 1 °C, pH $7 \pm 0,3$, oxigênio dissolvido $6,0 \pm 1,0$ mg L⁻¹ e aeração constante. Esse período destinou-se ao ganho de massa e comprimento pelos exemplares. Os peixes eram alimentados diariamente até a saciedade com ração comercial contendo 32% de proteína bruta.

5.2 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA – CL50;96h

Para a determinação da toxicidade aguda do fenol foi realizado um ensaio preliminar para estabelecer a maior concentração de fenol que causou nenhuma mortalidade e a menor concentração que causou 100% de mortalidade.

Para o teste preliminar, foram ensaiadas cinco concentrações de fenol (5, 10, 25, 35 e 50 mg L⁻¹) e o controle, por 96 horas, em um sistema semi-estático. Sessenta peixes ($9,25 \pm 1,92$ g e $9,79 \pm 0,82$ cm) foram divididos igualmente em seis tanques de 250L, onde ficaram aclimatados por uma semana antes do teste preliminar. A qualidade da água era monitorada diariamente (APHA, 1980) e os peixes eram alimentados até 24 h antecedentes ao teste. Durante o teste preliminar, as variáveis da qualidade da água eram monitoradas e o fenol e a água eram renovados a cada 12 horas. A mortalidade era contabilizada a cada 24 h. Com isso, pode-se determinar a menor concentração que causou mortalidade a 100% dos peixes e a concentração na qual não se observou letalidade.

Para o teste de toxicidade aguda definitivo, foram ensaiadas cinco concentrações de fenol (5, 10, 15, 20 e 30 mg L⁻¹) e o controle, por 96 horas. Cinquenta e quatro peixes ($15,7 \pm 0,8$ g; $12,2 \pm 0,2$ cm) foram divididos igualmente em 6 tanques de 250 L, e foram aclimatados por uma semana e alimentados diariamente. A alimentação foi suspensa 24

horas antes do teste até o final do experimento. O teste de toxicidade aguda foi realizado em um sistema semi-estático, com aeração constante, fotoperíodo natural, temperatura ($27,1 \pm 0,8$ °C), pH ($6,9 \pm 0,3$), oxigênio dissolvido ($6,1 \pm 1$ mg/L), concentração de amônia ($0,21 \pm 0,1$ mg/L) e nitrito ($0,07 \pm 0,08$ mg/L), dureza ($31,2 \pm 3$ mg CaCO₃) e alcalinidade ($5,4 \pm 1,8$ mg/L de HCO₃⁺) monitorados diariamente (APHA, 1980). A concentração de fenol e a água do sistema eram renovadas a cada 12 h e a mortalidade dos peixes era contabilizada a cada 24 h, para posterior cálculo da CL50;96h.

5.3 EXPOSIÇÃO SUB-LETAL AO FENOL

Para a exposição su-letal ao fenol, setenta e dois peixes ($42,7 \pm 10,6$ g; $16,6 \pm 1,3$ cm) foram divididos igualmente em 12 tanques de 250L, sendo 6 tanques controles e 6 expostos a 10% da CL50. O experimento ocorreu em duplicatas (FIGURA 4). Os animais foram aclimatados por uma semana e alimentados diariamente até a saciedade. Vinte e quatro horas antes da exposição, os peixes foram privados de alimento e permaneceram assim até o final do experimento. A suspensão da alimentação é igualmente observada em outros trabalhos (BEGUM, 2004, HORI et al, 2006, AVILEZ, 2008) com objetivo de evitar diferenças metabólicas devido a possíveis diferentes na taxa de alimentação.

O experimento ocorreu em sistema semi-estático, com renovação de água a cada 12h, aeração constante, qualidade de água monitorada (temperatura: $24 \pm 1,2$ °C, pH: $7,3 \pm 0,2$, dureza: $30,7 \pm 0,5$ mg CaCO₃, alcalinidade: $5,7 \pm 0,7$ mg L⁻¹ de HCO₃⁺, concentração de amônia: $0,3 \pm 0,1$ mg L⁻¹, nitrito: $0,08 \pm 0,05$ mg L⁻¹ e oxigênio dissolvido: $6,9 \pm 0,4$ mg L⁻¹) e reajuste da concentração de fenol a cada 12h (APHA, 1980). Os grupos controle foram submetidos ao mesmo protocolo.

Após o período de 96 h, seis peixes foram coletados de 2 tanques controle e 2 expostos aos fenol. Os outros 4 tanques controle e 4 expostos aos fenol passaram a receber água desprovida de fenol (FIGURA 4). Os animais eram anestesiados e o sangue foi coletado com seringas heparinizadas. Logo após, os peixes eram abatidos por secção medular e foi realizada a biometria. O fígado, o cérebro e uma porção de músculo branco eram rapidamente retirados, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C para as análises bioquímicas. As amostras de sangue eram divididas em diferentes alíquotas. O

plasma era obtido pela centrifugação (12000 x g por 3 min) de uma porção de sangue, sendo posteriormente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C.

5.4 RECUPERAÇÃO POR 7 E 14 DIAS

Após as 96 h de exposição ao fenol, os quatro tanques remanescentes do controle e quatro expostos ao fenol receberam água desprovida do xenobiótico, pela abertura do fluxo de água. Com isso, iniciou-se o experimento de recuperação. As variáveis da qualidade da água eram igualmente monitorados (26, 7 ± 0,1 °C, pH: 7,4 ± 0,09, alcalinidade: 6,7 ± 1 mg L⁻¹ de HCO₃⁺, dureza: 30,7 ± 1,7 mg CaCO₃, 7,07 ± 0,07 mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido, 0,05 ± 0,006 mg L⁻¹ de amônia e 0,02 ± 0,01 mg L⁻¹ de nitrito) (APHA, 1980) e o sistema era dinâmico (recirculação constante da água).

Após 7 dias de renovação de água desprovida de fenol, seis peixes foram coletados de 2 tanques controle e 2 tanques sob recuperação (FIGURA 4). Os mesmos procedimentos para coleta de sangue e tecidos foram realizados como no experimento de exposição ao fenol por 96 h.

Após 14 dias de renovação de água sem fenol, seis peixes eram coletados dos 2 tanques controle e 2 sob recuperação remanescentes (FIGURA 4). O abate e a coleta de tecidos e sangue procederam-se da mesma forma que nos experimentos anteriormente descritos.

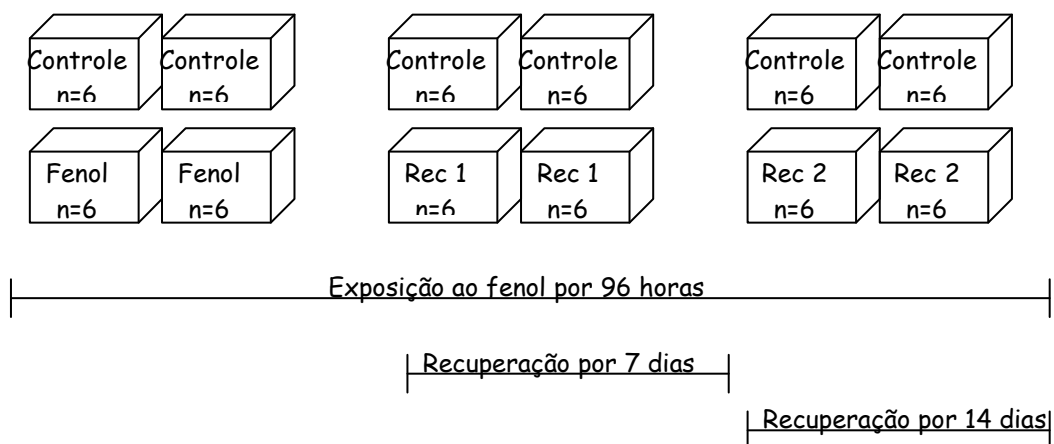


FIGURA 4: Esquema ilustrativo do desenho experimental da exposição ao fenol e das recuperações por 7 e 14 dias.

5.5 VARIÁVEIS DE QUALIDADE DA ÁGUA

Temperatura, oxigênio dissolvido e pH

As medidas de temperatura e de oxigênio dissolvido eram efetuadas através do aparelho Dissolved oxygen YSI 55 nos próprios tanques. O pH era mensurado pelo peagômetro Orion 710 através de amostras de água.

Dureza

A dureza da água era determinada segundo APHA (1980). As amostras de água coletada tamponada e com o indicador Ericromo negro T eram tituladas com EDTA até o ponto de viragem de rosa para azul. O cálculo da dureza, em mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, seguiu a fórmula:

$$\text{Dureza} = (\text{mL de EDTA}) \times [(0,01) \times (100,1) \times (1000)] / \text{volume da amostra}$$

Alcalinidade

A alcalinidade da água era mensurada segundo GOLDSTEIN e CLYMO (1969). O pH da amostra de água era verificado e, posteriormente, titulava-se a amostra com ácido sulfúrico 0,01N até o pH 4,00. Para o cálculo da alcalinidade, em mg L^{-1} de carbonatos e bicarbonatos, era utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Alcalinidade} = (\text{mL de H}_2\text{SO}_4) \times [(0,01 \times 50\,000)] / \text{volume da amostra}$$

Amônia

A concentração de amônia era mensurada pelo método modificado de GENTZKOW e MASEN (1942). Em 2mL de amostra de água era adicionado 0,5mL de reativo Nessler. Após 30 minutos, era feita leitura em 420nm em um espectrofotômetro HACH modelo DR2010. A concentração de amônia era estimada contra um padrão de amônia de 50 nmoles.

Nitrito

A concentração de nitrito era mensurada segundo TAVARES (1994). Em 5mL de amostra eram adicionados 100 μ L de sulfanilamida (58,07mM) com posterior agitação e descanso por 10 minutos. Passado este período, eram adicionados 100 μ L de solução de bicloridrato N-1 naftileno diamina (5,8mM) para posterior leitura em 540nm através de espectrofotômetro. A concentração de nitrito era estimada contra um padrão de nitrito de 10 nmoles.

Fenol

As concentrações de fenol na água eram mensuradas segundo APHA (1980). Em 100 mL de amostra eram adicionados 2,5 mL de NH₄OH 0,5N com posterior ajuste do pH para 7,9 com tampão fosfato. Logo após, 1 mL de 4-aminoantipitina e 1 mL de ferricianeto de potássio eram adicionados a mistura. O produto final era lido em espectrofotômetro em 500nm contra um branco contendo água destilada.

5.6 VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS***Hematócrito (Hct)***

O hematócrito era determinado através da utilização de micro-capilares, que depois de preenchidos com amostra de sangue eram vedados e centrifugados a 12 000 x g por 3 min. Um cartão de leitura de hematócrito era utilizado para a determinação do seu valor, em porcentagem.

Hemoglobina total (Hb total)

A hemoglobina total era determinada segundo DRABKIN (1948). Para isso, 10 μ L de sangue da amostra eram adicionados 2mL de solução Drabkin. A densidade óptica era mensurada em 540nm, contra um branco contendo apenas solução de Drabkin.

Contagem de células vermelhas (RBC)

Para a contagem das células vermelhas (em mm^3), 10 μL de sangue da amostra eram adicionados a 2mL de solução de citrato formol. A contagem procedia-se em microscópio óptico com a câmara de Neubauer.

Índices hematimétricos

O volume corpuscular médio (VCM) foi calculado como $\text{Hct} \cdot 10 / \text{RBC}$; a hemoglobina corpuscular média (HCM) foi calculada como $\text{Hb total} \cdot 10 / \text{RBC}$; e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) como $\text{Hb total} \cdot 10 / \text{Hct}$.

5.7 INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS***Homogeneizado celular***

Uma porção previamente determinada de fígado (50 mg aproximadamente) e músculo branco (100 mg aproximadamente) eram homogeneizados em um homogeneizador IKA[®] T10 Basic Ultra-Turrax a 1000 rpm por 1 minuto em banho de gelo seguido da adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% ou água. O homogeneizado era centrifugado por 3 minutos a 12000 x g e a 4°C e o sobrenadante era utilizado para as determinações metabólicas.

Para as determinações plasmáticas, uma alíquota previamente determinada de plasma (100 μL aproximadamente) era misturada a 1mL de TCA 20% ou utilizava-se o plasma total.

Amônia

A amônia era determinada segundo GENTZKOW e MASEN (1942). Em uma alíquota do extrato, homogeneizada com TCA 20%, era adicionados água destilada, para um volume final de 2mL e 0,5mL de reativo de Nessler. A leitura era feita em 420nm em espectrofotômetro e as amostras eram comparadas a um padrão de amônia.

Lactato

A determinação de lactato era feita segundo HARROWER e BROWN (1972), onde uma porção da amostra, homogeneizada em TCA 20%, recebia 20 μ L de CuSO₄ 4% e 3,5mL de H₂SO₄ PA. Os tubos eram agitados e incubados a 100 °C por 5 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, eram adicionados 80 μ L de p-fenilfenol. Depois do repouso de 1 hora, a mistura era incubada, novamente, a 100°C por 40 segundos. Depois do resfriamento em banho de gelo, as amostras eram lidas em espectrofotômetro, em 570nm, contra um padrão de lactato.

Piruvato

O piruvato era determinado segundo LU (1939), onde a um volume de amostra, homogeneizada com TCA 20%, eram adicionado 250 μ L de dinitrofenilhidrazina 0,1% (em HCl 2N). Depois de 30 minutos em banho-maria a 37°C, eram adicionados à mistura 3 mL de NaOH 1,3N. A leitura era estimada em espectrofotômetro em 440nm. As concentrações de piruvato eram determinadas a partir de um padrão conhecido de piruvato.

Glicose

Para a determinação de glicose era utilizado o Kit LabTest. Uma alíquota de 10 μ L da amostra, homogeneizada em água, mais 190 μ L do reagente fornecido pelo Kit eram pipetados em uma “microplate”. Depois de incubados a 37°C por 10 minutos, era feita a leitura em espectrofotômetro em 525nm através de um “microplate reader” (Termomax®, Molecular devices). O padrão de glicose utilizado era de 400 mg dL⁻¹.

Proteína

Para a determinação de proteína, uma alíquota de 10 μ L da amostra, homogeneizada em água, mais 190 μ L do reagente Bradford eram pipetados em uma “microplate”. Depois de incubados a temperatura ambiente, no escuro por 10 minutos, era feita a leitura em espectrofotômetro em 620nm através de um “microplate reader” (Termomax®, Molecular devices). As amostras eram comparadas a um padrão de albúmina a 1mg/ml H₂O.

Triglicerídeos

Para a determinação de triglicerídeos, era utilizado o Kit Liquiform. Em uma alíquota de 10 μ L de amostra, homogeneizada em água, eram adicionados 190 μ L de um reativo fornecido pelo Kit. Ambos eram pipetados em um microplate e incubados a 37°C por 10 minutos. A leitura ocorria em espectrofotômetro em 525nm através de “microplate reader” (Termomax®, Molecular devices). O padrão de triglicerídeos utilizado era a uma concentração de 200 mg dL⁻¹.

Aminoácidos livres

A determinação de aminoácidos livres era realizada segundo COPLEY (1941). Em uma alíquota de extrato da amostra, homogeneizada em água, eram adicionados 2mL de nihidrina 0,1% (em álcool isopropílico) que eram posteriormente vedados e incubados por 40 minutos a 40°C. Depois de os tubos serem centrifugados por 2 minutos a 3000rpm, era feita leitura em 570nm em espectrofotômetro contra um padrão de glicina.

Ácidos graxos livres

A determinação de ácidos graxos livres era feita segundo o método modificado de MILAN (1965). Em um volume apropriado de amostra, homogeneizada em água, eram adicionados 2 mL de solução extratora DOLE (heptano, álcool isopropílico e H₂SO₄ 1N na proporção de 1: 4: 0,1) e agitadas em vórtex por 20 segundos. Posteriormente, eram adicionadas a mistura 1 mL de heptano e 2 mL de água destilada. Depois de agitar por inversão lentamente, os tubos eram centrifugados a 3000rpm por 3 minutos. Seiscentos micro-litros do sobrenadante eram retirados e transferidos para outro tubo. Neste sobrenadante eram adicionados 800 μ L de heptano/clorofórmio (1:6) e 1 mL de reagente cobalto. Então, a mistura era agitada no vórtex por 30 segundos e centrifugada a 3000rpm por 3 minutos. A seguir, 600 μ L do sobrenadante eram retirados e transferidos para outro tubo, onde recebiam mais 600 μ L de indicador (0,4% de α -nitroso- β - nftal em etanol 96°). Após 15 minutos, era feita leitura em espectrofotômetro em 500nm. As amostras eram lidas contra um padrão de ácido palmítico a 4mM.

Glicogênio

A concentração de glicogênio era estimada pela concentração de açúcares redutores totais na amostra. Para tanto, seguiu-se o método descrito por BIDINOTTO e col. (1997). Porções do músculo branco e fígado eram pesadas e transferidas para tubos de ensaio, onde recebiam 1mL de KOH 6N. Posteriormente, os tubos eram incubados em banho-maria a 100°C por 5 minutos ou até o tecido ficar dissolvido, a fim de garantir a digestão alcalina do tecido. Dessa mistura, 250µL eram retirados e transferidos para outro tubo de ensaio, onde eram adicionados 3mL de etanol PA e 100µL de K₂SO₄. Depois de agitados, descartava-se o sobrenadante invertendo o tubo. O precipitado era ressuspenso e a ele, adicionados 2,5mL de água destilada.

O método de DUBOIS e col. (1956) era utilizado para a determinação de açúcares redutores totais onde, em uma alíquota do homogeneizado, eram adicionados 0,5 mL de fenol e 2mL de H₂SO₄. Efetuava-se a leitura em espectrofotômetro a 480nm, contra um padrão conhecido de glicose. As concentrações de glicose eram expressas em µmols de glicosil-glicose g de tecido⁻¹.

5.8 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Homogeneizado celular

Uma porção previamente determinada de músculo branco (200 mg aproximadamente), fígado (50 mg aproximadamente) e cérebro (50 mg aproximadamente) eram homogeneizados a 4 °C em tampão Glicerina/Fosfato 20mM (pH 7). Os homogeneizados eram centrifugados duas vezes (600 x g por 3min; 6000 x g por 8min, ambos a 4 °C) e o sobrenadante final era utilizado para os ensaios enzimáticos.

Lactato desidrogenase (LDH)

A atividade enzimática de LDH era ensaiada por cinética nos homogeneizados de músculo branco e fígado (HOCHACHKA et al., 1978). Resumidamente, a determinação consistia da transformação de piruvato 30mM em lactato observando-se a extinção de NADH+H⁺ em 340nm. A atividade da LDH foi expressa em unidades (UI) por miligrama de proteína. Uma UI foi definida como 1μmol de NADH hidrolisado por minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 0,85510/mM.cm.

Alanina aminotransferase (ALAT)

A atividade de ALAT era determinada em fígado e músculo, pelo método de cinética (BERGMEYER et al., 1978). Essa determinação consistia na transaminação de alanina (500mM) e α-cetoglutarato (200mM), em tampão Tris (100mM) pH 7,5, com a formação de piruvato e posterior redução a lactato através de LDH exógena (0,1UI) determinando-se a extinção de NADH+H⁺ em 340nm. A atividade da ALAT foi expressa em unidades (UI) por miligrama de proteína. Uma UI foi definida como 1μmol de NADH hidrolisado por minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 0,85510/mM.cm.

Aspartato aminotransferase (ASAT)

A atividade de ASAT era determinada em fígado e músculo, pelo método de cinética (BERGMEYER et al., 1978). Essa determinação consistia na transaminação de aspartato (220mM) e α-cetoglutarato (200mM), em tampão Tris (80mM) pH 7,8, com a formação de oxaloacetato e posterior redução a malato através de MDH exógena (0,1UI) determinando-se a extinção de NADH+H⁺ em 340nm. A atividade ASAT foi expressa em unidades (UI) por miligrama de proteína. Uma UI foi definida como 1μmol de NADH hidrolisado por minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 0,85510/mM.cm.

Fosfatase ácida (FAC)

A atividade da fosfatase ácida era determinada colorimetricamente (MOSS apud BERGMEYER e BEACH, 1983) no tecido muscular e hepático pela hidrólise de p-nitrofenilfosfato 120mM. A reação foi processada em tampão citrato de sódio 50mM pH 5,0. A reação era interrompida pela adição de hidróxido de sódio 2M e o teor de p-nitrofenol era determinado em 405nm. A atividade da fosfatase ácida foi expressa em unidades (UI) por miligrama de proteína. Uma UI foi definida como 1µmol de paranitrofenilfosfato hidrolisado por minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 18200/M.cm.

Fosfatase alcalina (FALC)

A atividade da fosfatase alcalina era determinada colorimetricamente (BRETAUDIÈRE e SPILMAN apud BERGMEYER e BEACH, 1983) no tecido muscular e hepático pela hidrólise de p-nitrofenilfosfato 120mM. A mistura de reação continha: tampão glicina 50mM pH 8,5 e MgCl 10mM. A reação era interrompida pela adição de hidróxido de sódio 2M e o teor de p-nitrofenol era determinado em 405nm. A atividade da fosfatase alcalina foi expressa em unidades (UI) por miligrama de proteína. Uma UI foi definida como 1µmol de paranitrofenilfosfato hidrolisado por minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 18200/M.cm.

Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da acetilcolinesterase era determinada por cinética (ELLMAN, 1961) no tecido muscular e no cérebro através da hidrólise da acetiltiocolina 37,5 mM, em 412 nm. A mistura da reação era composta por tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico 100mM pH 7,5 e ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 6,4mM. A atividade da acetilcolinesterase foi expressa em unidades (UI) por miligrama de proteína. Uma UI foi definida como 1µmol de 5-tio-2-nitrobenzoato formado por minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 16,950/mM.cm.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística da CL50 foi realizada através do software “Trimmed Spearman-Kärber” “LC50 Programs JSPEAR” (HAMILTON et al., 1978), com 95% de confiança ($P < 0,05$). Os dados dos intermediários, enzimas e os dados e índices hematológicos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. As médias dos grupos controle e exposto ao fenol, controle e recuperação de 7 dias e grupo controle e recuperação de 14 dias foram comparadas por um teste paramétrico (teste t de *Student*) com intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$). As variáveis estão expressas como média \pm desvio padrão de 12 indivíduos ($n=12$).

6 RESULTADOS

6.1 TOXICIDADE AGUDA DO FENOL PARA O BAGRE DO CANAL

Para as concentrações ensaiadas (0, 5, 10, 25, 35 e 50 mg L⁻¹ de fenol), observou-se que a concentração mínima de fenol que promoveu a mortalidade total dos peixes do ensaio foi 25 mg L⁻¹ e a concentração máxima que não provocou mortalidade dos peixes foi 5 mg L⁻¹ (TABELA 1).

No teste definitivo de toxicidade aguda foi estimada a CL50;96h de fenol de 15,08 mg L⁻¹ para o bagre do canal, com limite inferior de concentração de 12,67 mg L⁻¹ e limite superior de 17,96 mg L⁻¹ (FIGURA 5). No controle e na concentração de 5 mg L⁻¹ não houve mortalidade dos animais. Apenas um peixe morreu na concentração de 10 mg L⁻¹, após 72 h. Na concentração de 15 mg L⁻¹, dois peixes morreram após 24 h e um peixe morreu após 72 h. Na concentração de 20 mg L⁻¹, oito peixes morreram após 24 h e todos os peixes morreram na concentração de 30 mg L⁻¹ após 24h (TABELA 2). A concentração de fenol utilizada para a exposição sub-letal em todos os experimentos foi de 10% da CL50;96h, ou seja, 1,5 mg L⁻¹ (FIGURA 5).

TABELA 1– Mortalidade de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) submetido a teste preliminar de toxicidade aguda (n=10).

Concentração de fenol (mg L ⁻¹)	Mortalidade final	Mortalidade final (%)
0	0	0
5	0	0
10	2	20
25	10	100
35	10	100
50	10	100

TABELA 2 – Mortalidade de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) submetido a teste definitivo de toxicidade aguda (n=9).

Concentração de fenol (mg L ⁻¹)	Mortalidade final	mortalidade final (%)
0	0	0
5	0	0
10	1	11,11
15	3	33,33
20	8	88,88
30	9	100

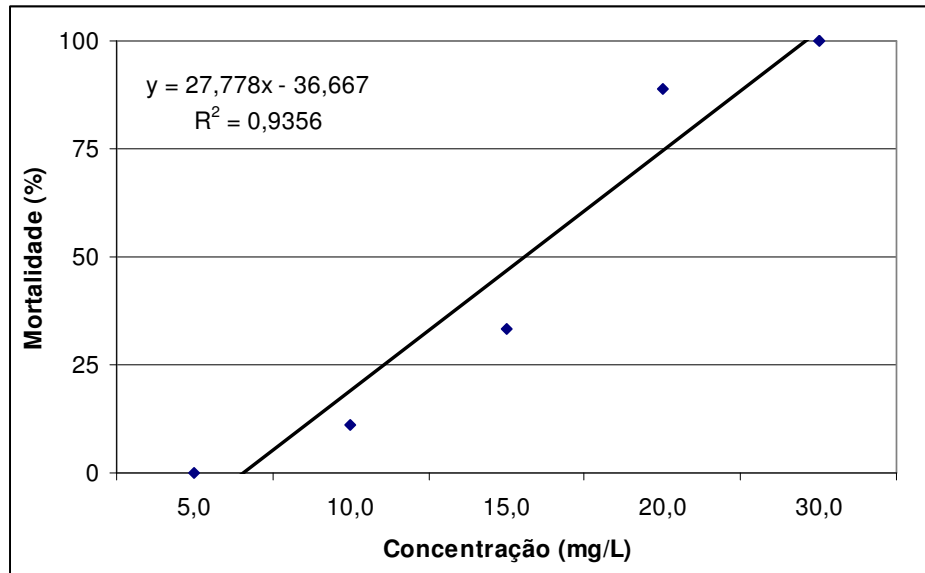


FIGURA 5- Relação concentração de fenol e mortalidade de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) durante o teste de toxicidade aguda.

6.2 VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS

As médias e desvios-padrão das variáveis hematológicas estão apresentados na TABELA 3.

Hematócrito – Hct

O hematócrito de bagre do canal exposto ao fenol não apresentou alteração significativa em relação ao controle. Os peixes da recuperação por 7 e 14 dias igualmente não apresentaram alteração no hematócrito.

Hemoglobina total – Hb total

A hemoglobina total de bagre do canal exposto ao fenol não alterou significativamente em relação ao controle. Os peixes da recuperação por 7 e 14 dias igualmente não apresentaram alteração na hemoglobina total.

Contagem de células vermelhas – RBC

A contagem de células vermelhas do grupo exposto ao fenol não apresentou diferença significativa. Entretanto, os peixes da recuperação por 7 dias apresentaram aumento significativo no RBC em 28,1%. O RBC dos peixes da recuperação por 14 dias permaneceu constante.

Volume corpuscular médio – VCM

O Volume corpuscular médio dos animais expostos ao fenol não apresentou diferença em relação ao controle. No entanto, o VCM dos peixes da recuperação por 7 dias reduziu 24%. Nenhuma alteração no VCM foi verificada nos animais submetidos à recuperação por 14 dias.

Hemoglobina corpuscular média – HCM

Nos peixes expostos ao fenol, a hemoglobina corpuscular média não apresentou alteração significativa em relação ao controle. Contudo, o HCM reduziu significativamente 25,5% nos peixes da recuperação por 7 dias. Nenhuma alteração significativa foi observada nos animais da recuperação por 14 dias.

Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

A concentração de hemoglobina corpuscular média nos animais expostos ao fenol, e nos igualmente expostos ao fenol e submetidos a recuperação por 7 e 14 dias, não apresentou alteração significativa em relação ao controle.

TABELA 3: Médias e desvios-padrão das variáveis hematológicas do bagre do canal após exposição ao fenol e recuperação por 7 e 14 dias.

Variável	Condição					
	Controle	Fenol	Controle	Recuperação 1	Controle	Recuperação 2
Htc	25,813 ± 3,0	25,194 ± 2,1	23,285 ± 2,0	22,778 ± 2,4	21,653 ± 2,7	23,553 ± 4,8
Hb total	6,753 ± 0,5	7,28 ± 0,7	6,561 ± 0,7	6,149 ± 0,5	5,909 ± 0,7	5,586 ± 1,0
RBC	2,495 ± 0,2	2,549 ± 0,2	2,051 ± 0,3	2,628 ± 0,2 *	2,007 ± 0,4	2,001 ± 0,4
VCM	104,21 ± 15,3	100,06 ± 9,2	114,77 ± 9,5	87,170 ± 14,4 *	107,33 ± 14,5	116,24 ± 21,8
HCM	27,27 ± 3,1	28,742 ± 3,6	31,626 ± 2,3	23,536 ± 2,2 *	30,753 ± 2,8	27,545 ± 4,9
CHCM	2,72 ± 0,3	2,935 ± 0,4	2,779 ± 0,1	2,723 ± 0,2	2,881 ± 0,6	2,423 ± 0,4

Htc (hematócrito) está expresso em %; Hb total (hemoglobina total) está expresso em g 100mL⁻¹; RBC (contagem de células vermelhas) está expresso em 10⁶ de células/mm³; VCM (volume corpuscular médio) está expresso μmm³; HCM (hemoglobina corpuscular média) está expressa em pg célula⁻¹; CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) está expressa em g dL⁻¹; (*) indica diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$.

6.3 METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

6.3.1 FÍGADO

As médias e desvios-padrão dos intermediários metabólicos do fígado estão apresentados na TABELA 4.

Amônia

A concentração de amônia no fígado dos animais expostos ao fenol não alterou em relação ao controle. Entretanto, o teor de amônia hepática dos peixes da recuperação por 7 dias apresentou aumento significativo de 35,6%. A amônia hepática dos animais submetidos à recuperação por 14 dias não apresentou alteração significativa em relação ao controle.

Proteína

Os teores de proteína hepática reduziram significativamente 8,7% nos animais expostos ao fenol e 10% nos peixes da recuperação por 7 dias. O grupo submetido à recuperação por 14 dias não apresentou alteração na concentração de proteína hepática.

Aminoácidos livres

A concentração de aminoácidos livres do fígado dos peixes submetidos à exposição sub-letal de fenol e à recuperação por 7 e 14 dias não alterou significativamente em relação aos seus respectivos controles.

Glicogênio

Após 96 h de exposição ao fenol, os animais apresentaram aumento de 16,3% da concentração de glicogênio hepático em relação ao controle. Os peixes da recuperação por 7 dias igualmente apresentaram elevação significativa no teor de glicogênio no fígado, sendo este aumento de 30,3%. Todavia, no grupo da recuperação por 14 dias, verificou-se redução significativa de 25% do teor de glicogênio neste tecido.

Glicose

Nos peixes expostos ao fenol por 96 h, a concentração de glicose no fígado não apresentou alteração significativa em relação ao controle. Após a recuperação por 7 dias, foi observado um aumento significativo de 7,6% na concentração de glicose. Entretanto, após a recuperação por 14 dias, a concentração de glicose hepática não alterou em relação ao controle.

Piruvato

As concentrações de piruvato no fígado dos peixes expostos ao fenol e dos animais recuperados por 7 dias não variaram em relação ao controle. Todavia, a concentração de piruvato elevou-se significativamente 23,2% nos animais da recuperação por 14 dias.

Lactato

A concentração de lactato hepático nos peixes expostos à concentração sub-letal de fenol não variou em relação ao controle. Os animais da recuperação por 7 e 14 dias igualmente não apresentaram alteração nos teores de lactato hepático.

Triglicerídeos

O teor de triglicerídeos no fígado dos peixes expostos ao fenol por 96 h não apresentou alteração significativa em relação ao seu controle. Nos peixes da recuperação por 7 dias verificou-se redução significativa de 47,3% na concentração de triglicerídeos hepáticos. O mesmo não ocorreu com o grupo submetido à recuperação por 14 dias, já que não se observou alteração significativa de triglicerídeos neste tecido.

Ácidos graxos livres

O grupo exposto ao fenol apresentou redução significativa de 30,6% na concentração de ácidos graxos no fígado. Após a recuperação por 7 e 14 dias, nenhuma alteração no teor de ácidos graxos foi verificada neste tecido em relação aos seus respectivos controles.

TABELA 4: Médias e desvios-padrão dos intermediários metabólicos de fígado do bagre do canal após exposição ao fenol e após recuperação por 7 e 14 dias.

Variável	Condição					
	Controle	Fenol	Controle	Recuperação 1	Controle	Recuperação 2
Amônia	47,133 ± 8,7	50,854 ± 10,4	57,848 ± 7,4	78,473 ± 7,1 *	56,236 ± 11,6	61,501 ± 10,1
Proteína	87,5 ± 4,4	79,9 ± 2,8 *	127,1 ± 0,1	114,4 ± 6,7 *	152,6 ± 11,8	141,4 ± 15,7
Aminoácidos	36,816 ± 3,4	35,944 ± 2,1	44,006 ± 3,7	42,545 ± 4,6	40,173 ± 3,5	41,326 ± 1,4
Glicogênio	235,84 ± 43,0	274,44 ± 39,0*	94,11 ± 21,1	122,60 ± 32,7 *	62,86 ± 14,1	47,18 ± 8,2 *
Glicose	62,448 ± 4,4	66,151 ± 4,2	54,915 ± 4,2	59,134 ± 4,5 *	53,081 ± 7,0	47,161 ± 9,1
Piruvato	0,725 ± 0,0	0,741 ± 0,1	0,940 ± 0,1	0,876 ± 0,0	0,819 ± 0,1	1,009 ± 0,2 *
Lactato	10,754 ± 1,8	10,272 ± 1,8	7,139 ± 2,2	6,063 ± 0,7	4,423 ± 0,9	5,211 ± 1,2
Triglicerídeos	2,661 ± 0,3	2,516 ± 0,5	13,839 ± 3,9	7,290 ± 2,7 *	16,073 ± 6,0	18,400 ± 8,3
Ácidos graxos	9,861 ± 2,2	6,780 ± 1,8 *	26,837 ± 9,1	21,484 ± 7,8	34,937 ± 11,0	29,991 ± 6,8

As concentrações de proteína estão expressas em mg de proteína g de tecido⁻¹; as concentrações de glicogênio estão expressas em μmol de glicosil-glicose g de tecido⁻¹; os demais intermediários estão expressos em μmol g de tecido⁻¹. (*) indica diferença significativa p<0,05.

6. 3.2 PLASMA

As médias e desvios-padrão da concentração dos intermediários metabólicos do plasma estão apresentados na TABELA 5.

Amônia

A concentração de amônia plasmática não alterou nos peixes expostos ao fenol por 96 h e nos animais de recuperação por 7 dias. Contudo, aumento significativo de 31,8% na concentração de amônia pode ser observado no plasma dos peixes submetidos à recuperação por 14 dias.

Proteína

A concentração de proteína no plasma reduziu significativamente 11,5% nos peixes expostos ao fenol e 25,7% nos peixes da recuperação por 7 dias. Nenhuma alteração foi observada na concentração de proteína plasmática dos animais da recuperação por 14 dias.

Aminoácidos livres

Nos peixes expostos ao fenol, a concentração de aminoácidos plasmáticos reduziu significativamente 7,7% em relação ao controle. Entretanto, nos animais da recuperação por 7 e 14 dias não foram observadas alterações nesta variável.

Glicose

Os valores de glicose plasmática não variaram ao longo do período experimental, que compreende a exposição por 96 h e as recuperações por 7 e 14 dias.

Lactato

A concentração de lactato plasmático reduziu significativamente 19% nos animais expostos ao fenol. Após a recuperação por 7 dias, os peixes apresentaram aumento significativo de 27,3% no lactato plasmático. No grupo submetido à recuperação por 14 dias não se observou alteração nesta variável.

Piruvato

Os valores de concentração de piruvato plasmático não variaram ao longo do período experimental (exposição ao fenol e recuperação por 7 e 14 dias).

Triglicerídeos

O teor de triglicerídeos no plasma dos peixes expostos ao fenol reduziu significativamente 14,7%. Nas recuperações por 7 e 14 dias, não foram observadas alterações nesta variável.

Ácidos graxos livres

A concentração de ácidos graxos plasmática foi medida somente após a exposição de fenol por 96 h. Neste, o teor de ácidos graxos reduziu significativamente 17,7% em relação ao controle.

TABELA 5: Médias e desvios-padrão dos intermediários metabólicos de plasma do bague do canal após exposição ao fenol e recuperação por 7 e 14 dias.

Variável	Condição					
	Controle	Fenol	Controle	Recuperação 1	Controle	Recuperação 2
Amônia	1,423 ± 0,1	1,374 ± 0,1	2,516 ± 0,1	2,647 ± 0,5	1,653 ± 0,2	2,178 ± 0,3 *
Proteína	31,527 ± 3,1	27,885 ± 1,7 *	20,401 ± 3,9	15,159 ± 3,1 *	13,171 ± 2,3	11,922 ± 3,3
Aminoácidos	5,247 ± 0,4	4,841 ± 0,2 *	4,581 ± 0,3	4,488 ± 0,4	4,112 ± 0,3	4,037 ± 0,5
Glicose	2,255 ± 0,2	2,181 ± 0,4	1,524 ± 0,3	1,832 ± 0,7	1,406 ± 0,2	1,377 ± 0,3
Piruvato	0,297 ± 0,03	0,298 ± 0,02	0,240 ± 0,04	0,252 ± 0,02	0,222 ± 0,02	0,221 ± 0,04
Lactato	3,437 ± 0,7	2,810 ± 0,4 *	2,972 ± 0,9	3,784 ± 0,4 *	2,882 ± 0,7	3,432 ± 1,08
Triglicerídeos	2,454 ± 0,3	2,092 ± 0,2 *	2,316 ± 0,2	2,310 ± 0,1	1,924 ± 0,3	1,847 ± 0,1
Ácidos graxos	0,750 ± 0,08	0,617 ± 0,06 *				

As concentrações de proteína estão expressas em mg de proteína mL de plasma⁻¹; os demais intermediários estão expressos em μmol mL de plasma⁻¹. (*) indica diferença significativa p<0,05.

6.3.3 MÚSCULO BRANCO

As médias e desvios-padrão dos intermediários metabólicos do músculo branco estão apresentados na TABELA 6.

Amônia

Após 96 h de exposição ao fenol, foi observado um aumento significativo de 7,7% na concentração amônia muscular nos peixes. Nos peixes da recuperação por 7 e 14 dias não se observou alteração significativa na concentração deste intermediário.

Proteína

A concentração de proteína muscular nos peixes expostos o fenol reduziu significativamente 5,7% em relação ao controle. Após a recuperação por 7 dias, não se observou alteração nesta variável mas, após 14 dias de recuperação, o teor de proteína muscular reduziu significativamente 9,2%.

Aminoácidos livres

Após a exposição ao fenol e a recuperação por 7 dias, a concentração de aminoácidos livres no músculo não alterou em relação ao controle. Todavia, nos peixes da recuperação por 14 dias, a concentração de aminoácidos reduziu 17,6% neste tecido.

Glicogênio

A concentração de glicogênio muscular não alterou nos peixes após exposição por 96 h e recuperação por 7 dias. Contudo, nos animais em recuperação por 14 dias, o glicogênio muscular apresentou redução significativa de 4,5% em relação ao controle.

Glicose

A concentração de glicose muscular reduziu significativamente 21,3% nos peixes expostos ao fenol. Os peixes em recuperação por 7 e 14 dias não apresentaram alteração na glicose muscular.

Piruvato

O teor de piruvato muscular não alterou após 96 h de exposição ao fenol. No entanto, após 7 dias de recuperação observou-se redução significativa de 12,1% de piruvato muscular. Nos peixes da recuperação por 14 dias, o piruvato muscular permaneceu constante.

Lactato

Após a exposição ao fenol por 96 h e recuperação por 7 e 14 dias, não se observou alteração do lactato muscular.

Triglicerídeos

O teor de triglicerídeos no músculo branco reduziu significativamente 17,2% após 96 h de exposição ao fenol. Nas recuperações por 7 e 14 dias, não foram verificadas alterações significativas de triglicerídeos neste tecido.

Ácidos graxos livres

Após a exposição sub-letal ao fenol, a concentração de ácidos graxos de músculo aumentou significativamente 27,7%. Os peixes da recuperação por 7 dias apresentaram aumento significativo de 22,1% e os da recuperação por 14 dias, aumento de 17,2% no teor de ácidos graxos.

TABELA 6: Médias e desvios-padrão dos intermediários metabólicos de músculo branco do bagre do canal após exposição ao fenol e recuperação por 7 e 14 dias.

Variável	Condição					
	Controle	Fenol	Controle	Recuperação 1	Controle	Recuperação 2
Amônia	19,471 ± 2,0	20,979 ± 1,1 *	17,240 ± 0,7	17,110 ± 1,2	16,468 ± 1,2	16,036 ± 2,1
Proteína	32,281 ± 1,6	30,434 ± 2,5 *	49,715 ± 3,7	48,151 ± 3,9	59,513 ± 3,3	54,037 ± 3,8 *
Aminoácidos	8,796 ± 0,5	8,653 ± 1,1	14,189 ± 0,6	15,106 ± 1,7	14,188 ± 2,6	11,692 ± 1,09 *
Glicogênio	8,358 ± 1,5	7,845 ± 0,2	13,973 ± 1,06	14,371 ± 0,7	13,598 ± 0,4	12,973 ± 0,8 *
Glicose	1,144 ± 0,2	0,900 ± 0,1 *	1,153 ± 0,2	1,194 ± 0,1	1,207 ± 0,2	1,081 ± 0,2
Piruvato	0,6352 ± 0,1	0,6163 ± 0,08	0,676 ± 0,08	0,594 ± 0,1 *	0,5335 ± 0,1	0,5704 ± 0,1
Lactato	22,5 ± 2,8	23,556 ± 2,3	22,848 ± 1,4	21,273 ± 2,1	18,815 ± 3,05	18,650 ± 3,4
Triglicerídeos	2,395 ± 0,4	1,981 ± 0,3 *	1,128 ± 0,1	1,087 ± 0,1	1,151 ± 0,1	1,090 ± 0,1
Ácidos graxos	0,408 ± 0,06	0,521 ± 0,07 *	0,705 ± 0,1	0,861 ± 0,1 *	0,703 ± 0,1	0,960 ± 0,1 *

As concentrações de proteína estão expressas em mg de proteína g de tecido⁻¹; as concentrações de glicogênio estão expressas em μmol de glicosil-glicose g de tecido⁻¹; os demais intermediários estão expressos em μmol g de tecido⁻¹. (*) indica diferença significativa p<0,05.

6.3.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

6.3.4.1 Fígado

Alanina aminotransferase – ALAT

A atividade específica da ALAT aumentou significativamente 35,5% no fígado dos peixes expostos por 96 h ao fenol. Os animais em recuperação por 7 dias não apresentaram alteração na atividade desta enzima, entretanto, naqueles em recuperação por 14 dias, observou-se redução da atividade de 23,2% em relação ao controle. As médias e desvios-padrão da atividade específica da ALAT hepática estão apresentados na FIGURA 6.

Aspartato aminotransferase – ASAT

Após a exposição ao fenol, verificou-se aumento significativo de 24% na atividade da ASAT. Após as recuperações por 7 e 14 dias, não foram observadas alterações na atividade desta enzima no fígado. As médias e desvios-padrão da atividade específica da ASAT hepática estão apresentados na FIGURA 7.

Lactato desidrogenase – LDH

A atividade da LDH hepática aumentou significativamente 26% nos peixes expostos ao fenol. Nos animais em recuperação por 7 e 14 dias não se observou alteração da atividade desta enzima no fígado. As médias e desvios-padrão da atividade específica da LDH hepática estão apresentados na FIGURA 8.

Fosfatase ácida – FAC

Após a exposição ao fenol e recuperação por 14 dias, não se observou alteração significativa na atividade da FAC hepática. Contudo, nos peixes em recuperação por 7 dias, verificou-se aumento significativo de 23% na atividade específica desta enzima. As médias e desvios-padrão da atividade específica da FAC hepática estão apresentados na FIGURA 9.

Fosfatase alcalina – FALC

Os valores da atividade da FALC hepática apresentaram-se elevados 21,2% e 5,7% após exposição ao fenol e recuperação por 7 dias, respectivamente. Nenhuma alteração da atividade desta enzima foi observada na recuperação por 14 dias. As médias e desvios-padrão da atividade específica da FALC hepática estão apresentados na FIGURA 10.

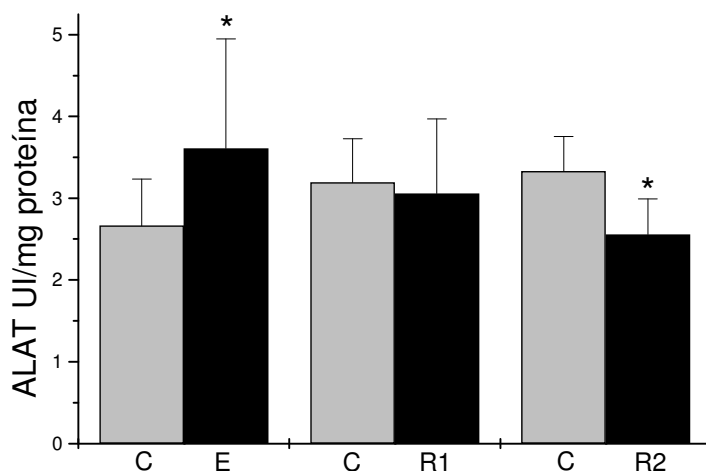


FIGURA 6: Atividade específica da ALAT hepática (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

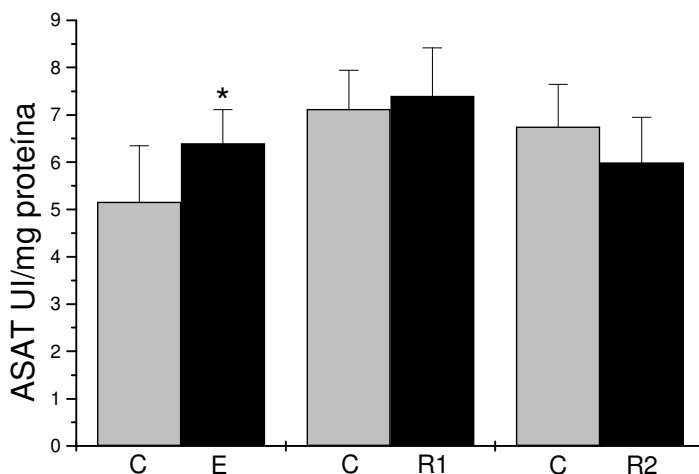


FIGURA 7: Atividade específica da ASAT hepática ($\text{UI mg de proteína}^{-1}$) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

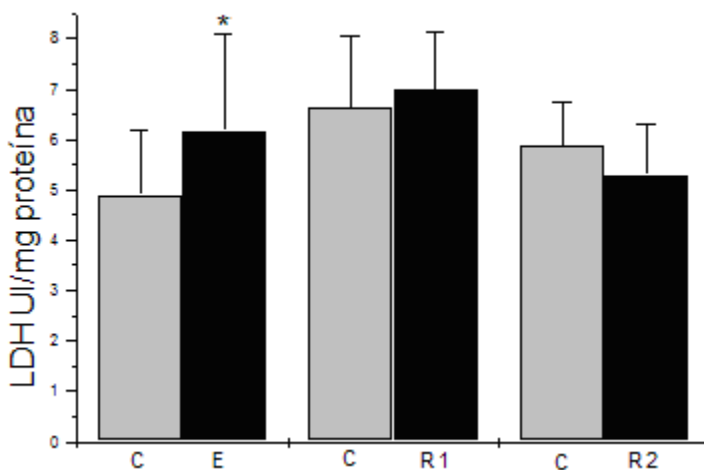


FIGURA 8: Atividade específica da LDH hepática ($\text{UI mg de proteína}^{-1}$) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

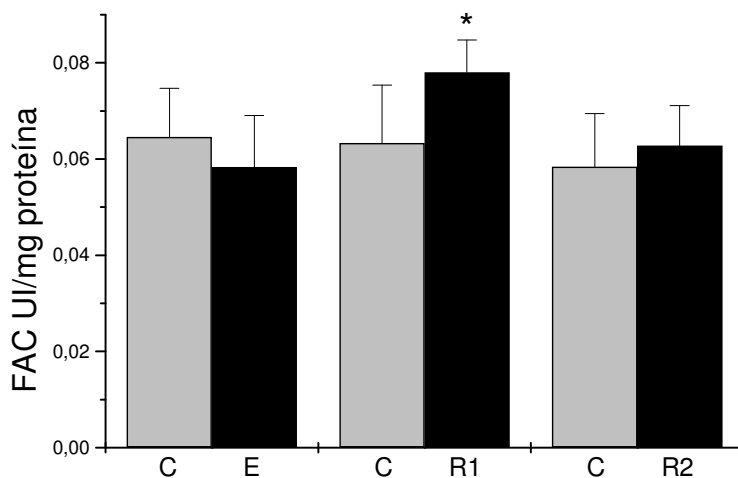


FIGURA 9: Atividade específica da FAC hepática (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

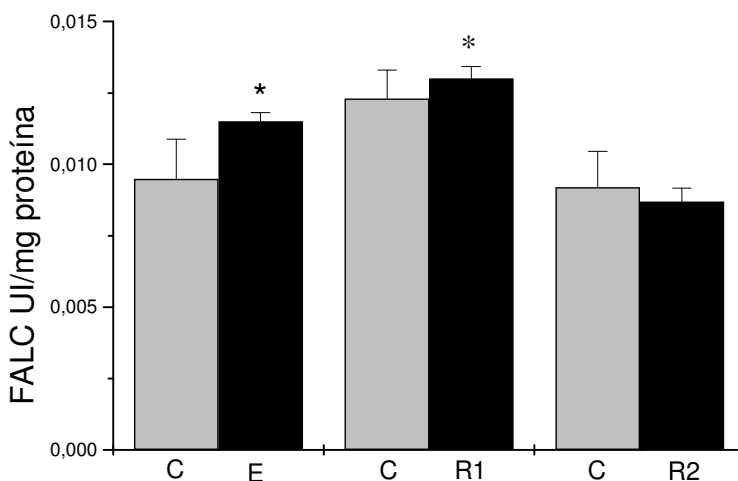


FIGURA 10: Atividade específica da FALC hepática (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

6.3.4.2 MÚSCULO

Alanina aminotransferase – ALAT

A atividade específica da ALAT muscular não alterou após as 96 h de exposição ao fenol. Contudo, os peixes da recuperação por 7 dias apresentaram aumento significativo de 24,5% na atividade desta enzima. Após a recuperação por 14 dias, a atividade desta enzima permaneceu constante em relação ao controle. As médias e desvios-padrão da atividade específica da ALAT muscular estão apresentados na FIGURA 11.

Aspartato aminotransferase – ASAT

A atividade específica da ASAT muscular aumentou significativamente 25,3% em relação ao controle. Após a recuperação por 7 dias, a atividade desta enzima não alterou, contudo, após 14 dias de recuperação, verificou-se aumento significativo de 79,5% na atividade desta enzima. As médias e desvios-padrão da atividade específica da ASAT muscular estão apresentados na FIGURA 12.

Lactato desidrogenase – LDH

Após a exposição ao fenol e a recuperação por 7 dias, a atividade da LDH muscular não alterou significativamente. No entanto, os peixes da recuperação por 14 dias, apresentaram aumento significativo de 12,7% na atividade desta enzima. As médias e desvios-padrão da atividade específica da LDH muscular estão apresentados na FIGURA 13.

Fosfatase ácida – FAC

Nos peixes expostos ao fenol, observou-se redução significativa de 14,5% na atividade da FAC muscular. Após a recuperação por 7 e 14 dias, os valores das atividades desta enzima não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As médias e desvios-padrão da atividade específica da FAC muscular estão apresentados na FIGURA 14.

Fosfatase alcalina – FALC

Após a exposição ao fenol, verificou-se elevação significativa de 15,8% na atividade da FALC muscular. Os peixes da recuperação por 7 e 14 dias igualmente apresentaram aumento na atividade desta enzima, sendo que, após 7 dias, a atividade enzimática aumentou 20% e após 14 dias, 17,2%. As médias e desvios-padrão da atividade específica da FALC muscular estão apresentados na FIGURA 15.

Acetilcolinesterase – AChE

A atividade específica da AChE muscular não alterou nos peixes expostos ao fenol. Entretanto, observou-se aumento significativo de 19,9% e 22,7% na atividade desta enzima após a recuperação por 7 e 14 dias, respectivamente. As médias e desvios-padrão da atividade específica da AChE muscular estão apresentados na TABELA 7.

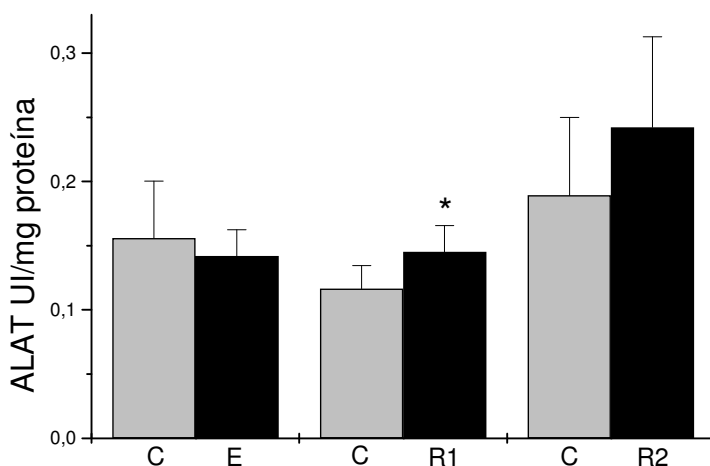


FIGURA 11: Atividade específica da ALAT muscular (UI mg de proteína⁻¹) do bagre do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

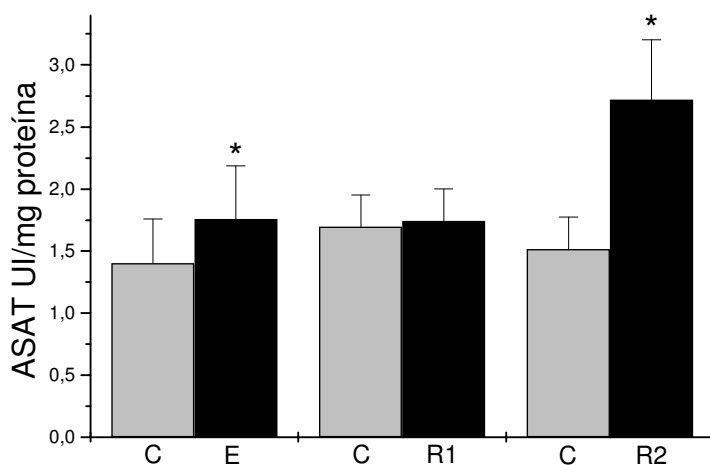


FIGURA 12: Atividade específica da ASAT muscular (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

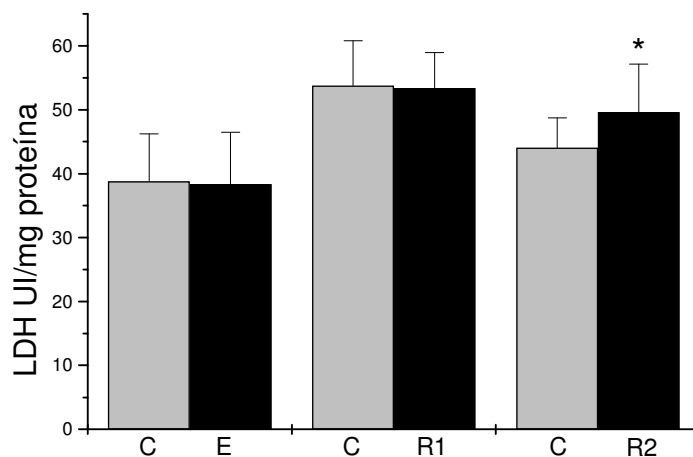


FIGURA 13: Atividade específica da LDH muscular (UI mg de proteína⁻¹) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

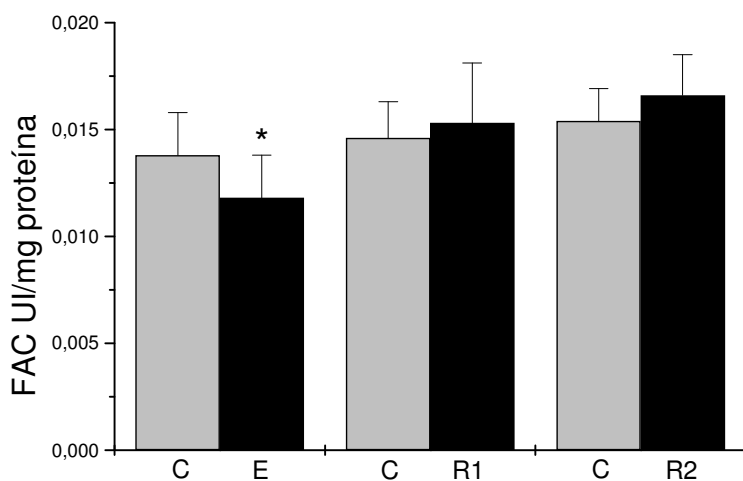


FIGURA 14: Atividade específica da FAC muscular ($\text{UI mg de proteína}^{-1}$) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

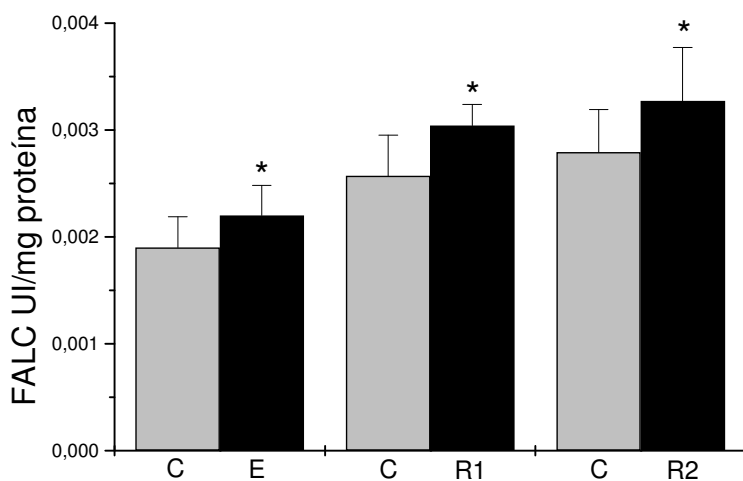


FIGURA 15: Atividade específica da FALC muscular ($\text{UI mg de proteína}^{-1}$) do bague do canal exposto ao fenol (E); após recuperação por 7 dias (R1) e 14 dias (R2) e seus respectivos controles (C). Diferenças significativas em relação ao controle para $p < 0,05$ estão indicadas por (*).

6.3.4.3 Cérebro

Acetilcolinesterase

No cérebro, a atividade específica da acetilcolinesterase não alterou após a exposição e recuperação por 7 dias. Contudo, esta enzima apresentou redução significativa de 10,8% na atividade após a recuperação por 14 dias. As médias e desvios-padrão da atividade específica da AChE cerebral estão apresentados na TABELA 7.

TABELA 7: Atividade específica da AChE no músculo branco e cérebro do bagre do canal após exposição ao fenol e após recuperação por 7 e 14 dias.

Tecido	Condição					
	Controle	Fenol	Controle	Rec1	Controle	Rec2
Músculo	0,183 ± 0,030	0,176 ± 0,031	0,199 ± 0,024	0,239 ± 0,030 *	0,247 ± 0,040	0,303 ± 0,044 *
Cérebro	0,774 ± 0,130	0,773 ± 0,100	0,968 ± 0,059	0,918 ± 0,110	0,964 ± 0,103	0,860 ± 0,089 *

Atividade enzimática expressa em UI·mg de proteína⁻¹. (*) indica diferença significativa para p<0,05.

7 DISCUSSÃO

7.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Os valores observados da CL₅₀;96h de fenol para o bagre do canal (*Italurus punctatus*) aproximam-se dos já encontrados em outras espécies de peixes, tais como o matrinxã (*Brycon amazonicus*) (HORI et al., 2006) e o *Campostoma anomalum* (CHANGON e HLAHOWSKYJ, 1989) (TABELA 8). O fenol foi mais tóxico para a truta arco-íris (*Salmo gairdnerii*) (MITROVIC et al., 1968) e *Notopterus notopterus* do que para o bagre do canal (VERMA et al., 1981), já que os valores da CL₅₀ de fenol para estas espécies são menores que o encontrado para a espécie deste estudo (TABELA 8).

Entretanto, o fenol parece ser mais tóxico ao bagre do canal do que para outras espécies como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (FIGUEIREDO, 2008), a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (GAD e SAAD, 2008), a tilápia mossâmbica (*Oreochromis mossambicus*) (SANNADURGAPPA, 2007), a tilápia azul (*Oreochromis aureus*) (ABDEL-HAMEID, 2007), o bagre (*Saccobranhus fossilis*), a *Colisa fasciatus* (VERMA et al., 1980), a *Oryzias latipes* (RICE et al., 1997) e o *mosquitofish* *Gambusia affinis* (CHANGON e HLAHOWSKYJ, 1989) (TABELA 8). Todas estas espécies foram submetidas ao teste de toxicidade aguda de fenol e apresentaram valores de CL₅₀ maiores que o encontrado para o bagre do canal.

Segundo a classificação de ZUCKER (1985), valores de CL₅₀ que estão entre 10mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ devem ser consideradas como substâncias levemente tóxicas. Baseado nesta classificação, o fenol pode ser considerado levemente tóxico para o bagre do canal.

Desta forma, o valor da CL₅₀ de fenol para o bagre do canal mostra que, apesar do fenol ser considerado levemente tóxico, esta espécie responde ao estressor.

TABELA 8: Valores da CL50 de algumas espécies de peixe expostas ao fenol.

Espécie	Valor CL50 (mg L ⁻¹)	Duração do teste (horas)
<i>Salmo gairdnerii</i> ¹	7,50	48
<i>Notopterus notopterus</i> ²	12,53	96
<i>Ictalurus punctatus</i> ³	15,08	96
<i>Brycon amazonicus</i> ⁴	17,40	96
<i>Campostoma anomalum</i> ⁵	17,90	48
<i>Oryzias latipes</i> ⁶	24,10	48
<i>Oreochromis niloticus</i> ⁷	28,00	96
<i>Oreochromis aureus</i> ⁸	29,00	96
<i>Colisa fasciatus</i> ⁹	32,70	96
<i>Piaractus mesopotamicus</i> ¹⁰	33,00	96
<i>Oreochromis mossambicus</i> ¹¹	35,00	96
<i>Saccobranchus fossilis</i> ⁹	39,40	96
<i>Gambusia affinis</i> ¹²	47,40	48

¹Mitrovic et al., 1968; ²Verma et al., 1981; ³Presente trabalho; ⁴Hori et al., 2006; ⁵Changon e Hlahowskyj, 1989; ⁶Rice et al., 1997; ⁷Gad e Saad, 2008; ⁸Abdel-Hameid, 2007; ⁹Verma et al., 1980; ¹⁰Figueiredo, 2008; ¹¹Sannadurgappa, 2007; ¹²Changon e Hlahowskyj, 1989.

7.2 VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS

Nenhuma alteração foi observada nas variáveis hematológicas e nos índices hematimétricos do bagre do canal após 96 h de exposição ao fenol. O robalo (*Dicentrarchus labrax*) exposto a doses única e doses fracionadas de fenol a 10% da CL50 apresenta hematócrito constante, mas a concentração total de hemoglobina aumenta nesta espécie (ROCHE e BOGÉ, 2000). Porém, em truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) exposta a diversas concentrações sub-letais de fenol por quatro horas é observado aumento do hematócrito (SWIFT, 1981). Igualmente, observa-se o aumento em (*B. amazonicus*) exposto a 2 mg L⁻¹ (10% da CL50) de fenol por 96 h (AVILEZ et al., 2008). Em pacu (*P. mesopotamicus*), exposto a 3,3 mg L⁻¹ (10% da CL50) de fenol por 96 h, verifica-se aumento do hematócrito,

da hemoglobina total e da RBC, sem alterações dos índices hematimétricos (FIGUEIREDO, 2008). Em matrinxã e pacu expostos ao fenol, as alterações hematológicas observadas parecem ocorrer devido à alta demanda metabólica associada a possíveis alterações na função respiratória.

Como não foi verificada qualquer alteração nas variáveis hematológicas em bagre do canal exposto ao fenol por 96 h, admite-se que os mecanismos de transporte de oxigênio não foram afetados após este período de exposição.

Entretanto, após 7 dias de recuperação, a RBC aumentou paralelamente à redução do VCM e da HCM. Alterações hematológicas associadas a respostas de estresse podem persistir por dias, mesmo após a remoção do estressor (CLAUSS et al., 2008). As alterações nas variáveis eritrocitárias foram acompanhadas de um quadro hiperlactêmico, o qual é uma das respostas bioquímicas indicativas da falta de oxigenação tecidual e ou demanda metabólica. A hiperlactemia poderia ainda ser resultado do aumento do número de eritrócitos, os quais possuem metabolismo anaeróbico. Hiperlactemia também é observada após 7 dias de recuperação em pacu exposto ao fenol por 96 h (FIGUEIREDO, 2008). O aumento da RBC poderia ser explicado por uma possível redução da oxigenação tecidual resultante de danos branquiais. Em matrinxã exposto a 2 mg L^{-1} de fenol por 96 h esta hipótese é suportada pelas alterações histopatológicas na estrutura branquial, com prejuízo na função respiratória (AVILEZ, 2008). A oxigenação tecidual e o aumento da demanda metabólica são reguladores da produção de hemácias, sendo que qualquer deficiência de oxigênio nos tecidos pode aumentar a velocidade de produção das células vermelhas, via estimulação do hormônio eritropoetina. Dessa forma, tanto a hipóxia tecidual como o aumento da demanda metabólica, poderiam regular positivamente (estimular) a produção de células vermelhas. Isso justificaria o aumento da RBC após 7 dias de recuperação.

As reduções no VCM e da HCM parecem indicar uma provável microcitose, que pode ser indicativo da presença de eritrócitos jovens na circulação do peixe. CLAUSS e col. (2008) admitem que eritrócitos imaturos, com tamanho reduzido, podem estar presentes na circulação periférica de peixes em resposta a anemias regenerativas e a estressores ambientais. Embora a HCM tenha reduzido, a hemoglobina total e o CHCM permaneceram constantes devido a um efeito compensatório do aumento no RBC. Essa compensação pareceu evitar um possível quadro de anemia, sendo responsável por manter o hematócrito

constante. Anemia é observada no jundiá-cinza (*Rhamdia quelen*) exposto ao herbicida clomazona por 96 e 192 h. Após 96 e 192 h de recuperação, o estado anêmico não foi mais observado nesta espécie (CRESTANI, 2006). Entretanto, concentração sub-letal de deltametrina ($0,17 \text{ mg L}^{-1}$) provoca elevação na RBC e redução no VCM, HCM, hematócrito e ligeira redução na hemoglobina total no bagre (*Heteropneustes fossilis*) após 30 dias de exposição. Estes autores afirmam que a estimulação da eritropoiese deve ter ocorrido a fim de evitar uma anemia (KUMAR et al., 1999). A carpa (*Cyprinus carpio*) exposta ao nonifenol por 70 dias apresenta aumento de reticulócitos, indicando estimulação da eritropoiese para compensar a condição anêmica (SCHWAIGER et al., 2000).

Após 14 dias de recuperação, as variáveis hematológicas não alteraram, indicando uma possível recuperação do animal frente às alterações hematológicas observadas após a recuperação por 7 dias.

7.3 METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

7.3.1 EXPOSIÇÃO SUB-LETAL AO FENOL POR 96 HORAS

O metabolismo intermediário do bagre do canal foi responsivo à exposição sub-letal de fenol, verificando-se alterações nas variáveis metabólicas em todos os compartimentos estudados. O perfil metabólico referente a estas alterações está representado no APÊNDICE A.

Após recuperação por 7 e 14 dias, ainda observaram-se alterações nestas variáveis. Quando expostos a poluentes, os peixes demandam muita energia nos processos de detoxificação e de adaptação às condições adversas. Dessa forma, surgem as respostas de estresse que são consideradas mecanismos adaptativos que permitem aos peixes manter a homeostasia (BARTON, 2002). Em bagre do canal, estas alterações parecem ter ocorrido para disponibilizar substratos oxidáveis e atender a demanda metabólica.

Metabolismo protéico

Os carboidratos são fontes energéticas primárias e imediatas em vertebrados. Contudo, HOCHACHKA e MOMMSEN (1995) afirmam que a preferência dos tecidos dos peixes por carboidratos como fonte de energia não está totalmente esclarecida. É sabidamente conhecido que os teleósteos dependem essencialmente de proteína para produção de energia, sendo os músculos esqueléticos, constituintes de aproximadamente 50% da proteína corporal, o maior reservatório de aminoácidos (TRIPATHI e VERMA, 2003). Como os peixes têm pequena quantidade de carboidratos, uma fonte alternativa de energia pode ser a protéica (TRIPATHI et al., 2003).

O bagre do canal, após 96 horas de exposição ao fenol, apresentou aumento de amônia e redução do teor de proteína muscular que, em adição ao aumento da ASAT é indicativo de proteólise neste tecido. A enzima ASAT é responsável pela transferência do grupo amino do aspartato para o α -cetoglutarato, com formação de oxaloacetato. Pelas vias anapleróticas, o oxaloacetato pode entrar no ciclo de Krebs, alimentando assim, o processo oxidativo muscular. O teor de aminoácidos musculares permaneceu constante e, devido a um processo dinâmico, esses aminoácidos podem ter sido oxidados no próprio músculo ou exportados para o fígado, onde participariam da via gliconeogênica. Em qualquer uma das hipóteses, a finalidade dos aminoácidos seria a produção de energia para combater o estresse da exposição ao fenol.

Outras espécies de peixes submetidas a concentrações sub-letais de fenol apresentam quadro metabólico indicativo de proteólise muscular. Pacu exposto a $3,3\text{mg L}^{-1}$ de fenol (10% da CL50) por 96 h apresenta redução dos teores de proteína, aumento de aminoácidos e da atividade das aminotransferases ALAT e ASAT muscular. Estas alterações suportam a hipótese de proteólise muscular, com aumento da demanda energética devido ao estresse da exposição ao fenol (FIGUEIREDO, 2008). A redução na concentração de proteína muscular é observada em *Channa punctatus* exposta a $6,6\text{mg L}^{-1}$ (30% da CL50) de fenol por 15 dias (REDDY et al., 1993). Após 30 dias de exposição a $17,5\text{mg L}^{-1}$ de fenol (50% da CL50), a tilápia mossâmbica apresenta redução dos teores de proteína e de aminoácidos e aumento das atividades das aminotransferases ALAT e ASAT no músculo (DANGÉ, 1986b). Para SANNADURGAPPA e col. (2007) a tilápia mossâmbica apresenta variações na

concentração de proteína muscular conforme o tempo de exposição. Após 10 dias de exposição a $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ de fenol (10% da CL50), a concentração de proteína aumenta no músculo, entretanto após 30 dias ocorre redução dos teores protéicos neste tecido. O matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido à concentração de 2 mg L^{-1} de fenol (10% da CL50) por 96 h, apresenta elevação da concentração de proteína muscular e aumento na atividade da ALAT e ASAT neste tecido. Assim, o fenol pode provocar utilização inicial das fontes protéicas musculares para obter energia sem, contudo, provocar desvio substancial do catabolismo de carboidratos para o de proteínas (HORI et al., 2006).

Outros xenobióticos são igualmente capazes de promover alterações no metabolismo de proteína muscular. O bagre andador (*Clarias batrachus*) exposto a $7,6 \text{ mg L}^{-1}$ (30% da CL50) de carbofuran (pesticida carbamato) por 6 dias apresenta proteólise muscular, com redução de proteína muscular e aumento de aminoácidos, da atividade das enzimas ALAT e ASAT e do teor de amônia muscular (BEGUM, 2004). Os organofosforados dimetoato e o monocrotofós provocam redução na concentração de proteínas musculares e alterações nas aminotransferases em *Channa punctatus*, após exposição sub-letal por 96 h e 30 dias, respectivamente (TRIPATHI et al., 2003; AGRAHARI e GOPAL, 2009). Todavia, o jundiá-cinza (*Rhamdia quelen*) quando exposto a 1 mg L^{-1} do herbicida clomazona apresenta aumento do teor de proteína muscular ou manutenção do mesmo (CRESTANI et al., 2006).

No tecido hepático, a redução no teor de proteína juntamente com o aumento de aminotransferases sugere proteólise. As aminotransferases ou transaminases são enzimas que participam diretamente da transferência de grupos amino e da disponibilização de cetoácidos para os processos metabólicos. Os cetoácidos formados da transaminação pela ASAT e ALAT, oxaloacetato e piruvato respectivamente, poderiam ser precursores da gliconeogênese hepática.

O fenol provoca alterações no bagre do canal similares às observadas no metabolismo protéico hepático de algumas espécies de peixes. O pacu (*P. mesopotamicus*) exposto a $3,3 \text{ mg L}^{-1}$ de fenol por 96h apresenta aumento no teor de aminoácidos e na atividade da ALAT e ASAT, sugerindo, portanto, aumento da atividade catabólica de proteínas neste tecido (FIGUEIREDO, 2008). O matrinxã (*B. cephalus*) exposto a 2 mg L^{-1} de fenol por 96 h, apresenta teores de proteína e aminoácidos hepáticos reduzidos ao passo que a atividade da ASAT aumenta (HORI et al., 2006). Elevações das atividades das

transaminases hepática ALAT e ASAT são igualmente observadas em *Notopterus notopterus* exposto a 1,25 mg L⁻¹ de fenol (10% da CL50) por 15 e 30 dias (GUPTA et al., 1983). Redução de proteína hepática e aumento da atividade da ALAT e ASAT são reportados em tilápia mossambica exposta a 8,75 mg L⁻¹ e 17,5 mg L⁻¹ de fenol por 30 dias (DANGÉ, 1986b). Entretanto, esta espécie submetida a concentrações menores, como 2,5 mg L⁻¹ e 3,5 mg L⁻¹ de fenol por 10, 20 e 30 dias, apresenta aumento da concentração de proteína hepática em todo o período avaliado (SANNADURGAPPA et al., 2007).

Outros xenobióticos provocam alterações no metabolismo hepático de proteínas semelhantes ao bagre do canal exposto ao fenol. O bagre andador (*Clarias batrachus*) exposto a 7,6 mg L⁻¹ de carbofuran por 6 dias apresenta redução de proteína hepática e aumento de aminoácidos e da atividade da ALAT e ASAT (BEGUM, 2004). O *C. punctatus* exposto às concentrações sub-letais (7,16 e 10,75 mg L⁻¹) de dimetoato apresenta redução na concentração de proteína e aumento de aminoácidos hepático (TRIPATHI et al., 2003), indicando proteólise neste tecido. Ainda, na enguia (*Anguilla anguilla*) exposta ao organofosforado fenitrotion, por 96 h, é observada redução no teor de proteína hepática para atender a demanda energética (SANCHO et al., 1998).

Dessa forma, é provável que a proteólise muscular e hepática sustente a demanda metabólica gerada pelo estresse causado pelo fenol, fornecendo os esqueletos carbonados dos aminoácidos para a gliconeogênese hepática e energia para os processos de detoxificação.

Metabolismo glicídico

No músculo, a redução da concentração de glicose indica a ocorrência de glicólise muscular. A oxidação da glicose pode ter ocorrido para sustentar o metabolismo oxidativo muscular, com fornecimento de energia para este tecido. A redução de glicose muscular é relatado no matrinxã (*B. cephalus*) exposto a 2 mg L⁻¹ de fenol por 96 h (HORI et al., 2006), no *C. punctatus* exposto a 6,6 mg/L de fenol por 5 dias (REDDY et al., 1993) e na tilápia azul (*Oreochromis aureus*) exposta a 5,8, 11,6 e 23,2 mg L⁻¹ de fenol por 1 semana (ABDEL-HAMEID, 2007).

A produção de energia muscular possivelmente gerada a partir da oxidação tanto de glicose como de ácidos graxos e proteínas parece ter sido suficiente para manter a concentração de glicogênio muscular em bague do canal. A manutenção dos teores de glicogênio muscular é observada em outras espécies de peixes expostas ao fenol. O matrinxã exposto a 2 mg L⁻¹ de fenol (HORI et al., 2006), pacu a 3,3 mg L⁻¹ (FIGUEIREDO et al., 2008) e a tilápia mossâmbica a 8,75 mg L⁻¹ (DANGÉ, 1986a) mantiveram constantes os teores de glicogênio muscular após 96 h de exposição. Por outro lado, glicogenólise pode ocorrer em peixes expostos ao fenol por um período maior que 96 h de exposição. A tilápia (*O. aureus*) exposta a 11,6 e 23,2 mg L⁻¹ de fenol por 7 dias e o *C. punctatus* exposto a 6,6 mg L⁻¹ de fenol por 15 dias apresentam redução do teor de glicogênio muscular (ABDEL-HAMEID, 2007; REDDY et al., 1993).

As células musculares apresentam capacidade metabólica fermentativa. Entretanto, a atividade da LDH muscular permaneceu constante em bague do canal, corroborando a hipótese de que o metabolismo oxidativo neste tecido foi suficiente para atender a demanda energética. Inalterabilidade da atividade da LDH é observada no matrinxã (*B. cephalus*) exposto a 2 mg L⁻¹ de fenol por 96 h (HORI et al., 2006). Todavia, o pacu (*P. mesopotamicus*) exposto a 3,3 mg L⁻¹ de fenol apresenta aumento da atividade desta enzima como indicativo de metabolismo anaeróbico neste tecido (FIGUEIREDO, 2008).

No fígado, o aumento da LDH, da concentração de glicogênio e a manutenção da glicemia apontam para um possível processo gliconeogênico no bague do canal. A glicose produzida na gliconeogênese pode ser a responsável por manter a glicemia. Além de fornecer glicose para diversos processos metabólicos e para tecidos extra-hepáticos, a gliconeogênese é um meio de se produzir glicose-6-fosfato, para síntese de NADPH no desvio das pentoses, essencial para o sistema de detoxificação de xenobióticos.

No bague do canal pode ser que o lactato plasmático e os esqueletos de aminoácidos, provenientes da proteólise muscular e hepática, sejam fontes carbonadas para os processos de gliconeogênese. Para FIGUEIREDO (2008) respostas gliconeogênicas no fígado ocorrem em pacu (*P. mesopotamicus*) exposto a 2 mg L⁻¹ de fenol por 96 h, pois esta espécie apresenta aumento da atividade da LDH associada à hiperglicemia. No matrinxã (*B. cephalus*) exposto ao fenol (2 mg L⁻¹ por 96 h) observa-se aumento da LDH hepática, redução da concentração de piruvato hepático e manutenção da glicemia, que indicam um quadro gliconeogênico

(HORI et al., 2006). A tilápia azul exposta a 11,6 e 23,2 mg L⁻¹ de fenol por 1 semana apresenta aumento da atividade da LDH hepática, sugestiva de gliconeogênese a partir de lactato (ABDEL-HAMEID, 2007).

Todavia, a gliconeogênese hepática nem sempre ocorre em situações de estresse; o que se verifica é a glicogenólise hepática. A tilápia mossambica (*O. mossambicus*) exposta ao fenol apresenta redução do glicogênio hepático que somada ao aumento de glicose plasmática, sugerem glicemiação por quebra de glicogênio neste órgão (DANGÉ, 1986a). Esta mesma espécie, quando submetida a 2,3 e 3,5 mg L⁻¹ de fenol por 30 dias, apresenta redução de carboidratos no fígado, o que é sugestivo de glicogenólise para atender a demanda energética e combater o estresse tóxico do fenol (SANNADURGAPPA et al., 2007). O bagre andador (*C. batrachus*), exposto a 7,6 mg L⁻¹ de carbofuran por 6 dias, apresenta redução na concentração de glicogênio hepático, aumento da atividade da glicogênio fosforilase *a* e redução na atividade da glicogênio fosforilase *ab*, indicando portanto, glicogenólise hepática (BEGUM, 2004). O mesmo parece ocorrer em matrinxã, submetido à exposição ao metil-paration, cuja reserva hepática de glicogênio é reduzida paralelamente à elevação da concentração de glicose plasmática (AGUIAR et al., 2004). A *C. punctatus* exposta ao dimetoato (7,16 e 10,75 mg L⁻¹ por 96 h) e a enguia (*Anguilla Anguilla*) exposta ao fenitrotion (0,04 mg L⁻¹ por 96 h) apresentam igualmente redução de glicogênio hepático provocado pelo estresse por xenobiótico (TRIPATHI et al., 2003; SANCHO et al., 1998).

A regulação da gliconeogênese hepática é fundamental para a manutenção da glicemia. No bagre do canal a concentração de glicose plasmática manteve-se constante. HORI e col. (2006) e HORI e col. (2008) verifica manutenção da glicemia em matrinxã (*B. amazonicus*) submetido a 0,2 e 2 mg L⁻¹ de fenol por 96 h, respectivamente. Entretanto, a hiperglicemia é uma resposta freqüente em animais sob estresse. Pacu (*P. mesopotamicus*) apresenta hiperglicemia após 96 h de exposição ao fenol (3,3 mg L⁻¹) (FIGUEIREDO, 2008). A tilápia mossambica (*O. mossambicus*) exposta a 8,75 mg/L de fenol também apresenta hiperglicemia após 96h de exposição (DANGE, 1986a).

Metabolismo lipídico

A redução de ácidos graxos no fígado de bagre do canal sugere β -oxidação neste órgão, o qual necessita de energia para manter os prováveis processos de detoxificação. É plausível a hipótese de que a oxidação de ácidos graxos pode ter estimulado a gliconeogênese hepática, desde que a intensa degradação de ácidos graxos não acompanhada de degradação proporcional de carboidratos pode levar ao acúmulo de acetil-CoA. O acetil-CoA é sabidamente um efetor alostérico positivo da piruvato desidrogenase quinase, que fosforila e inativa o complexo piruvato desidrogenase e da piruvato carboxilase, que carboxila piruvato a oxaloacetato, o qual é precursor da gliconeogênese. As alterações no perfil lipídico acompanhado de gliconeogênese hepática ocorre em tilápia mossambica (*O. mossambicus*) exposta por 48 h ao metil-paration (RAO e RAO, 1984).

Além da fonte protéica e glicídica, o tecido muscular do bagre do canal parece mobilizar lipídeos, pois a diminuição no teor de triglicerídeos e o aumento de ácidos graxos no músculo podem indicar lipólise muscular. Assim, a degradação de ácidos graxos poderia ocorrer no músculo, alimentando o metabolismo oxidativo através do ciclo de Krebs. Isto explicaria a possível formação de oxaloacetato, pela proteólise muscular, que também poderia alimentar o ciclo de Krebs.

A redução de lipídeos do tecido muscular foi observada na tilápia mossambica exposta a 3,5 mg L⁻¹ de fenol por 30 dias (SANNADURGAPPA et al., 2007). Outros xenobióticos igualmente provocam alteração no perfil lipídico muscular. Redução de lipídeos totais ocorre em *Catla catla* exposta a 10% da CL-50 de cádmio por 7 dias (SOBHA, 2007) e em *C. punctatus* exposta a 3,6 mg L⁻¹ do inseticida monocrotofós por 30 dias (AGRAHARI e GOPAL, 2009).

Dessa forma, a oxidação de ácidos graxos é uma forma de fornecimento de energia para atender à demanda metabólica, que possivelmente encontra-se aumentada devido ao estresse e à síntese hepática de enzimas de detoxificação, processo este que requer altos níveis de energia (BEGUM e VIJAYARAGHAVAN, 1995; SCOTT e SLOMAN, 2004).

Variáveis plasmáticas

A diminuição das concentrações de triglicerídeos, ácidos graxos e aminoácidos plasmáticos no bague do canal indicam provável utilização destes substratos energéticos por tecidos periféricos. A redução de aminoácidos plasmáticos ocorre em matrinxã (*B. cephalus*) submetido a 2 mg L⁻¹ de fenol por 96 h (HORI et al., 2006), enquanto que o pacu (*P. mesopotamicus*) exposto a 3,3 mg L⁻¹ de fenol apresenta aumento na concentração de aminoácidos plasmáticos após 96 h de exposição (FIGUEIREDO, 2008).

A concentração de piruvato plasmático permaneceu constante no bague do canal, assim como no matrinxã (*B. cephalus*) e no pacu (*P. mesopotamicus*) expostos ao fenol, por 96 h. (HORI et al., 2006; FIGUEIREDO, 2008). A redução do lactato plasmático no bague do canal deve ser devida à mobilização deste intermediário para o fígado, onde pode ser convertido em piruvato e assim seguir pela via gliconeogênica. Resultado similar é observado em matrinxã submetido à concentração 2 mg L⁻¹ de fenol por 96 h (HORI et al., 2006). Entretanto, pacu exposto a 3,3 mg L⁻¹ de fenol apresenta hiperlactemia (FIGUEIREDO, 2008).

Os mecanismos de excreção de amônia não foram afetados no bague do canal após exposição ao fenol por 96 h, pois a concentração de amônia plasmática não alterou. O mesmo é observado no matrinxã exposto ao fenol (HORI et al., 2006), mas não em pacu, que após 96 h de exposição apresenta aumento na concentração de amônia plasmática (FIGUEIREDO, 2008).

A redução de proteína plasmática é pouco comum e está geralmente associada a longos períodos de jejum ou a estresse severo (HOAR et al., 1992). A hipoproteinemia é observada em situações de lesão da mucosa intestinal e lesões renais, como glomerulonefrite (NAOUM, 2008). Dessa forma, a redução de proteína plasmática observada no bague do canal poderia ser devida a alterações no tecido renal. Para AVILEZ (2008), em matrinxã exposto a 2 mg L⁻¹ de fenol ocorre alterações histopatológicas no rim, com formação de um espaço entre o glomérulo e a cápsula renal devida à hipertrofia das arteríolas aferentes e eferentes.

Uma segunda hipótese para a redução de proteínas plasmáticas é a hemodiluição ou aumento do volume plasmático (hipervolemia). Após 7 dias de recuperação, o aumento de

células vermelhas no sangue poderia aumentar a viscosidade sangüínea e assim dificultar sua passagem pelos vasos e capilares. Dessa forma, a hemodiluição seria um mecanismo eficiente para manter a fluidez sangüínea. Para a enguia (*Anguilla Anguilla*) exposta a 0,04 mg L⁻¹ de fenitroion por 96 h ocorre hipoproteinemia (SANCHO et al., 1998).

7.3.2 RECUPERAÇÃO POR 7 DIAS

No bagre do canal exposto ao fenol, a redução de proteína e o aumento da amônia hepática permitem admitir que a proteólise hepática continue após 7 dias de recuperação, embora a atividade das aminotransferases permaneçam constantes. O pacu (*P. mesopotamicus*) exposto ao fenol apresenta proteólise hepática após 7 dias de recuperação ao fenol, com redução da concentração de proteínas neste órgão (FIGUEIREDO, 2008).

Além disso, o aumento da amônia hepática no bagre do canal suporta a idéia de desaminação oxidativa de aminoácidos provenientes de fígado e ou músculo. A concentração elevada de amônia hepática é observada no bagre andador (*C. batrachus*) após recuperação ao inseticida carbofuran (BEGUM, 2004). A desaminação oxidativa poderia fornecer esqueletos carbonados para a gliconeogênese hepática, que parece ocorrer após 7 dias de recuperação, com aumento da glicose e glicogênio hepático. Para FIGUEIREDO (2008) ocorre aumento de glicose e glicogênio hepáticos em pacu (*P. mesopotamicus*) após recuperação por 7 dias da exposição ao fenol, indicando gliconeogênese. Além disso, a glicemia no pacu é igualmente mantida. Elevação no teor de glicogênio hepático também é observada no bagre andador (*C. batrachus*), após recuperação por 6 dias ao inseticida carbofuran (BEGUM, 2004).

A redução de triglicérides no bagre do canal, sugestivo de lipólise hepática, pode ser responsável por fornecer ácidos graxos como fonte de energia para o metabolismo hepático, o qual requer altos níveis de energia devido aos processos de detoxificação. Além disso, os ácidos graxos hepáticos poderiam ser exportados para o músculo, onde aparecem em concentração elevada.

A redução do piruvato no músculo e o aumento da atividade da ALAT neste tecido indicam a formação de alanina, que poderia ser exportada para o fígado, onde seria desaminada ou transaminada. Em qualquer uma das vias, ela fornece esqueletos carbonados

passíveis de serem oxidados no ciclo de Krebs e formariam precursores gliconeogênicos, fenômeno conhecido como ciclo da alanina. Segundo Hochachka e Mommsen (1995) os aminoácidos mais importantes para a gliconeogênese no fígado dos peixes são alanina, glutamato, serina e aspartato, sendo que a alanina e o glutamato parecem ser canalizados preferencialmente por esta via. A gliconeogênese a partir de serina e aspartato é menos importante em termos quantitativos do que a partir da alanina.

A redução da concentração de piruvato poderia ainda, indicar sua oxidação a lactato, que é exportado para o plasma. A inalterabilidade da atividade da LDH muscular e o aumento do lactato plasmático foram sugestivos de pouca fermentação láctica. Como o lactato é um importante substrato gliconeogênico, a hiperlactemia indica a utilização do lactato muscular como fonte carbonada nos processos de gliconeogênese. Este processo é conhecido como ciclo de Cori.

O jundiá-cinza (*Rhamdia quelen*), após 96h de recuperação ao herbicida clomazona, apresenta hiperlactemia enquanto a glicemia também é mantida constante (CRESTANI et al., 2006). Após 7 dias de recuperação ao fenol, o pacu (*P. mesopotamicus*) apresenta redução de piruvato muscular e hiperlactemia, que associadas ao aumento deste intermediário no fígado suportam a hipótese de ciclo de Cori, com fornecimento de esqueletos carbonados para a gliconeogênese hepática (FIGUEIREDO, 2008). Dessa forma, as respostas do bagre do canal foram semelhantes às do pacu após 7 dias de recuperação ao fenol. O perfil metabólico referente a estas alterações está representado no APÊNDICE B.

7.3.3 RECUPERAÇÃO POR 14 DIAS

As reduções nos teores de glicogênio hepático e muscular observadas após 14 dias de recuperação são sugestivas de glicogenólise neste tecidos. A glicose liberada poderia ser exportada para o plasma, pois a glicemia foi mantida. O matrinxã apresenta glicogenólise hepática no período de recuperação ao inseticida organofosforado metil-paration (AGUIAR et al., 2004). Glicogenólise no período de recuperação de 192 h é observado na enguia após exposição ao organofosforado fenitrotion (SANCHO et al., 1998). A elevada atividade da LDH muscular parece indicar metabolismo anaeróbico neste tecido. Como não se observou alterações nas concentrações de lactato nos compartimentos estudados, o aumento de

piruvato hepático pode indicar possível conversão do lactato muscular em piruvato no fígado. Por outro lado, o efeito do jejum somado ao efeito do fenol pode ter provocado algum tipo de lesão muscular, que provocaria aumento da atividade da LDH.

A concentração de proteína reduzida e o aumento da atividade da ASAT no músculo juntamente com o aumento da concentração de amônia plasmática indicam proteólise muscular. O paulistinha (*Danio rerio*) apresenta aumento corporal das aminotransferases ALAT e ASAT após 14 dias de recuperação ao fungicida triciclazole, com possível lesão tissular (SANCHO et al., 2009). A elevação da amônia plasmática no bagre do canal sugere danos nos mecanismos de excreção de amônia no período de recuperação.

O perfil metabólico referente a estas alterações está representado no APÊNDICE C.

7.4 FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA

No bagre do canal exposto ao fenol as atividades proteolíticas observadas podem ser resultantes não somente do processo catabólico devido ao aumento da demanda metabólica, mas devido à liberação de enzimas hidrolíticas contidas em organelas, como os lisossomos, e na membrana plasmática afetada pela presença de fenol. Assim, as fosfatases, entre outras hidrolases, poderiam ter as suas concentrações aumentadas tanto intracelularmente quanto no plasma em função de lesões celulares em nível de membranas. Isto justificaria o aumento e ou decréscimo das fosfatases no fígado e músculo desde a exposição até a recuperação por 14 dias. Em hepatócitos da truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), expostos a alquifenóis por 96h, ocorre perda da integridade da membrana celular (TOLLEFSEN et al., 2007).

O fenol reduz a atividade da FAC e da FALC em fígado, músculo e cérebro da tilápia mossambica (*Sarotherodon mossambicus*) exposta a $1,71 \text{ mg L}^{-1}$ de fenol, indicando depressão da oxidação celular (RAVICHANDRAN e ANANTHARAJ, 1984). Para MOLINA e col. (2005) a toxina de cianobactérias provoca aumento da atividade das fosfatases ácida e alcalina no fígado e no rim da tilápia (*Oreochromis* SP). Paralelamente, ocorre aumento do número de lisossomos renais e lesão hepática e renal, indicando que a alteração da atividade da FAC pode estar envolvida com ação da toxina sobre os lisossomos. A alteração da atividade da FALC pode estar relacionada a qualquer perturbação na membrana plasmática, como a interação da membrana com toxinas.

O paulistinha (*Danio rerio*) exposto a $142 \mu\text{g L}^{-1}$ do fungicida triciclazole por 7 e 14 dias, apresenta alteração da atividade da FALC corporal, que foi associada a diversos danos nos tecidos e órgãos. Como o fígado é o principal sítio de detoxificação, as injúrias hepáticas podem ter ocorrido e os hepatócitos podem ter liberado as suas enzimas ligadas às membranas celulares (SANCHO et al., 2009). Embora não se tenha mensurado a atividade das fosfatases no plasma de bagre do canal, o aumento da FALC no plasma do bagre africano (*Clarias gariepinus*), exposto a diversas concentrações sub-letais de um inseticida por 8 semanas, indica o extravasamento desta enzima devido a disfunção hepática (OKECHUKWU e AUTA, 2007).

A atividade da FALC é geralmente utilizada em estudos clínicos e ecotoxicológicos. O aumento da atividade desta enzima tem sido explicado por processos patológicos, tais como danos hepáticos, disfunção renal e doenças ósseas (BARSE et al., 2006). No bagre do canal a FALC muscular foi a única enzima que permaneceu com atividade elevada desde a exposição por 96 h até o final da segunda semana de recuperação. Entretanto, pouco se sabe sobre a isoforma desta enzima no músculo (BARSE et al., 2006). Por outro lado, elevação na atividade da FAC e FALC muscular e redução das mesmas no fígado são reportadas em *C. punctatus* exposta 1, 8 e $3,6 \text{ mg L}^{-1}$ do inseticida monocrotofós por 30 dias (AGRAHARI e GOPAL, 2009). No bagre africano (*Clarias gariepinus*) ocorre elevação da FALC no músculo, nas brânquias e no cérebro após 6 e 12 dias de exposição a concentrações sub-letais de cádmio (VELMURUGAN et al., 2008). Para a carpa (*Cyprinus carpio*) exposta a diferentes concentrações sub-letais de terc-butilfenol ocorre alterações nas atividades da FAC e FALC musculares, como um possível mecanismo de fornecimento de grupos fosfatos para os processos metabólicos (BARSE et al., 2006).

7.5 ACETILCOLINESTERASE – AChE

A atividade da AChE cerebral do bagre do canal não alterou durante a exposição ao fenol e após a recuperação por 7 dias. Porém, ocorre redução da atividade enzimática após a recuperação por 14 dias. Este fato se deve possivelmente à inibição da síntese dessa enzima ou à sua ligação a algum derivado da biotransformação do fenol no sítio de ação da AChE.

A atividade da AChE cerebral varia em peixes expostos ao fenol. A *Channa punctatus* exposta a 6,6 mg L⁻¹ de fenol por 15 dias apresenta aumento da atividade da AChE (REDDY et al., 1993). Entretanto, o matrinxã (*B. amazonicus*) exposto a 2 mg L⁻¹ de fenol por 96 h apresenta redução da atividade desta enzima, a qual é recuperada após 14 dias (AVILEZ, 2008). O bagre do canal exposto a 0,1 mg L⁻¹ do pesticida carbamato Aldicarb apresenta redução da atividade da AChE cerebral (PERKINS e SCHLENK, 2000).

No músculo, nenhuma alteração na atividade da AChE foi observada após 96 h de exposição. Entretanto, na recuperação por 7 e 14 dias, a atividade desta enzima estava elevada em relação ao controle. Assim como a AChE cerebral, é possível que a síntese desta enzima tenha sido alterada. O estresse do confinamento, o jejum e até mesmo algum derivado da biotransformação do fenol podem ter interferido na síntese ou ação desta enzima.

O bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) exposto a 0,1 mg L⁻¹ do carbamato Aldicarb não apresenta alteração na atividade da AChE muscular (PERKINS e SCHLENK, 2000). Estes autores ressaltam que esta espécie é resistente ao xenobiótico e possui um mecanismo protetor contra a toxicidade aguda que biotiva menos o tóxico no organismo. Todavia, a atividade da AChE muscular aumenta em *Channa punctatus* exposta a 6,6 mg L⁻¹ de fenol por 15 dias. Isto estaria relacionado ao aumento da acetilcolina e da transmissão neuromuscular que poderia ser provocado pela toxicidade do fenol (REDDY et al., 1993).

8 CONCLUSÕES

"Nós todos pensamos por meio de palavras, e quem não sabe se servir das palavras, não pode aproveitar as suas idéias." Olavo Bilac

1. O teste de toxicidade aguda (CL50;96h) do fenol para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) está dentro da faixa observada para outras espécies bentopelágicas e mostra que o fenol é levemente tóxico para o bagre do canal.

2. O fenol provoca alterações hematológicas após 7 dias de recuperação. Entretanto, esta espécie dispõe de mecanismos eficazes para manter a função respiratória.

3. A exposição ao fenol altera o metabolismo intermediário e a demanda metabólica, que possivelmente encontrava-se aumentada devido ao estresse e à síntese hepática de enzimas de desintoxicação.

4. As alterações nas atividades das fosfatases ácida e alcalina, observadas em fígado e músculo, podem ser resultantes de danos celulares provocados pelo fenol.

5. As alterações observadas na atividade da enzima AChE cerebral e muscular ocorrem somente no período de recuperação e podem ser decorrentes da ação de derivados da biotransformação do fenol, que pode ter interferido na síntese ou ação desta enzima, ou ainda ao estresse do confinamento ou jejum.

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.

AGRAHARI, S., GOPAL, K. Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freshwater fish, *Channa punctatus*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, doi: 10.1016/j.pestbp.2009.02.001, 2009.

AGUIAR, L.H., MORAES, G., AVILEZ, I.M., ALTRAN, A.E., CORRÊA, C.F. Metabolical effects of Metil-paration 600 on neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Environ. Res.**, v. 95, p. 224-230, 2004.

ALMEIDA, L.C., AGUIAR, L.H., MORAES, G. Effect of methyl paration on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Ciência Rural**, v. 35, n.6, p. 1412-1416, 2005.

APHA (American Public Health Association). **Standard methods for examination of water and wastes**. 12 ed., Washington, DC: Join editorial board, 1980.

AVILEZ, I.M. **Estudo do metabolismo antioxidativo, a biotransformação hepática e as alterações histológicas de *Brycon amazonicus* (Agassisz, 1829), matrinxã, (Teleostei; Characidae), submetido ao fenol**. 159f. Tese (doutorado, Programa de Genética e Evolução) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

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., CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 322 p., 2003.

BARSE, A.V., CHAKRABARTI, T., GHOSH, T.K., PAL, A.K., JADHAO, S.B. One-tenth dose of CL₅₀ of 4-tert-butylphenol causes endocrine disruption and metabolic changes in *Cyprinus carpio*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 86, p. 172-179, 2006.

BARTON, B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integ. and Comp. Biol.** v. 42, p. 517-525, 2002.

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.

BERGMAYER, H.U., BEACH, W.D. **Methods of enzymatic analysis**, 3.ed. Florida: Weinhein Durfield Beach, 1983.

BERGMMEYER, H.U., SCHEIBE, P., WAHLEFELD, A. W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine transferase. **Clin. Chem.** v. 24, p. 58-73, 1978.

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.

BOLOGNESI, C., PERRONE, E., ROGGIERI, P., PAMPANIN, D.M., SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish to xenobiotics under controlled conditions. **Aquat. Toxicol.** v. 78, p. 93-98, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Portaria n. 20, de 18 de junho 1986. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. 1986

BRASIL. 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]**. 2005

BROBECK, J.R. **Best and Taylor's As Bases Fisiológicas da Prática Médica**. 9ª edição Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, seção 4: Sangue e Linfa, p. 453-535, 1976.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2007**, publicado em 2008. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua_geral.html. Acesso em 2008.

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.

CLAUSS, T.M., DOVE, A.D.M., ARNOLD, J.E. Hematologic disorders of fish. **Vet. Clin. Exot. Anim.**, v.11, p. 445-462, 2008.

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.

DANGÉ, A.D. Changes in carbohydrate metabolism in tilapia, *Oreochromis (Sarotherodon) mossambicus*, during short-term exposure different types of pollutants. **Environ. Pollut. Ser. A** v. 41, p. 165-177, 1986a

DANGÉ, A.D. Metabolic effect of naphthalene, toluene or phenol intoxication in the cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*: changes in aminotransferase activities. **Environ. Pollut. Ser. A** v. 42, p. 311-323, 1986b.

DRABKIN, D.L. The standardization of hemoglobin measurement. **Am. J. Med. Sci.** v. 215, p. 110-111, 1948.

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.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D. ANDRES, J.R.V., FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v. 7, p. 88-95, 1961.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **Regional Review on Aquaculture Development, North America – 2005**, Fisheries Circular No. 1017/7, 2006.

FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. SHALM, O.W. (eds) **Shalm's veterinary hematology**. 5^a edição ed: Wiley-Blackwell, cap. 174: Hematology of fish, p. 1120-1125, 2000.

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

FIGUEIREDO, J.S.L. **Toxicidade aguda, efeitos metabólicos e hematológicos sub-letais do fenol em Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 58f. Dissertação (Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

GAD, N.S., SAAD, A.S. Effect of environmental pollution by phenol on some physiological parameters of *Oreochromis niloticus*. **Global Veterinaria** v.2, p. 312-319, 2008.

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.

GOLDSTEIN, E.G.; CLYMO, R.S. **Methods for chemicals analysis of freshwater**. IBP Handbook n.8. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 171 p., 1969.

- 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, 1983
- 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.
- HOAR, W.S., RANDALL, D.J., FARREL, A.P. (eds) **Fish Physiology**. Vol. XII, parte B The Cardiovascular System, San Diego: Academic press, 474 p., 1992.
- HOCHACHKA, P.W., GUPPY, M., GUDERLY, H.E., STOREY, K.B., HULBERT, W.C. Metabolic biochemistry of water vs air breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. **Can. J. Zool.** v. 56, p. 736-750, 1978.
- HOCHACHKA, P.W., MOMMSEN, T.P. (eds) **Metabolic biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 515p., 1995.
- 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.
- HORI, T.S.F., AVILEZ, I.M., IWAMA, G.K., JOHNSON, S.C., MORAES, G., AFONSO, L.O.B. Impairment of the stress response in matrinxã juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol. **Comp. Biochem. Physiol. C**, doi: 10.1016/j.cbpc.2008.01.003, 2008.
- KHAN, M. N., SARWAR, T. Pesticide-induced changes in serum levels of acid phosphatase, alkaline phosphatases and glutamate oxaloacetate transaminase in rats. **Pak. J. Biol. Sci.** v. 6, p. 359-362, 2003.
- 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.
- KUMAR, S., LATA, S., GOPAL, K. Deltamethrin induced physiological changes in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.62, p. 254-258. 1999.

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.

LANDIS, W.G., XIU, M. **An introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals on ecological systems.** Boca Raton, FL: Lewis Publishing, cap. 8: Biotransformation, Detoxification and Biodegradation, p. 161-195, 1995.

LAYIWOLA, P.J., LINNECAR, D.F.C. The biotransformation of [¹⁴C]phenol in some freshwater fish. **Xenobiotica**, v. 11, n. 3, p. 167-171, 1981.

LI, F.; JI, L.; LUO, Y.; OH, K. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver as affected by 2,4,6-trichlorophenol. **Chemosphere** v. 67, p. 13-19. 2007.

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.

MAJHI, S.K., NASKAR, S., MANDAL, B.K. Kinetic of alkaline phosphatase in liver, kidney, intestine and muscle tissue of red tilapia cultured under mid-hill altitudes of Meghalaya: North Eastern India. **Pak. J. Biol. Sci.** v. 9, p. 1112-1115, 2006.

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.

MILAN, N. Clorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. **J. Lipid Res.** v. 6, p. 431-433, 1965.

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. **Chemosphere**, v. 67, p. 2293-2304, 2007.

MOLINA, R., MORENO, I., PICHARDO, S., JOS, A., MOYANO, R., MONTERDE, J.G., CAMEÁN, A. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. **Toxicon** v. 46, p. 725-735, 2005.

MOTTA, V.T. Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações, 3ª ed, vol. 9, Porto Alegre: Editora Médica Missau, 388p, 2000.

NAGEL, R. Species differences, influence of dose and application on biotransformation of phenol in fish. **Xenobiotica**, v. 13, p. 101-106, 1983.

NAOUM, P.C. **Doenças que alteram os exames bioquímicos.** Ed. Atheneu, 149p, 2008.

NIKINMAA, M. How does environmental pollution affect red cell function in fish? **Aquat. Toxicol.**, v. 22, p. 227-238, 1992.

OKECHUKWU, E.O., AUTA, J. The effects of sub-lethal doses of Lambda-cyhalothrin on some biochemical characteristics of the african catfish *Clarias gariepinus*. **J. Biol. Sci.** v. 7, p. 1473-1477, 2007.

PERKINS, E.J., SCHLENK, D. *In vivo* acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of Aldicarb in channel catfish: Role of biotransformation in acute toxicity. **Toxicological Sciences** v. 53, p. 308-315, 2000.

PICKERING, A.D. (ed) **Stress and Fish**. London: Academic Press, 396 p., 1981.

PORAWSKI, M., WASSERMANN, G.F., ACHAVAL, M. Localization of acid phosphatase in testis of two teleostean species (*Oreochromis niloticus* and *Odontheistes perugiae*). **Braz. J. Biol.** v. 64, p. 853-858, 2004.

RAO, K.S.P., RAO, K.V.R. Changes in the tissue lipid profiles of fish (*Oreochromis mossambicus*) during methyl parathion toxicity – a time course study. **Toxicol. Lett.** V. 21, p. 147-153, 1984.

RAVICHANDRAN, S., ANANTHARAJ, B. Effect of phenol on the phosphomonoesterases and ATPase activity in the fish *Sarotherodon mossambicus* (Peters) in saline waters. **Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)** v. 93, p. 557-563, 1984.

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.

RICE, P.J.; DREWES, C.D.; KLUBERTANZ, T.M.; BRADBURY, S.P.; COATS, J.R. Acute toxicity and behaviour effects of chlorpyrifos, permethrin, phenol, strychnine, and 2,4-dinitrophenol to 30-day-old japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environ. Toxicol. Chem.** v. 16, p. 696-704, 1997.

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., FERNANDÉZ-VEGA, C., VILLARROEL, M.J., ANDREU-MOLINER, E., FERRANDO, M.D. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, doi: 10.1016/j.cbpc.2009.02.004, 2009.

SANCHO, E., FERRANDO, M.D., FERNÁNDEZ, C., ANDREU, E. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 41, p. 168-175, 1998.

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.

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.

SOUZA, L.S., POUHEY, J.L.O.F., BRITO, D.A.,PIEDRAS, S.N. Desempenho e sobrevivênciade Bagre americano (*Ictalurus punctatus*) e Jundiá (*Rhamdia* sp.), mantidos em confinamento no Rio Grande do Sul, Brasil. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 30, p.43-50, 2004.

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.

TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aquíicultura**. 1.ed., Jaboticabal-SP: FUNEP, 70 p., 1994.

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.

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 (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 69, p. 64–73, 2007.

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.

TRIPATHI, G., VERMA, P. Pathway-specific response to cortisol in the metabolism of catfish. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 136, p. 463-471, 2003.

TRIPATHI, P.K., SRIVASTAVA, V.K., SINGH, A. Toxic effects of dimethoate (organophosphate) on metabolism and enzymes system of freshwater teleost fish *Channa punctatus*. **Asian Fisheries Science** v. 16, p. 349-359, 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.

VELMURUGAN, B., SELVANAYAGAM, M., CENGIZ, R.I., UYSAL, E. Levels of transaminases, alkaline phosphatase, and protein in tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings exposed to sublethal concentrations of cadmium chloride. **Environmental Toxicology**, doi: 10.1002/tox, 2008.

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.

WELLBORN, T.L. Channel catfish Life history and Biology. **Southern Regional Aquaculture Center Publication** n° 180, 1988.

YIN, D., GU, Y., LI, Y., WANG, X., ZHAO, Q. Pentachlorophenol treatment *in vivo* elevates point mutation rate in zebrafish *p53* gene. **Mutat. Res.** v. 609, p. 92-101, 2006.

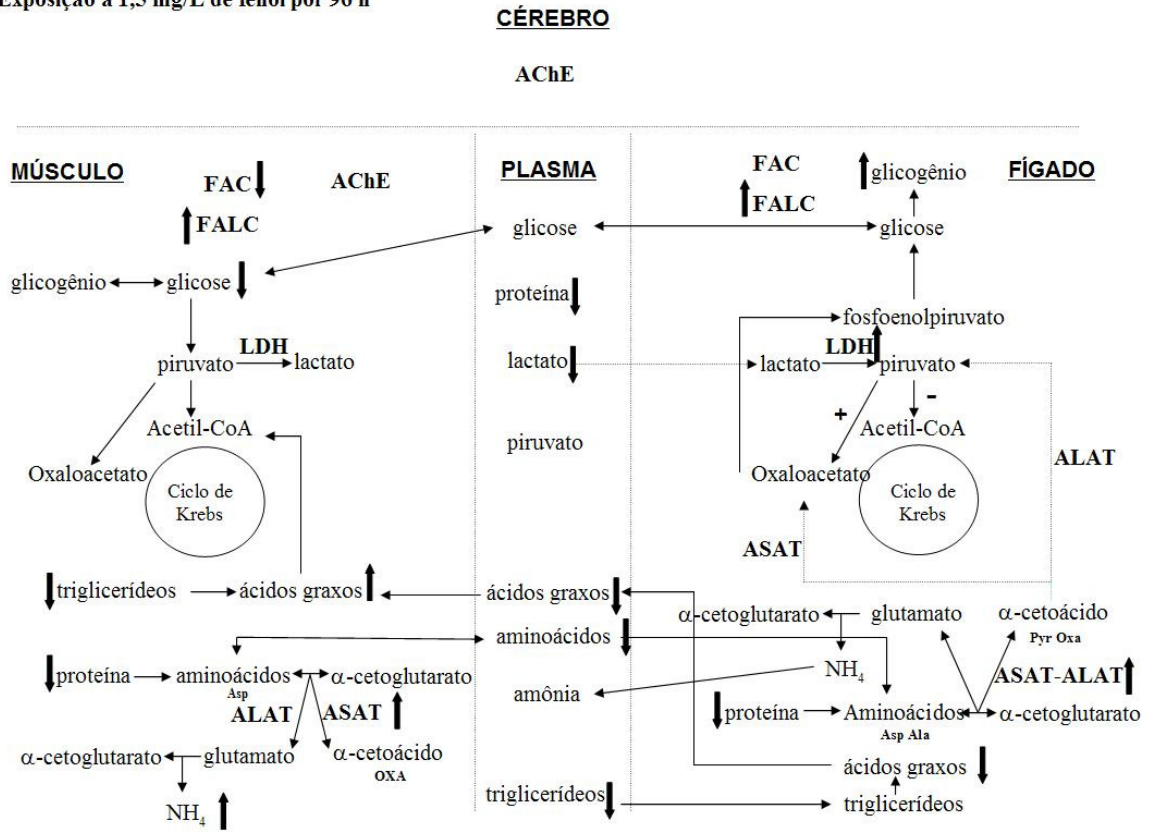
ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. p. 39-53.

ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere** v. 55, p. 167-174, 2004.

ZUCKER, E. **Standard evaluation procedure. Acute toxicity test for freshwater fish**. Hazard Evaluation Division. USEPA publication 540/9-85-006, Washington, 1985.

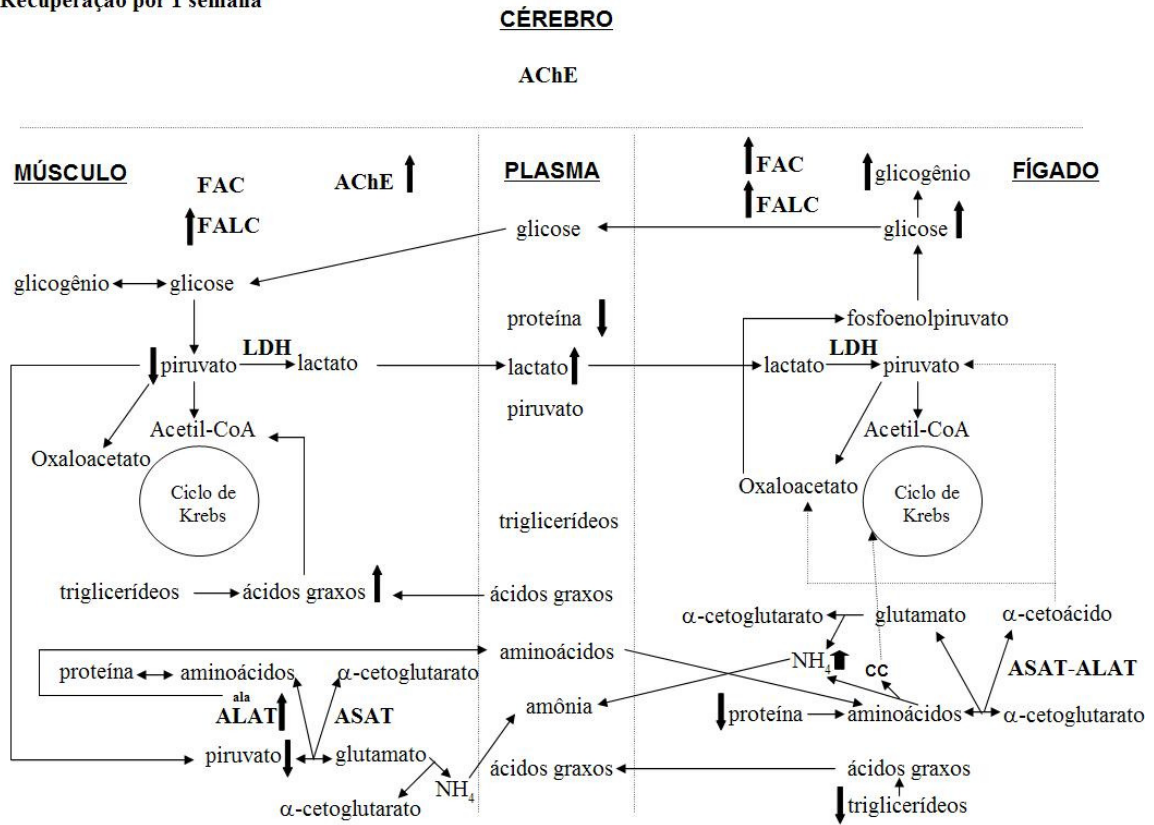
APÊNDICE A – Modelo do perfil metabólico do bagre do canal submetido a exposição sub-letal de fenol por 96 h.

Exposição a 1,5 mg/L de fenol por 96 h



APÊNDICE B - Modelo do perfil metabólico do bagre do canal após recuperação por 1 semana.

Recuperação por 1 semana



APÊNDICE C - Modelo do perfil metabólico do bagre do canal após recuperação por 14 dias.

Recuperação por 2 semanas

