

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

“METABOLISMO ANTIOXIDATIVO,
BIOTRANSFORMAÇÃO HEPÁTICA E ALTERAÇÕES
HISTOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*, SPIX
& AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) EXPOSTO AO FENOL”.

IVE MARCHIONI AVILEZ

São Carlos

2008

**“METABOLISMO ANTIOXIDATIVO,
BIOTRANSFORMAÇÃO HEPÁTICA E ALTERAÇÕES
HISTOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*, SPIX
& AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) EXPOSTO AO FENOL”.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA ADAPTATIVA

**“METABOLISMO ANTIOXIDATIVO,
BIOTRANSFORMAÇÃO HEPÁTICA E ALTERAÇÕES
HISTOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*, SPIX
& AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) EXPOSTO AO FENOL”.**

Ive Marchioni Avilez

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Professor Dr. Gilberto Moraes

São Carlos

2008

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

A958ma

Avilez, Ive Marchioni.

Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, SPIX & AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) exposto ao fenol / Ive Marchioni Avilez. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
155 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Toxicologia. 2. Bioquímica. 3. Estresse oxidativo. 4. Peixe. I. Título.

CDD: 615.9 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

“METABOLISMO ANTIOXIDATIVO, BIOTRANSFORMAÇÃO
HEPÁTICA E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO MATRINXÃ
(*Brycon amazonicus*, SPIX E AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE)
EXPOSTO AO FENOL”.

Tese de Doutorado de Ive Marchioni Avilez

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Moraes

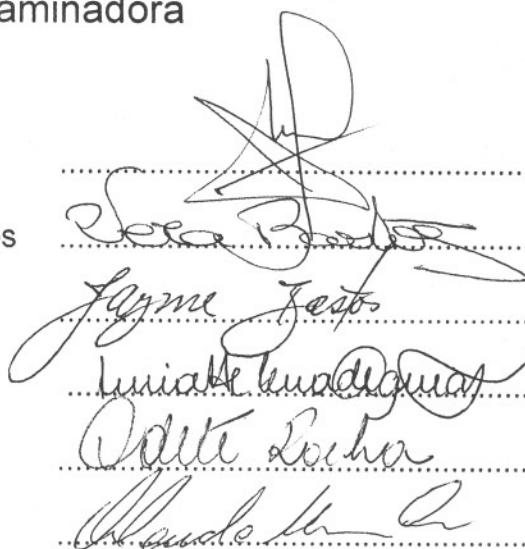
Profa. Dra. Vera Lucia Freire Cunha Bastos

Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

Profa. Dra. Lucia Helena de Aguiar

Profa. Dra. Odete Rocha

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho



.....
.....
.....
.....
.....
.....

Ive Marchioni Avilez

METABOLISMO ANTIOXIDATIVO, BIOTRANSFORMAÇÃO HEPÁTICA E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*, SPIX & AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) EXPOSTO AO FENOL

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

Aprovado em 10/01/2008

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Gilberto Moraes

(Orientador)

Co-orientador: Prof. Dr^a. Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos

(UERJ/ Rio de Janeiro)

1ºExaminador: Prof. Dr^a. Lucia Helena de Aguiar

(Unicep/São Carlos)

2ºExaminador: Prof. Dr^a. Odete Rocha

(UFSCar/São Carlos)

3ºExaminador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

(UERJ/ Rio de Janeiro)

4ºExaminador: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

(UFSCar/ São Carlos)

Dedico este trabalho
aos meus pais, Fátima e Edison,
minha irmã, Ingrid
e ao querido Marcus.

Agradecimentos:

Agradeço ao querido Prof. Dr. Gilberto Moraes pela orientação durante todos estes anos, pela possibilidade que me proporcionou, pelo incentivo profissional, mas acima de tudo agradeço pelo amigo que é.

À minha querida co-orientadora Professora Dr.^a Vera Lúcia Freire Cunha Bastos e ao Prof. Dr. Jayme Cunha Bastos Neto, por todo auxílio, dedicação e a ajuda que foram essenciais para que este trabalho fosse feito.

À Banca avaliadora desta tese por aceitar fazer parte desta tese e pelas contribuições.

Ao Laboratório de Toxicologia Bioquímica e ao Departamento de Bioquímica da UERJ por todo o apoio técnico dado a este trabalho, principalmente ao Lin, Aline, Frederico, Rafael, Roosevelt.

Ao Claudinei Cruz e ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal pelo apoio na área de histologia e pela amizade conferida.

Ao Laboratório de Bioquímica do Instituto de Física da USP/ São Carlos, principalmente à Bianca, pelo técnico para as ultracentrifugações.

À Valéria do Instituto Internacional de Ecologia pelo apoio e carinho.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro concedido através da bolsa e FAPESP pelo suporte financeiro dado ao processo 2003/07884-0.

À Piscicultura "Águas Claras" pela doação dos exemplares de matrinxã utilizados nesta tese.

À Luciana, Araceli, Cláudia, Tiago e Luis um agradecimento especial por toda a ajuda dada para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica, sem os quais este trabalho nunca teria sido realizado, tanto pelo apoio técnico e pela amizade: Araceli, Andressa, Cássia, Gustavo, Francine, Fernanda, Fernando, Graziêlê, José Fernando, Japinha, Joyce, Josi, Juliana, Lícia, Lívia, Lucas, Luciana, Luis, Rodrigo, Tímber, Thori e em especial ao Seu Toninho pela essencial ajuda, a qual é impossível enumerar.

Aos colegas do Departamento de Genética e Evolução principalmente para o pessoal do Laboratório de Imunogenética pelo apoio técnico e a secretaria do departamento.

As colegas do Programa de Genética e Evolução Rose, Regiane, Tatiana e Greisse por toda a paciência e ajuda.

Aos meus amigos: Ana Carolina, Ângela, Anselmo, Alessandra, Braw, Carolina, Carolzinha, Cristiane, Dani, Doug, DW, Eliaser, Erica, Fúlvio, Graziela, Holly, Iara, Jaca, Jaqueline, Katrina, Leo, Limão, Lúcia, Magda, Momenti, Nakama, Roger, This, Venâncio, entre tantos outros que estão aqui em meu coração.

À família da Vera e do Jayme por ter me recebido como um hóspede e me tratado como filha.

Aos amigos de São Paulo por todo apoio e, carinho e torcido por este trabalho.

À Candida, Gíba e família por todo o carinho.

Aos meus pais, a minha irmã e a minha família pela ajuda, incentivo, esforço, saudade e pela compreensão da ausência durante todos estes anos para que mais este passo pudesse ser dado.

Ao Cacá por todo amor, cumplicidade e carinho.

Aos meus queridos avós por todos os sorrisos e abraços.

RESUMO

A poluição é hoje um problema que afeta todos os ambientes inclusive o de água doce, e conseqüentemente, os organismos que vivem nele. Entre estes, os peixes formam um grupo de grande importância sob a perspectiva ecotoxicológica, pois é o maior dentre os vertebrados. O fenol é uma substância química exógena que está usualmente em concentrações acima da permitida por lei. Este xenobiótico é um composto orgânico e lipofílico e sua presença nos corpos de água se deve principalmente aos despejos de origem industrial, podendo causar ações tóxicas mesmo em baixas concentrações.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do fenol, 1) no metabolismo antioxidante eritrocitário e hepático, 2) na biotransformação hepática (fase I e fase II), 3) na atividade da acetilcolinesterase cerebral e na recuperação de 1 e 2 semanas, e 4) nas brânquias, fígado e rim, do ponto de vista histopatológico, em matrinxã, *Brycon amazonicus*, um teleosteo de água doce originário da bacia Amazônica que vem sendo amplamente cultivado no Estado de São Paulo. Foram realizados 3 ensaios; primeiro, a determinação da CL₅₀ de 96 horas. A partir deste dado, todos os outros experimentos foram feitos utilizando-se 10% da CL₅₀/96h, ou seja, um teste subletal. O segundo ensaio foi a exposição ao fenol por 96 horas para determinar seu efeito nas brânquias, fígado e rim. Por fim, foi feita uma exposição por 96 horas seguida da recuperação por 1 e 2 semanas para se determinar os efeitos do fenol sobre o metabolismo antioxidante (Vit C, SOD, CAT, GPX, GSH, G6PDH) eritrocitário e hepático, e a possível recuperação; a biotransformação hepática (fase I, EROD e ECOD e II, UDPGT e GST), e os efeitos sobre a atividade da acetilcolinesterase cerebral.

Os resultados obtidos mostraram que o fenol apresenta uma CL₅₀ de 17,40 mg/L, e que o matrinxã é um organismo bem sensível ao fenol. Com este dado utilizamos uma concentração de fenol de 2 mg/L durante os experimentos de exposição subletal. Os dados observados na avaliação histológica mostraram que o fenol ocasionou alterações mais intensas nas brânquias que no fígado e no rim, causando principalmente fusão apical e total da lamela secundária, com congestão sanguínea e edema subepitelial. No fígado foi possível observar um aumento no diâmetro dos capilares sinusóides e estase sanguínea, e no rim o fenol causou um aumento do espaço entre o glomérulo e a cápsula renal. No experimento de exposição ao fenol em concentração subletal posterior recuperação, verificamos um aumento nos valores de hematócrito no grupo exposto e no grupo recuperado por 1 semana. Estes dados, associados às lesões branquiais, sugerem que o matrinxã sofreu uma diminuição na absorção de oxigênio.

O metabolismo antioxidante eritrocitário não sugere estresse oxidativo durante a exposição ao fenol, aumentando somente a atividade da G6PDH, durante a exposição, e queda da atividade da CAT. Também não se observou estresse oxidativo durante a recuperação. Os resultados da análise do metabolismo antioxidante no fígado mostraram que não ocorreu estresse oxidativo após a exposição ao fenol. Todavia, após a recuperação, o aumento da atividade da GPx na primeira semana de recuperação e a redução na segunda semana sugerem estresse oxidativo. Observou-

se também uma redução na atividade da G6PDH após a segunda semana de recuperação. Estes dados corroboram os de biotransformação hepática que mostraram um aumento da atividade de EROD e ECOD na recuperação. A ocorrência de estresse oxidativo somente na recuperação pode ter sido ocasionada pelo aumento da atividade das enzimas da biotransformação de fase I, onde pode ocorrer produção de ERO. Além do mais, o fenol parece exercer um efeito inibidor de algumas enzimas após a exposição, levando à diminuição de UDPGT e GST, as quais aumentaram sua atividade na ausência de fenol. O fenol também mostrou ser um inibidor da atividade da UDPGT "in vitro", o que não ocorreu para a GST. Pode ter ocorrido também a inibição de EROD e ECOD durante a exposição. No cérebro a atividade da AChE também apresentou inibição após a exposição ao fenol, retornando aos valores normais após a recuperação. Entretanto, a concentração de vitamina C aumentou durante a exposição e a recuperação no cérebro, enquanto que no fígado observou-se redução. Estes dados mostram o grau de toxicidade do fenol para o matrinxã, mesmo em dose subletal, e a necessidade de redução de seu lançamento nos corpos de água para proteção desta espécie.

ABSTRACT

Pollution is nowadays a problem that affects all environments, including the freshwater and the species living in there. Among them, under the ecotoxicological point of view, fish are a relevant group and the biggest among vertebrates. Phenol is an exogenous chemical usually present in concentrations higher than those allowed by law. Phenol is an organic lipophilic xenobiotic that cause toxic effects even at low concentrations and its presence in freshwater results from discharge of industrial effluents.

The aim of the present study was to determine the phenol effects 1) in the liver and red blood cells antioxidant metabolism, 2) in the liver biotransformation (phase I and II), 3) in the brain acetylcholinesterase plus recovery of 1 and 2 weeks and 4) in gills, liver and kidney, under the histopathological point of view, in matrinxã, *Brycon amazonicus*, a freshwater teleost from Amazon basin, which is being widely cultivated in Sao Paulo state. For such, three assays were done. Firstly, the phenol LC₅₀ was determined for 96 hours. Second, the exposition to phenol was carried out for 96 h to determine its effects on gills, liver and kidney. At last, an experiment of exposure for 96 h, followed by recovery for one and two weeks, was carried out to determine its antioxidant effects on the liver and on the red blood cell metabolism (vitamin C, SOD, CAT, GPx, GSH and G6PDH); on two liver biotransformation phase I (EROD and ECOD) and phase II activities (UDPGT and GST) and brain acetylcholinesterase activity.

The LC₅₀ to phenol was 17, 40 mg/L, showing that matrinxã is a very sensitive species to phenol. From this, the phenol concentration used in all experiments was 2 mg/L. Histopathology observations showed that phenol affected harder the gills than liver and kidney, causing apical and total fusion of the secondary lamella plus blood congestion and sub epithelial edema. In the liver diameter increase of the sinusoidal capillaries and blood stasis was observed. In the kidney, phenol caused an increase of the space between glomerulus and capsule. A hematocrit increase was observed in fish exposed and recovery for one week. These results, associated to gill lesions, suggested that matrinxã endured a reduction in oxygen absorption.

Erythrocyte antioxidant metabolism did not suggest that matrinxã exposed to phenol was under oxidative stress. Only G6PDH activity was increased during exposure, while CAT activity was decreased in matrinxã 's erythrocytes. Also, oxidative stress was not observed after recovery. The antioxidant metabolism in liver was not affected after exposure, but after recovery, as it is suggested by the increase of GPx activity after first week of recovery followed by its decrease after second week.

Hepatic G6PDH also decreases after the second week. These results corroborated the hepatic biotransformation data, which was increasing in the EROD and ECOD activities. The occurrence of oxidative stress only after the recovery may be ascribed to the increase in the hepatic biotransformation enzymes of the phase I, wherein the ERO production occurs. Moreover, phenol might have an inhibitory effect on phase II enzymes after phenol exposure, as suggested by UDPGT and GST activities decreases. Phenol was capable of inhibiting UDPGT activity *in vitro*, an effect not observed with GST activity. An inhibition of EROD and ECOD activities should be

happened after exposition. The brain AChE activity was also inhibited after phenol exposure, regaining the control values after recovery. However, the vitamin C concentration increased after exposure and recovery, while a persistent decrease was observed in the liver after exposure and recovery.

These results demonstrated phenol toxicity to matrinxa and the need of limit matrinxã exposure to this xenobiotic.

Lista de figuras

FIGURA	Página
FIGURA 1 - <i>Brycon amazonicus</i> , matrinxã	8
FIGURA 2 - Fórmula Plana do fenol	10
FIGURA 3 - Caminho do fenol em peixes	13
FIGURA 4 - Esquema mostrando um modelo do caminho dos xenobióticos e seus possíveis efeitos (HODGSON, 2004)	14
FIGURA 5 - Esquema da biotransformação de xenobióticos em seres vivos	15
FIGURA 6 - Esquema mostrando a transferência de elétrons do NADPH para o citocromo P450, catalisada pela enzima citocromo P450 redutase (ORELLANA & GUAJARDO, 2004).	16
FIGURA 7 - Esquema simplificado do mecanismo de ação do citocromo P450	18
FIGURA 8 - Reação de conjugação envolvendo ácido glicurônico e a enzima UDPGT (HODGSON, 2004)	20
FIGURA 9 - Reação de conjugação envolvendo o sulfato e a enzima sulfotransferase (HODGSON, 2004)	21
FIGURA 10 - Glutathione reduzida (HODGSON, 2004)	22
FIGURA 11 - Reação de conjugação da glutathione reduzida com o CNDB realizada pela enzima glutathione - S - transferase (HODGSON, 2004).	22
FIGURA 12 - Principais produtos da biotransformação do fenol (HODGSON, 2004).	25
FIGURA 13 - Fórmula estrutural plana do ácido ascórbico	39
FIGURA 14 - Estrutura química do α -tocoferol (vitamina E)	40
FIGURA 15 - Estrutura do β -caroteno	41
FIGURA 16 - Esquema de produção de ERO, o sistema antioxidante enzimático e os danos causados as macromoléculas.	42
FIGURA 17 - Desenho experimental do teste de toxicidade do fenol em	

matrinxã após 96 horas	46
FIGURA 18 - Desenho experimental da exposição ao fenol I - avaliação da histologia de matrinxã	47
FIGURA 19 - Desenho experimental da exposição de matrinxã ao fenol II e da recuperação por uma e duas semanas em matrinxã	50
FIGURA 20 - Frequência de mortalidade de <i>Brycon amazonicus</i> exposto ao fenol para cálculo da CL ₅₀ de 96 horas. O valor de 50% de mortalidade calculada corresponde a 17,4mg/L.	70
FIGURA 21 - Brânquia de <i>B. amazonicus</i>	75
FIGURA 22 - Fígado de <i>B. amazonicus</i> HE	76
FIGURA 23 - Fígado de <i>B. amazonicus</i> PAS	77
FIGURA 24 - Rim de <i>B. amazonicus</i>	79
FIGURA 25 - Hematócrito (%) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	82
FIGURA 26- Hemoglobina total (g/dL) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	83
FIGURA 27 - Número de eritrócitos (bilhões/ mm ³) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	84
FIGURA 28 - Volume corpuscular médio (μmm ³) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	85
FIGURA 29 - Hemoglobina corpuscular médio (pg/célula) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	86
FIGURA 30 - Concentração de Hemoglobina corpuscular médio (%) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	87
FIGURA 31 - Ácido ascórbico hepático (μMol/g de tecido) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	88

FIGURA 32 - Ácido ascórbico cerebral ($\mu\text{Mol/g}$ de tecido) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	89
FIGURA 33 - Glutationa reduzida no sangue (nMol/mg de hemoglobina total) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	90
FIGURA 34 - Superóxido dismutase eritrocitária (U/mg de hemoglobina total) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	91
FIGURA 35 - Catalase eritrocitária (mol/min/g de hemoglobina total) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	92
FIGURA 36 - Glutationa peroxidase eritrocitária (mmol/min/g de hemoglobina total) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	93
FIGURA 37 - Glicose 6 fosfato desidrogenase eritrocitária (mmol/min/g de hemoglobina total) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	94
FIGURA 38 - Superóxido dismutase hepática (U/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	95
FIGURA 39 - Catalase hepática (mMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	96
FIGURA 40 - Glutationa peroxidase hepática (mMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	97
FIGURA 41-Glicose 6 fosfato desidrogenase hepática (mMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	98
FIGURA 42 - Acetilconesterase cerebral (mMol/min/mg de proteína)	

de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	99
FIGURA 43–Glutathione S transferase plasmática (mMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	100
FIGURA 44 - Glutathione S transferase (mMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	101
FIGURA 45 - Teste de inibição da Glutathione S transferase hepática (mMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol “in vitro” nas concentrações de 0,2, 1 e 2 mg/L	102
FIGURA 46 - Uridina difosfato glicuronosil Transferase (nMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	103
FIGURA 47 - Teste de inibição da Uridina difosfato glicuronosil Transferase hepática (nMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol “in vitro” nas concentrações de 0,2, 1 e 2 mg/L	104
FIGURA 48- 7 Etoxicumarina desetilase hepática (pMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2)	105
FIGURA 49 - 7 Etoxirosorufina desetilase hepática (pMol/min/mg de proteína) de matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec1 e Rec 2).	106

Lista de Tabelas

Tabela	Página
TABELA 1 - Densidade de matrinxã em cada caixa no início do teste de toxicidade de fenol (CL ₅₀) durante 96 horas.	46
TABELA 2 - Biometria dos matrinxãs no final do experimento da avaliação histológica após a exposição ao fenol por 96 horas.	47
TABELA 3 - Biometria dos matrinxãs do experimento de exposição ao fenol por 96 horas e da recuperação por uma e duas semanas.	48
TABELA 4 - Sobreviventes de <i>B. amazonicus</i> , matrinxã, submetidos ao CL ₅₀ -96h	70

Lista de Quadros

Quadros	Página
QUADRO 1 - Média e desvio padrão dos valores de qualidade de água durante o teste de toxicidade do fenol (CL ₅₀) por 96 horas para o matrinxã.	71
QUADRO 2 - Qualidade de água durante o experimento de exposição do matrinxã ao fenol (2mg/L) por 96 horas, para avaliação da histologia.	74
QUADRO 3 - Qualidade de água durante o experimento de exposição do matrinxã ao fenol por 96 horas e após a recuperação	81

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO	5
2.1 Considerações gerais	5
2.2 <i>Brycon amazonicus</i>	6
2.3 Fenol em ambientes aquáticos	8
2.3.1 Fenol	10
2.3.2 Toxicidade dos fenóis	10
2.4 Metabolismo de drogas ou xenobióticos	13
2.4.1 Biotransformação	14
2.4.2 Biotransformação de fase I	15
2.4.3 Biotransformação de fase II	19
2.4.4 Biotransformação do fenol em peixes	23
2.5 Distúrbios nos órgãos de peixes	26
2.5.1 Brânquias	26
2.5.2 Sangue	27
2.5.3 Fígado	28
2.5.4 Rim	29
2.5.5 Cérebro	31
2.6 Espécies reativas de oxigênio (ERO)	31
2.6.1 Oxigênio singlete - $^1\text{O}_2$	32
2.6.2 Radical superóxido - O_2^-	32
2.6.3 Peróxido de hidrogênio - H_2O_2	33
2.6.4 Radical hidroxila - OH^\cdot	33
2.7 Sistema de defesa antioxidante	35
2.7.1 Sistema antioxidante enzimático	35
2.7.2 Sistema antioxidante não enzimático	38
2.8 Estresse oxidativo	41
3 OBJETIVO	44

4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Desenho Experimental	45
4.1.1 Teste de toxicidade do fenol - CL ₅₀ /96h	45
4.1.2 Exposição ao fenol I - Avaliação dos tecidos	47
4.1.3 Exposição ao fenol II e recuperação	48
4.2 Parâmetros de qualidade de água	50
4.3 Preparações histológicas	52
4.4 Parâmetros Hematológicos	53
4.5 Antioxidantes não enzimáticos	55
4.6 Antioxidantes enzimáticos eritrocitários	56
4.7 Antioxidantes enzimáticos hepáticos	59
4.8 Biomarcadores cerebrais e plasmáticos de toxicologia	62
4.9 Enzimas de Biotransformação hepática	63
4.10 Proteína nos homogeneizados dos fígados	67
4.11 Análise Estatística	68
5 RESULTADOS	69
5.1 Teste de toxicidade aguda- CL ₅₀ /96h	69
5.2 Exposição ao fenol I - Avaliação histopatológica	72
5.3 Exposição ao fenol II - Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo, biotransformação hepática e recuperação.	80
6 DISCUSSÃO	107
6.1 Teste de toxicidade de fenol CL ₅₀ /96h	107
6.2 Experimento de exposição ao fenol por 96 horas - avaliação histopatológica.	108
6.3 Exposição ao fenol por 96 horas e recuperação	112
6.4 Considerações finais	127
7 CONCLUSÕES	129
8 REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

Os organismos aquáticos são cada vez mais utilizados como forma de avaliar a qualidade da água, pois eles estão intimamente ligados às variações do meio. Dentre os organismos aquáticos podemos destacar os peixes, pois são considerados os mais sensíveis (TISLER & ZAGORC-KONCAN, 1997).

O Brasil apresenta uma ictiofauna de água doce das mais variadas do mundo, e a aqüicultura é um ramo da agricultura que vem crescendo muito nos últimos anos, principalmente, na tentativa de diminuir a pesca predatória (BRASIL, 2007).

Algumas espécies de peixes vêm sendo estudadas e cultivadas nas cinco regiões do país. O matrinxã, *Brycon amazonicus*, um peixe teleósteo de água doce, é originário da bacia amazônica. É onívoro, apresenta um bom crescimento em cativeiro tanto na região norte do país quanto na região sudeste, tem ótima aceitação por ração comercial e apresenta um crescimento inicial rápido. É bem aceito no mercado, pois a sua carne é considerada de sabor agradável (ZANIBONI-FILHO et al., 2006). Com o crescimento da atividade industrial, tanto o matrinxã como outras espécies de peixes e organismos aquáticos, vêm sofrendo cada vez mais com a poluição de seu habitat, e poucos estudos foram realizados sobre os efeitos que estes poluentes causam às espécies, principalmente, para as espécies neotropicais como o matrinxã.

Segundo a Companhia de Tecnologia de Saniamento Ambiental (CETESB) (2003) o fenol é um dos poluentes mais frequentemente encontrados em concentrações acima da permitida pela Resolução CONAMA 357/2005 (0,003mg/L) (BRASIL, 2005b) nas bacias hidrográficas do Estado de São Paulo. E, é neste estado que tem aumentado significativamente a produção de matrinxã (BRASIL, 2007).

O fenol é um composto orgânico, conhecido também como ácido carbólico, hidro-benzeno, hidróxi-fenil e ácido fênico, produzido principalmente pelas indústrias: química, de óleo, de plásticos, de aço, de fibras sintéticas, de detergentes, de pesticidas, de beneficiamento de madeira, farmacêutica, de papel, de refinarias de carvão e petróleo, de explosivos e têxtil entre outras (BRUCE et al., 1987).

O fenol é considerado um xenobiótico, um composto químico estranho ao organismo ou aos sistemas biológicos, e é produto tóxico para os organismos. Ao homem pode causar cauterização local, náuseas, vômitos, dores na cavidade bucal, garganta e estômago, aumento de pressão arterial, desenvolvimento de quadro de coma, convulsão e edema pulmonar (CETESB, 2003), formação de metahemoglobina e hemólise de hemácias (BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004). Pode aumentar o potencial de ação de membranas ou transmissão sináptica, mostrando que é neurotóxico (KAILA, 1982), causa aumento de micronúcleos em ratos tendo ação genotóxica (JAGETIA & ARUNA, 1997; YU & ANDRESON, 1997). Compostos fenólicos causam mutações em hamster (TSUTSUI, 1997) e podem agir como doadores de elétrons, causando a oxidação de proteínas como a hemoglobina (WALLACE & CAUGHEY, 1975).

O fenol é mais tóxico em peixes que em bactérias e algas verdes unicelulares (TISLER & ZAGORC-KONCAN, 1997). Em peixes é também considerado lipofílico (NAGEL, 1983; MUKHERJEE et al., 1990; KISHINO & KOBAYASHI, 1995), seu modo de ação é considerado dose dependente e os efeitos multivariados para as diferentes espécies (SCHÜÜRMAN et al., 1997). Segundo SAHA e colaboradores (1999), o fenol causou uma queda no consumo de ração, diminuição de peso e da fertilidade de tilápia (*Oreochromis massambicus*). Alguns estudos verificaram que o fenol causa também alterações metabólicas em peixes (GUPTA, 1983; HORI et al., 2006). O fenol também causa sérias lesões teciduais em brânquias, no fígado e na pele de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (MITROVIC et al., 1968).

A ação do fenol também foi estudada por ROCHE e BOGÉ (1996 e 2000) os quais verificaram que o fenol, assim como outros fenóis derivados, causa o aumento da atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante levando do peixe *Dicentrarchus labrax* ao estado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando existe um aumento de substâncias oxidantes em relação as pró-oxidantes na célula. É possível verificar o estatus oxidativo de um tecido ou célula avaliando biomarcadores do sistema de defesa antioxidante, tais como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), além da concentração de glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico e alfa-tocoferol (SIES, 1991;

ABDALLA, 1993; VALAVANIDIS et al, 2006). Assim, o enfraquecimento dos sistemas de defesa antioxidantes ou o aumento de espécies oxidantes sem aumento das defesas pode resultar em lesões oxidativas sobre macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (SIES, 1991; ABDALLA, 1993; VALAVANIDIS et al, 2006). Estas alterações, quando na estrutura das proteínas, causam sua oxidação, principalmente dos grupos amina e tiol, levando à sua inativação. A oxidação do DNA pode alterar também a expressão dos genes (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003). As ERO também podem resultar na peroxidação de lipídios, gerando danos irreparáveis à célula e podendo levá-la à morte ou à diminuição da sua sobrevivência e levando o próprio organismo à morte (KOTKAT et al., 1999; VALAVADINIS et al, 2006).

O fenol, assim como outros xenobióticos, deve ser metabolizado pelos sistemas biológicos para ser transformado em um produto menos lipofílico, e então, poder ser excretado. Este processo de metabolização de drogas ou xenobióticos é chamado de biotransformação, e tem sua maior atividade no tecido hepático (PORTER & COON, 1991). O processo de biotransformação é dividido em duas fases. As reações fase I têm como objetivo introduzir ou expor grupos funcionais no xenobiótico através de reações de oxidação, redução ou hidrólise. Estes grupos funcionais os tornarão mais solúveis. As reações de fase II têm como objetivo conjugar o xenobióticos com moléculas como o ácido glicurônico, sulfato, glutathione reduzida, aminoácidos ou acetato. O conjugado formado normalmente é inativo ou menos ativo. Todavia o produto a ser excretado pode ter sido formado somente pela fase I ou fase II ou pelas duas fases (WILEY & SONS, 2004).

O fenol pode ser eliminado dos peixes na forma de fenol, hidroquinona, fenil sulfato, fenil glicuronídeo e hidroquinona sulfato (NAGEL & URICH, 1980; LAYIWOLA & LINNECAR, 1981, NAGEL, 1983; KOLANCZYK & SCHMIEDER, 2002; SOLEM et al., 2003).

Em peixes, particularmente com as espécies neotropicais, existem poucos estudos sobre o metabolismo antioxidante, o processo de biotransformação e os efeitos em peixes, entretanto, o ambiente aquático recebe diariamente muitos

poluentes, como o fenol, com potencial para causar estresse oxidativo (VALAVANIDIS et al, 2006). Este dano pode ser considerável em especial por serem os organismos aquáticos, pois estes são mais sensíveis aos tóxicos que os organismos terrestres (TISLER & ZAGORC-KONCAN, 1997).

A sensibilidade ao fenol é espécie específica e há poucas informações sobre as espécies de peixes neotropicais, e os poucos estudos existentes indicam que pode causar sérias alterações fisiológicas e bioquímicas, tais como, diminuição do consumo de alimento e conseqüente diminuição da capacidade de sobrevivência e estes fatores podem ser refletidos na população e na produção de peixes; este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do fenol em matrinxã, uma espécie de importante interesse econômico e ecológico.

2 REVISÃO

2.1 Considerações gerais

Os organismos aquáticos, como peixes, crustáceos, bactérias e algumas algas, vêm sendo cada vez mais utilizados como forma de avaliar a qualidade da água, pois eles estão intimamente ligados às variações do ambiente. Os peixes, por se mostrarem mais sensíveis a essas variações, têm sido considerados para esse tipo de avaliação os melhores indicadores (TISLER & ZAGORC-KONCAN, 1997).

O Brasil apresenta uma das maiores faunas de peixes de água doce do mundo, muitos apreciados para o consumo humano. Nas últimas décadas a piscicultura tem se despontado como uma forma alternativa de produção de peixe, que prioriza algumas espécies de interesse econômico e diminui a pesca predatória nos rios. Segundo a Secretária Especial de Pesca e Aqüicultura (BRASIL, 2007), o ramo da aqüicultura no Brasil tem apresentado um excelente crescimento de aproximadamente 9% ao ano quando comparado à pesca (1,4%) e a produção de animais terrestres (2,8%). O potencial do Brasil é imenso para a aqüicultura, pois apresenta uma área costeira de 8.400 km de costa marítima, 5.500.000 hectares de reservatórios de águas doces, aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta, clima extremamente favorável para o crescimento dos organismos cultivados, terras disponíveis e baratas na maior parte do país, mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (BRASIL, 2007). A piscicultura, segundo o MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (BRASIL, 2005a), no ano de 2004 já era responsável por 26,5% da produção nacional de pescado no Brasil, sendo a tilápia a espécie de maior produção nacional. Dentre as espécies mais produzidas pode-se citar a Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomun*), Curimbatá (*Prochilodus nigricans*) carpa (*Ciprinus carpio*), matrinxã (*Brycon amazonicus*) entre outros (BRASIL, 2007).

2.2 *Brycon Amazonicus*

O *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) (FIGURA 1) é um teleósteo de água doce originário da bacia amazônica, conhecido como matrinxã. O gênero *Brycon* pertence à família *Bryconidae*, ordem *Characiforme* e superordem *Ostariophysi*. O matrinxã era anteriormente chamado de *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869), porém novos estudos definiram que *B. cephalus* e *B. Amazonicus* eram a mesma espécie, e o nome mais antigo se manteve. (LIMA, 2007). *B. Amazonicus* é uma espécie cada vez mais cultivada no Estado de São Paulo, ao mesmo tempo em que há um crescente aumento da poluição de suas águas devido principalmente ao aumento da atividade industrial e agrícola (CETESB, 2007).

B. amazonicus é um peixe de piracema, portanto é reofílica, que necessita nadar contra a correnteza dos rios para migrar e realizar a desova, entre dezembro e fevereiro. No auge de seu desenvolvimento pode chegar a pesar 4 quilos e alcança sua maturidade sexual com cerca de três anos de idade. Seu corpo é alongado com uma coloração escura na região dorsal até o pedúnculo caudal. A região lateral e a parte ventral apresentam uma cor prateada intensa (FIGURA 1). As nadadeiras apresentam-se sempre com uma marcante pigmentação preta. A coloração desse animal varia muito pouco ao longo do seu desenvolvimento de jovem a adulto (ZANIBONI FILHO et al., 1986). É um peixe considerado onívoro com uma preferência a herbivoria. Uma análise do seu trato intestinal revela uma grande e variada quantidade de frutos e insetos (VAL & HONCZARYK, 1995).

O matrinxã, diferentemente de outros peixes amazônicos apresenta boa aceitação de ração comercial e vem sendo criado em diversas regiões do país. Por isso, hoje existe um interesse crescente sobre essa espécie devido a seu grande potencial para piscicultura (CASTAGNOLLI, 1992). Segundo ZANIBONI-FILHO e colaboradores (2006) o matrinxã tem ótima aceitabilidade no mercado, devido ao agradável sabor da carne, crescimento inicial rápido e de fácil manuseio. Além disso, por ser onívoro com tendência ao consumo de produtos de origem vegetal, sua ração pode ter um baixo custo, todavia a larvicultura apresenta um intenso grau de canibalismo. Desta forma estudos com o objetivo de melhorar o manejo da espécie

podem levar o matrinxã a se tornar tão competitivo no mercado como a tilápia (ZANIBONI-FILHO et al, 2006).

Esta espécie também tem respondido positivamente ao uso do exercício no seu cultivo, apresentando um melhor desempenho de crescimento com menor gasto protéico para a sua manutenção energética quando submetido ao exercício aeróbico de longa duração (nado contra a corrente), o que demonstra que boas práticas de manejo podem aumentar a velocidade de seu crescimento (HACKBARTH & MORAES, 2006; ROJAS; 2007).

O ambiente natural deste gênero no Brasil vem sendo ameaçado pelo o desmatamento da mata ciliar, pela construção de barragens nos rios para implantação de usinas hidroelétricas e a poluição industrial. Em seu ambiente natural, o gênero *Brycon* que vem sendo mais ameaçado é a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) na Região Sudeste, a piabanha (*Brycon insings*) no Rio Paraíba do Sul e o matrinxã (*B. amazonicus*) na bacia amazônica (MENDONÇA, 1996).

Com relação à pesca, em 1997, 5300 toneladas de matrinxã foram capturadas no Brasil, sendo 70% capturado no estado do Amazonas (BRASIL, 1997). O comércio de matrinxã representa 7% do total de peixes consumidos nessa região. Se, por um lado, esse número mostra a importância do pescado para a economia de algumas regiões, ele também é representativo do grande impacto que a pesca causa nos estoques naturais. Neste cenário, a piscicultura pode surgir como uma alternativa viável à pesca. Matrinxã é criado principalmente na região norte, com maior destaque para o estado do Amazonas e na região sudeste, no estado de Minas Gerais e São Paulo (BRASIL, 2007).

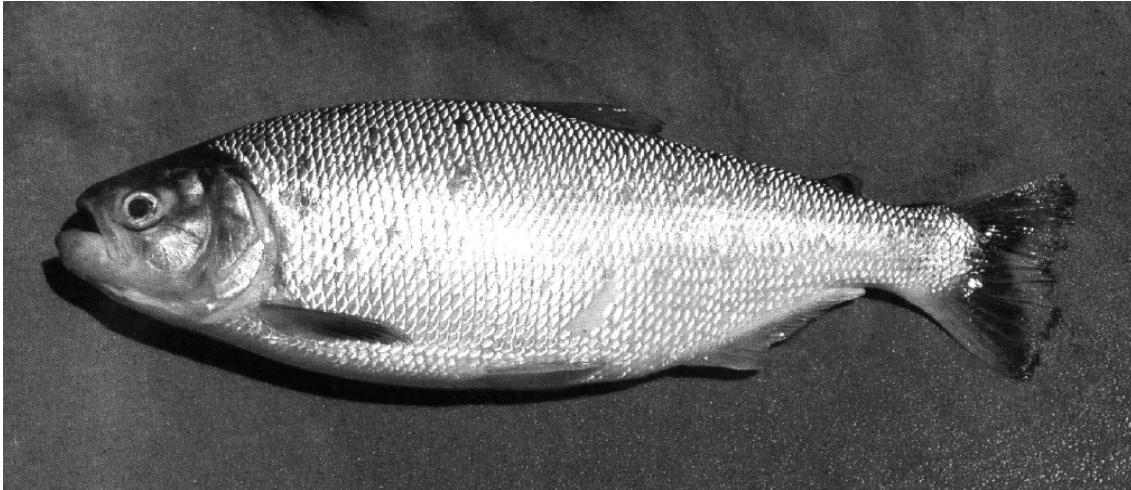


FIGURA 1- *Brycon amazonicus*, matrinxã

2.3 Fenol em ambientes aquáticos

O Relatório da CETESB sobre a qualidade de água do Estado de São Paulo do ano de 2002 (CETESB, 2003) indicou que os valores de fenol estavam acima do valor máximo permitido pela legislação dada pela Resolução CONAMA da época, n. 20/1986 (BRASIL, 1986), que era de 0,001 mg/L. A Cetesb verificou, em avaliações ao longo do ano, que em várias bacias hidrográficas do estado este produto químico estava em concentrações elevadas.

No início deste projeto o máximo permitido pela legislação brasileira, dada pela Resolução CONAMA n. 20 (BRASIL, 1986) para os níveis de fenóis para água de classe I, (destinadas à proteção da vida aquática entre outras) eram de 0,001 mg/L. Esta resolução regulamentava uma série de substâncias, determinando a concentração máxima permitida das mesmas nas diferentes classes de água. O valor que era permitido para fenóis é considerado super tóxico segundo o índice de toxicidade do VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION (1999). Entretanto, em 2005 foi homologada uma nova resolução CONAMA número 357 (BRASIL, 2005b), para regulamentar novos valores, e a concentração máxima permitida de fenóis totais em águas da classe I, que são as destinadas à conservação da vida aquática, passou para 0,003 mg/L. A Resolução CONAMA sofreu uma série de alterações, segundo a

CETESB (2007) representou importantes avanços em termos técnicos e institucionais para a gestão de recursos hídricos e o controle de poluição, entre eles:

- Modernização do texto legal;
- Utilização dos ensaios ecotoxicológicos e toxicológicos, como parâmetros de avaliação de água, além das tradicionais variáveis físico-químicas, promovendo uma abordagem mais abrangente para o controle da poluição.
- Inserção de mais 180 variáveis de qualidade de águas e revisão das atuais;
- Inserção de um capítulo mais completo de definições.
- Definição mais clara e objetiva para os usos estabelecidos, para cada uma das classes de água.
- Estabelecimento de novas classes para águas salinas e salobras, ampliando as possibilidades de gestão ambiental dos recursos hídricos nos ecossistemas aquáticos (CETESB, 2007).

Atualmente a nossa legislação segue o padrão da legislação Norte Americana (EPA-US, 2007), na qual o valor máximo permitido de fenol também é de 0,003 mg/L.

Entretanto, os valores encontrados do fenol nas bacias hidrográficas do estado de São Paulo, variavam entre valores maiores que 0,001 mg/L como, por exemplo, na bacia da Mantiqueira e, de 0,003 mg/L até 0,011 mg/L na maioria das outras bacias (Pardo, Piracicaba/ Capivari/ Jundiaí, Alto Tiete, Baixada Santista, Mogi-Guaçu, Sorocaba/ Médio Tietê, Ribeira-Iguapé, Baixo Pardo, Turvo/ Grande, Tiete/batalha, Médio Paranapanema, Baixo Tiete, Aguapeí, Peixe) e chegando a valores de 0,53 mg/L no Pontal de Paranapanema (CETESB, 2005).

Estudos sobre a toxicidade aguda para o fenol para as espécies brasileiras são escassos e, mesmos assim, a legislação foi modificada aumentando em 3 vezes os valores previamente estabelecidos. Sendo assim, não sabemos até que ponto essa modificação na lei gerará importantes avanços em termos técnicos e institucionais para a gestão de recursos naturais.

2.3.1 Fenol

O fenol é um composto que está presente em diversos efluentes industriais de diversos tipos, tais como: indústria química, de óleo, de aço, de plástico, de fibras sintéticas, de detergentes, de pesticidas, indústrias de beneficiamento de madeira, indústrias farmacêuticas, produtoras de papel, refinarias de carvão e de petróleo; indústrias de explosivos e têxteis entre outras (BRUCE et al, 1987). Além disso, o fenol é produto intermediário do metabolismo do benzeno, outro composto aromático freqüentemente encontrado em efluentes industriais, principalmente em processos ligados a combustíveis fósseis (JENNINGS et al 1996).

Em países altamente industrializados com os Estados Unidos da América, por exemplo, mais de 1,361 bilhões de quilos de fenol são produzidos por ano (SRI, 1988). A exposição dos peixes ao fenol pode se dar não só em corpos d'água naturais, mas ainda em sistemas artificiais de cultivo, tais como as pisciculturas, pois estes poderão utilizar água que pode estar contaminada pelo fenol.

2.3.2 Toxicidade dos Fenóis

O fenol (FIGURA 2), também conhecido como ácido carbólico, ácido fênico, hidroxibenzeno e hidroxifenil, é um composto orgânico e lipofílico, que geralmente não ocorre naturalmente nos corpos de água. É considerado um xenobiótico, portanto, um produto tóxico para os organismos vivos, sendo menos lipossolúvel que os seus derivados como os nitrofenóis, alquilfenóis e clorofenóis (KISHINO & KOBAYASHI, 1996). O fenol é também um dos intermediários do metabolismo de benzeno, que também é muito tóxico (HIRAKU & KAWANISHI, 1996).

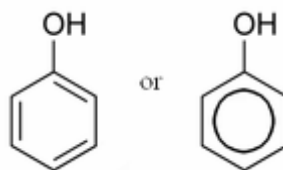


FIGURA 2 - Fórmula Plana do fenol

Estudos sobre o acúmulo de fenol em tecidos de peixes foram realizados por MUKHERJEE e colaboradores (1990), e demonstraram que o fenol se acumulou em alguns tecidos de *Ciprinus carpio* (carpa). NAGEL (1983) também verificou uma concentração de 10 mg de fenol /kg em peixe-dourado (*Carassius auratus*) após 20 minutos da exposição a um meio contendo fenol a 20 mg/L . Outro estudo realizado com pentaclorofenol (PCP) mostrou que após uma exposição de 96 horas, a uma concentração de 0,1 mg/L, o fígado da enguia européia (*Anguilla anguilla*) apresentou uma concentração de PCP 300 vezes maior do que a ambiental, e que traços de PCP ainda foram encontrados no fígado, mesmo após 69 dias de recuperação (HOLMBERG et al., 1972). O fenol pode ser excretado, na forma de fenol, ou fenil sulfato ou fenil glicuronídeo (NAGEL, 1983).

Para o homem, o fenol é considerado um grande veneno trófico, causando efeito de cauterização no local com que entra em contato. Os resultados de intoxicação são; náuseas, vômitos, dores na cavidade bucal, na garganta e estômago. Inicialmente, há uma excitação seguida de depressão, queda de pressão arterial, desenvolvimento de coma, convulsão e edema dos pulmões (CETESB, 2003). Nas hemácias de humanos o fenol e o catecol podem causar hemólise e metahemoglobinemia (BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004), porque, assim como alguns compostos fenólicos, o fenol pode reagir com a hemoglobina, agindo como doador de elétrons, causando a autoxidação da hemoglobina em metahemoglobina, sendo a hidroquinona e o resorcinol os maiores doadores de elétrons (WALLACE & CAUGHEY, 1975). Segundo estes autores, os fenóis entre outras drogas “oxidantes” causam a formação de peróxidos através da doação de um elétron para o oxigênio (O₂) e o outro elétron é doado pelo ferro da hemoglobina, causando a formação de metahemoglobina e de peróxido.

Alguns estudos indicam que os fenóis também podem afetar a respiração mitocondrial, o potencial de membrana ou a transmissão sináptica, o que explica a sua neurotoxicidade (KAILA, 1982). A hidroquinona também pode causar uma ação genotóxica em ratos, pois há um aumento na frequência de micronúcleos (JAGETIA & ARUNA, 1997; YU & ANDERSON, 1997), entretanto, embriões de hamster mostraram ser mais sensíveis ao catecol que ao fenol, à hidroquinona e ao benzeno.

Estes mesmos quatro tipos de fenóis causaram mutações em genes em células embrionárias de hamster (TSUTSUI et al, 1997).

A linhagem de células de eritroblastos de galinha HD3 expostas ao fenol, benzeno e catecol mostrou que estes tóxicos têm potencial para causar alterações morfológicas dos leucócitos (WAN & WINN, 2004). A ação estrogênica nas células cancerígenas de origem mamária da linhagem MCF-7 foi verificado na presença de bromofenóis (OLSEN et al., 2002).

Existem poucos estudos que mostram quais são os efeitos do fenol nos organismos aquáticos. Porém, o fenol é mais tóxico para os peixes que para bactérias e algas verdes (clorofitas) unicelulares (TISLER & ZAGORC-KONCAN, 1997), e seu modo de ação varia para diferentes espécies, assim como, seus efeitos são dose-dependente (SCHÜÜRMAN et al., 1997).

A entrada do fenol é feita passivamente pelas brânquias como foi observado em peixe-dourado *C. auratus* (KISHINO & KOBAYASHI, 1996). Esses autores sugerem que nos peixes ocorre a formação de uma ponte de hidrogênio entre o grupo OH dos fenóis e componentes da membrana da brânquia, e que essa interação química desempenha um papel relevante no processo de absorção dos clorofenóis.

Os fenóis de modo geral podem fazer com que haja uma queda no consumo de ração, no peso e na fertilidade em tilápia *O. mossambicus* (SAHA et al., 1999). Alguns estudos indicam que o fenol causa mudanças no metabolismo de carboidrato e de proteína em *Notopterus notopterus* (GUPTA et al., 1983). Este mesmo resultado foi encontrado em matrinxã exposto ao fenol, no qual foi verificado um aumento no catabolismo de proteínas e carboidratos (HORI et al., 2006).

CHAGNON E HLOHOWSKYJ (1989) verificaram que a exposição de peixe *Campostoma anomalum* a concentrações subletais de fenol causou uma diminuição à da tolerância às variações de temperatura. Em carpas, *C. carpio*, o fenol levou a um decréscimo do índice gonadossomático e um aumento nos valores de colesterol no ovário, indicando uma redução da produção de estrógenos (KUMAR & MUKERJEE, 1988). Também em carpa, um outro estudo comparando fenol, hidroquinona e catecol mostrou que a hidroquinona é imunotóxica (TAYSSE et al., 1995).

2.4 Metabolismo de drogas ou xenobióticos

Os xenobióticos, além de serem absorvidos pelas brânquias, como é o caso do fenol, também podem entrar pelo sistema digestório através da alimentação ou ingestão de água. Após a absorção, os xenobióticos são transportados pelo sangue, e assim, alcançam todos os órgãos do peixe, podendo se estocar nas gorduras, no fígado, no rim e no músculo (FIGURA 3) (HEATH, 1987).

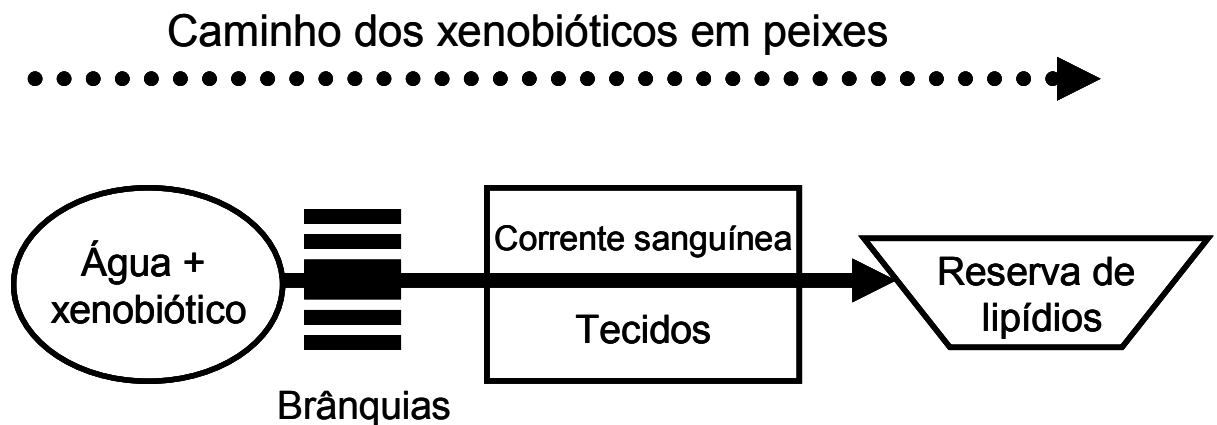


FIGURA 3 - Caminho do fenol em peixes.

Os xenobióticos podem entrar em contato direto com macromoléculas, interagindo com DNA, proteínas e lipídios causando efeitos genotóxicos, oxidação de proteínas e peroxidação de lipídios. Os xenobióticos também podem formar espécies reativas de oxigênio, que também causam danos às moléculas de DNA, proteínas, como também causam peroxidação de lipídios das membranas das células. Todos estes processos podem levar a uma diminuição da atividade do sistema imunológico, tornando o organismo mais susceptível às doenças, podendo diminuir a capacidade de reprodução, e assim atingir a população. Alguns xenobióticos, além de se serem lipofílicos, e se bioacumularem por um tempo no organismo, podem também se biomagnificar, permanecendo na cadeia trófica, como mostra a FIGURA 4 (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003).

O Matrinxã é um peixe de piracema e necessita metabolizar os lipídios durante a fase reprodutiva. Como o fenol tem capacidade lipofílica, ele também pode causar intoxicação durante este período de reprodução, diminuindo até a progênie, pois nesta fase sabemos que os peixes utilizam a sua reserva de lipídios para este processo.

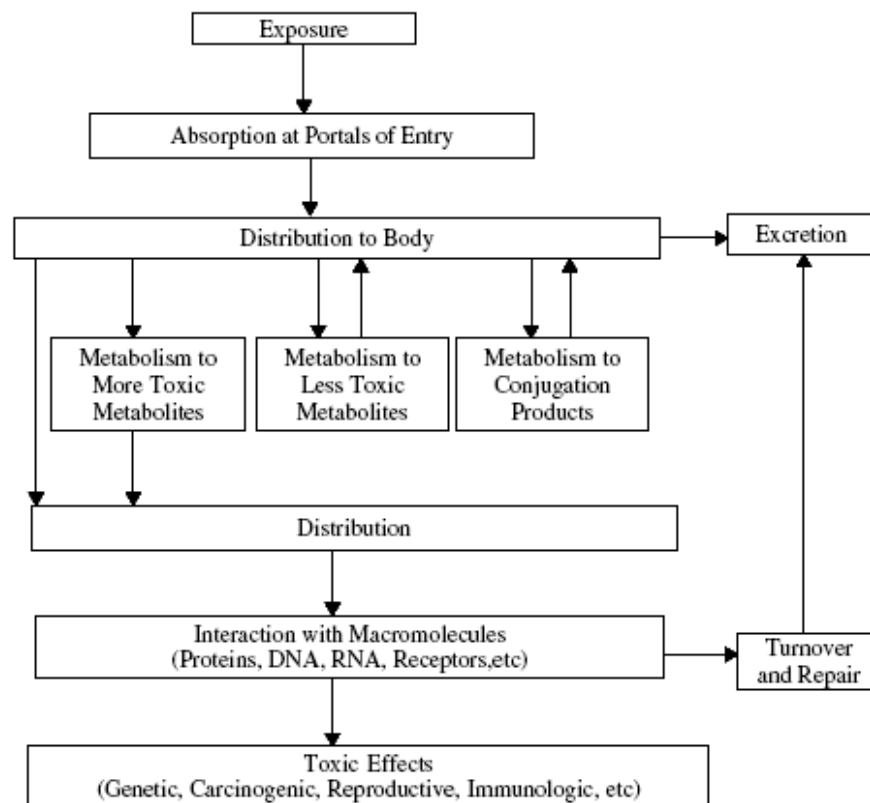


FIGURA 4 - Esquema mostrando um modelo do caminho dos xenobióticos e seus possíveis efeitos (HODGSON , 2004).

2.4.1 Biotransformação

Os xenobióticos, assim como o fenol, os fármacos e também alguns endógenos, tais como, esteróides, ácidos graxos insaturados como os eicosanóides e ácido retinóico precisam ser metabolizados para serem eliminados com maior facilidade pelos rins e brânquias. O objetivo desta metabolização é torná-lo mais hidrofílico para facilitar a sua excreção (PORTER & COON, 1991), permitindo que ele fique pouco tempo dentro do organismo, a fim de evitar e /ou diminuir seus efeitos (FIGURA 5). Na maioria das vezes estes processos transformam os xenobióticos em

produtos menos tóxicos, porém em alguns casos os produtos biotransformados são mais tóxicos que a substância original, como é o caso, por exemplo, dos produtos de biotransformação do paration e do benzo[a]pireno. Muitos fármacos são na realidade pró-fármacos que ao serem metabolizados tornam-se ativos.

Esta metabolização dos xenobióticos é chamada de biotransformação e ela pode ocorrer em vários tipos celulares como as células do trato intestinal e rins, mas, ela ocorre principalmente no fígado. O metabolismo dos xenobióticos é chamado de biotransformação e é dividido em fase I e fase II. Em geral, as reações de fase I introduzem ou expõem um grupo funcional no xenobiótico e as reações da fase II são de conjugação com compostos endógenos. A conjugação é uma ligação covalente entre o grupo funcional do xenobiótico com, por exemplo, um ácido glicurônico, um sulfato, uma glutatona reduzida, um aminoácido ou um acetato. Geralmente o conjugado é inativo. Todavia, o produto a ser excretado pode ser formado somente pela fase I ou fase II ou pelas duas fases (HODGSON , 2004).

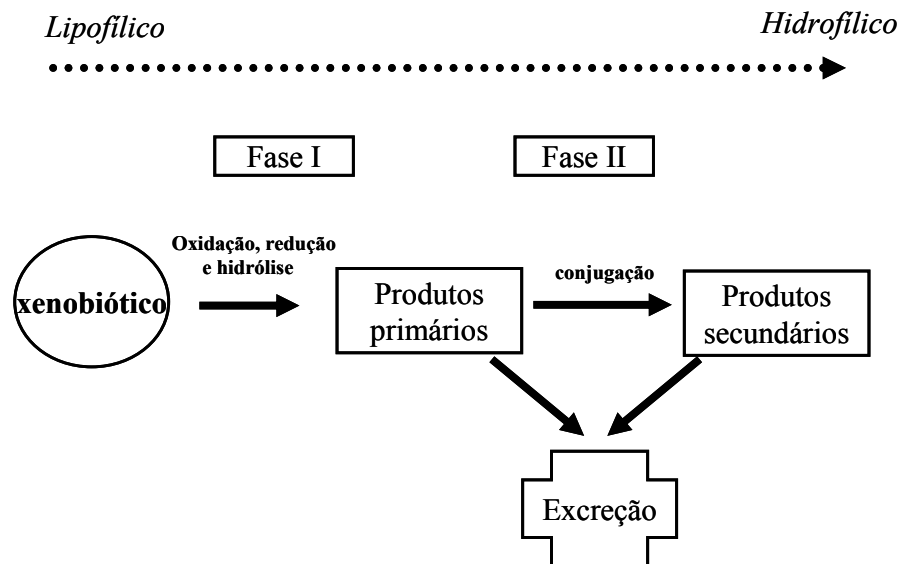


FIGURA 5 - Esquema da biotransformação de xenobióticos em seres vivos.

2.4.2 Biotransformação de fase I

A monooxigenação catalisada pela família dos citocromo P450 é a principal reação da fase I do metabolismo dos xenobióticos. Esta família está ligada a uma

família de genes presente em quase todos os seres vivos, e dada a evolução, hoje essas enzimas são capazes de realizar ligações com diferentes tipos de xenobióticos. As enzimas de citocromo P450 são hemoproteínas de membrana, que apresentam seu grupo heme localizado na membrana do retículo endoplasmático liso das células. Estas hemoproteínas, em mamíferos ficam muito próximas de outra proteína da membrana, a NADPH citocromo P450 redutase, em uma razão de aproximadamente 10 moléculas de citocromo P450 para uma de redutase (GILMAN, 1996).

A P450 redutase é uma flavoproteína e contém quantidades equimolares do mono nucleotídeo flavina (FMN) e do dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD), que servem como doadores de elétrons necessários para as reações de óxido-redução. A interação do citocromo P450 com a P450 redutase é facilitada pela camada de lipídios na qual estão contidos (FIGURA 6).

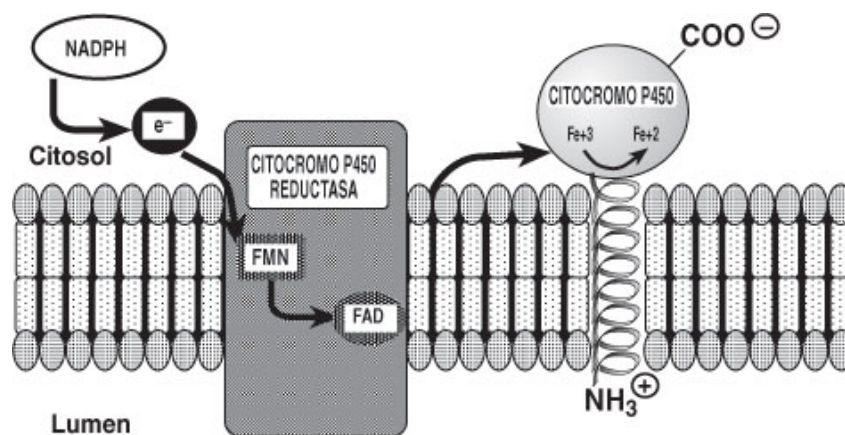
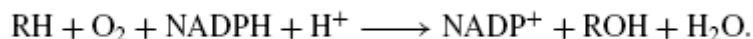


FIGURA 6 - Esquema mostrando a transferência de elétrons do NADPH para o citocromo P450, catalisada pela enzima citocromo P450 redutase (ORELLANA & GUAJARDO, 2004).

As reações de óxido-redução catalisadas pelo sistema de monooxigenases microsossomais requerem a hemoproteína de citocromo P450, a NADPH citocromo P450 redutase, o NADPH e o oxigênio molecular. O objetivo do sistema de monooxigenases é oxidação, nas quais um átomo de oxigênio molecular é reduzido a água e o outro é incorporado ao substrato (RH), tornando este, por sua vez, mais reativo e hidrossolúvel e, sendo o NADPH o doador de equivalentes de redução.



O xenobiótico, enquanto substrato, reage com a forma oxidada (Fe^{3+}) do citocromo P450 para formar um complexo enzima-substrato. O citocromo P450 redutase aceita um elétron do NADPH que, por sua vez, reduz o complexo oxidado citocromo P450-xenobiótico. O complexo citocromo P450 substrato reduzido (Fe^{2+}) reage, então, com oxigênio molecular e com um outro elétron do NADPH doado através da mesma flavoproteína redutase para formar uma espécie de oxigênio ativado (GOAPTAR et al., 1995).

Quando o ferro é reduzido, ele pode se ligar ao monóxido de carbono (CO) e passa a absorver luz no comprimento de onda de 450 nm (GOAPTAR et al., 1995) o que confere o nome de citocromo P450. Nas etapas finais, um átomo de oxigênio é liberado como água e o outro é transferido para o xenobiótico. Após a liberação do substrato oxidado, a enzima citocromo P450 é regenerada. Durante as reações em que o ferro é reduzido pode ocorrer o vazamento de espécies reativas de oxigênio, como mostra a FIGURA 7 (PORTER & COON, 1991; WINSTON 1991; HODGSON, 2004; VALAVADINIS et al, 2006). As espécies reativas de oxigênio que podem ser formadas são ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (GOEPTAR et al., 1995). As biotransformações oxidantes catalisadas pelas monooxigenases do citocromo P450 incluem ainda a hidroxilação de cadeia aromática lateral; N-, O-, S-desalquilação; N-oxidação, sulfoxidação; N-hidroxilação, desaminação; desalogenação e dessulfatação (PORTER & COON, 1991).

Existem outras enzimas oxidativas que são a monoaminoxidase (MAO) e a diaminoxidase (DAO) que são mitocondriais e desaminam por oxidação aminas primárias e aldeídos. A MAO está envolvida no metabolismo das catecolaminas e alguns antidepressivos são seus inibidores, e podendo interferir no metabolismo de outras drogas. A DAO metaboliza histamina (HODGSON, 2004).

Foram identificadas 18 famílias de genes do citocromo P450 nos seres humanos e, com frequência, existem várias enzimas do citocromo P450 em uma

única célula. O sistema de classificação padrão da família multigênica dos citocromos P450 baseia-se na semelhança da seqüência de aminoácidos das proteínas individuais. Os membros de uma família de genes possuem mais de 40% de aminoácidos semelhantes. Uma determinada família de citocromo P450 divide-se em subfamílias, de modo que as seqüências protéicas dentro da mesma família têm semelhança superior a 55%. As famílias 1, 2 e 3 de genes de citocromo P450 (CYP1, CYP2, CYP3) codificam as enzimas que participam da maioria das biotransformações (GILMAN, 1996).

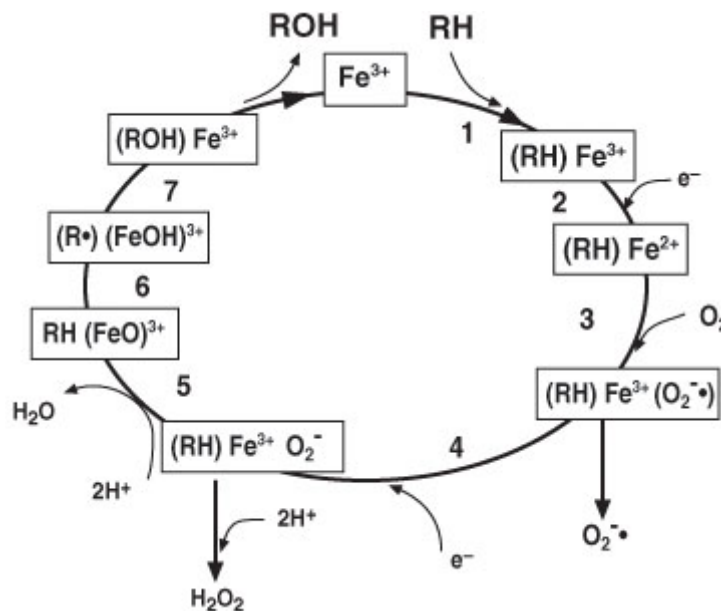


FIGURA 7 - Esquema simplificado do mecanismo de ação do citocromo P450. Neste ciclo, inicialmente, o citocromo aparece com o ferro oxidado, RH e ROH são o substrato e o produto, respectivamente. É um ciclo de oxido-redução, com a geração de O_2^- e H_2O_2 (ORELLANA & GUAJARDO, 2004).

Segundo WINSTON (1991), o metabolismo de desintoxicação de xenobióticos de peixes é muito similar ao de mamíferos. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) entre outros também foi identificada a família CYP1A, indicando que as enzimas envolvidas durante a biotransformação de fase I são bons indicadores de aumento de poluentes na água com benzo[a]pireno, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos entre outros (MURPHY & GOOCH, 1997; WILLIAMS et al, 1998; JUNG et al, 2000).

Uma das formas de se medir a atividade das monooxigenases hepáticas é através a atividade específica da enzima 7-etoxicumarina-O-desetilase (ECOD), pois em humanos, o substrato etoxicumarina pode ser usado “in vitro” para medida da atividade do CYP da subfamília 2A. Esta enzima faz a O-desalquilação da 7-etoxicumarina em 7-hidroxi-cumarina e etanal (ORELLANA & GUAJARDO, 2004). A 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) é a forma de determinar a atividade do CYP da subfamília 1A que faz a O-desalquilação da 7-etoxiresorufina em 7-hidroxi-resorufina e etanal (ORELLANA & GUAJARDO, 2004).

Segundo STEGEMAN (1989), em peixes a etoxiresorufina é metabolizada pela enzima codificada pelo CYP1A1, e que a seqüência de aminoácidos desta enzima em peixe é homologa à CYP1A1 e CYP1A2 de mamíferos. Em peixes é comum medir CYP pela atividade da EROD e da ECOD como biomarcadoras, principalmente, em ambientes contaminados (MURPHY & GOOCH, 1997; BAINY et al, 1999; MALMSTRÖM et al., 2004). Em truta arco-íris, *O. mykiss*, expostas a β -naftolflavona e 2,3,7,8 tetraclorodibenzeno-p-dioxina houve um aumento da atividade de EROD no fígado (PERSONEN & ANDERSON, 1991).

Outra forma de medir a atividade do citocromo P450 é medir diretamente a concentração do citocromo P450. LEITÃO e colaboradores (2000) mediram a concentração deste em matrinxã, assim como, a atividade da EROD. Apesar de o matrinxã apresentar uma concentração total de citocromo P450 menor quando comparada a outros peixes, esses autores observaram uma atividade de EROD consistente com a atividade descrita para peixes ou mesmo para ratos.

2.4.3 Biotransformação de fase II

As reações da fase II são as de conjugação. A principal característica destas reações é a sua necessidade de energia.

2.4.3.1 Uridina difosfato glicuronosil transferases (UDPGT)

A glicuronidação é a reação de conjugação mais importante em termos quantitativos. A uridina difosfato glicuronosil transferases (UDP-glicuronosil transferases) catalisa a transferência de uma molécula de ácido glicurônico ativada para álcoois aromáticos e alifáticos, ácidos carboxílicos, aminas e grupos sulfidrilas livres de compostos exógenos para formar os conjugados O-, N- e S- glicuronídeos (FIGURA 8). A maior solubilidade dos conjugados de glicuronídeos facilita sua eliminação na urina ou na bile. Ao contrário de muitas reações da fase II, que são citoplasmáticas, as UDP-glicuronosil transferases são microsômicas (GILMAN, 1996).

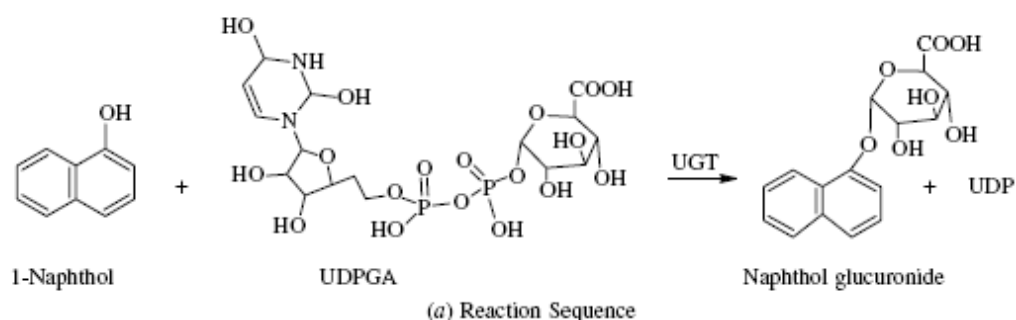


FIGURA 8 - Reação de conjugação envolvendo ácido glicurônico e a enzima UDPGT (HODGSON, 2004).

Em peixes, existem múltiplas isoformas de UDPGT com função similar e propriedades semelhantes às dos mamíferos (CLARKE et al 1992b). A atividade desta enzima pode ser encontrada no tecido hepático, renal, intestinal e branquial, sempre na fração microsomal, sendo a hepática a de maior atividade (CLARKE et al., 1992a). A atividade da UDPGT foi induzida em truta arco-íris pela β -naftoflavona, assim como o aumento da atividade da EROD, a expressão do mRNA para CYP1A1 e GST (CELANDER et al, 1993).

2.4.3.2 Sulfotransferase - SULT

A sulfatação também é uma reação importante de conjugação para os grupos hidroxila. As sulfotransferases (SULT) citoplasmáticas catalisam a reação de transferência do enxofre inorgânico da molécula doadora 3' -fosfoadenosina -5' fosfossulfato (PAPS) ativada para o grupo hidroxila de fenóis e álcoois alifáticos (FIGURA 9) (GILMAN, 1996).

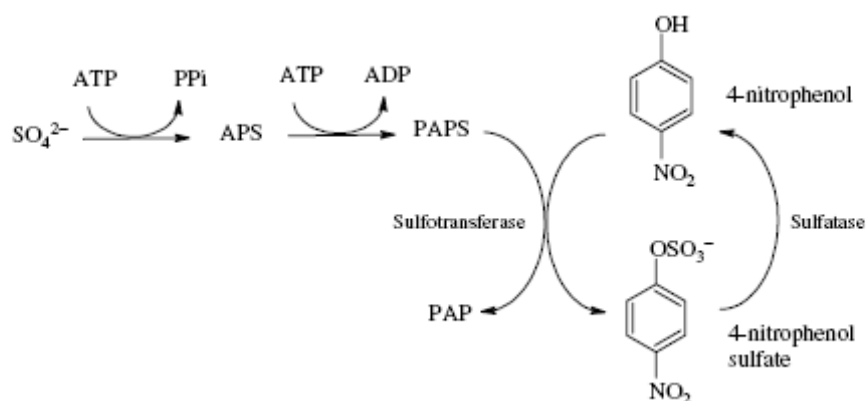


FIGURA 9 - Reação de conjugação envolvendo o sulfato e a enzima sulfotransferase (HODGSON, 2004).

A capacidade relativa e a afinidade das glicuronosil transferases e das sulfotransferases levam à formação de sulfatos fenólicos em baixas doses, mas favorecem a formação altas doses de glicuronídeos (HODGSON, 2004).

Os estudos com sulfotransferases em peixes são mais raros que com as UDPGT e GST. A enzima sulfotransferase e UDPGT e EROD foram determinadas em bagre (*Ictalurus punctatus*) e fúndulo (*Fundulus heteroclitus*) expostos ao 3- MC (3 metilcolantreno) e os resultados obtidos mostraram que o bagre apresentou a indução da SULT, UDPGT e EROD. Já em fúndulo houve indução da UDPGT. Neste estudo, o método de detecção por Western blot mostrou que a SULT não foi detectada no fúndulo (GAWORECKI et al., 2004). A sulfotransferase hepática de bagre apresentou alta afinidade pelo 3-, 7-, 9- benzo[a]pireno (TONG & JAMES, 2000).

2.4.3.3 Glutathione -S- transferase - GST

Segundo GILMAN (1996) a conjugação de metabólicos eletrofílicos de xenobióticos com o tripeptídeo glutathione reduzida (FIGURA 10) representa a principal via de desintoxicação de drogas e carcinogênicos.

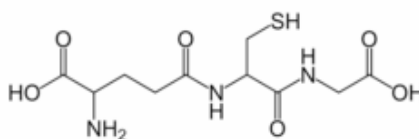


FIGURA 10 - Glutathione reduzida (HODGSON , 2004).

As enzimas glutathione-S-transferases (GST) (FIGURA 11) que catalisam essas reações de conjugação são membros de uma família multigênica e se expressam praticamente em todos os tecidos. Os conjugados da glutathione reduzida são clivados até derivados de cisteína e depois acetilados por uma série de enzimas situadas principalmente no rim, para dar origem a conjugados da N acetilcisteína chamados de ácidos mercaptúricos. Os derivados do ácido mercaptúrico são os metabólitos finais excretados pela via urinária (GILMAN, 1996).

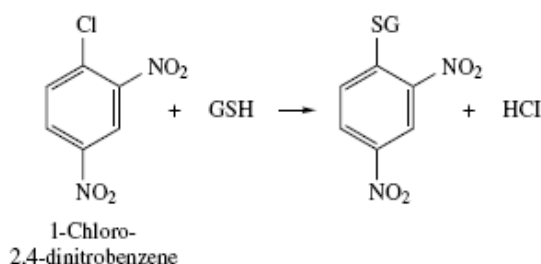


FIGURA 11 - Reação de conjugação da glutathione reduzida com o CNDB realizada pela enzima glutathione - S - transferase (HODGSON, 2004).

As GST são enzimas diméricas de aproximadamente 25kd. Em mamíferos são classificadas em algumas classes: alfa (α), mi (μ), pi (π), sigma (σ), theta (θ), kappa (κ), e zeta (ζ). Esta classificação é feita de acordo com a afinidade por subbstrato

específico afinidade, clonagem, seqüência de aminoácido e cinética enzimática (LANDI, 2000).

A GST é uma enzima importante para verificar o aumento da conjugação de xenobióticos, e é considerada um dos principais bioindicadores em ecotoxicologia. Em peixes, as GST hepáticas são as enzimas de conjugação mais estudadas. Esta enzima é estudada tanto para a conjugação de xenobióticos como no metabolismo de estresse oxidativo. Em fígado de bagre (*C. punctatus*) a GST total apresentou um aumento da atividade e um declínio da atividade nas brânquias e nos rins quando exposto ao “paper mill”, ou seja, despejo de fábrica de papel (AHMAD et al., 2000). Matrinxã quando exposto ao metil paration, apresentou um aumento na atividade da GST total hepática, muscular e branquial (MONTEIRO et al., 2006). O deltametrina também levou a um aumento da atividade da GST total hepática em bagres (*C. punctatus*) (SAYEED et al., 2003), assim como o nonilfenol, que elevou a atividade da GST total hepática de truta arco-íris (*O. mykiss*) (UGUZ et al., 2003).

A metilação e a conjugação com os aminoácidos glicina, glutamina e taurina são reações menos comuns nos casos dos fármacos, mas representam eventos importantes para substratos endógenos. Uma família de N-acetiltransferase é responsável pela acetilação de amins, hidrazinas e sulfonamidas (GILMAN, 1996).

2.4.4 Biotransformação do fenol em peixes

Apesar de o tecido hepático ser o principal sítio de biotransformação de xenobióticos em peixes, o rim, o intestino e as células vermelhas também apresentam mecanismos bioquímicos para metabolizar essas substâncias (SOLEM et al., 2003; ROCHE & BOGÉ, 2000; TONG & JAMES, 2000; McKIN et al., 1999). HODGSON & GEORGE (1997) verificaram que a expressão de mRNA das enzimas GST, metalotionina, UDPGT, CYP1A e carboxiesterase em ovos de solha (*Pleuronectes platessa*), indicando que desde a fase de ovo esta espécie pode se desintoxicar de xenobióticos.

Os mecanismos envolvidos na eliminação do fenol em peixes vêm sendo pesquisados em alguns trabalhos (NAGEL & URICH, 1980; LAYIWOLA &

LINNECAR, 1981, NAGEL, 1983). Segundo estes autores, após a exposição ao fenol, brema (*Abramis brama*), peixe-dourado (*C. auratus*), gupi (*Poecilia reticulata*), minnow (*Phoxinus phoxinus*), perca (*Perca fluviatilis*), pardelha-dos-alpes (*Rutilus rutilus*), rudd (*Scardinius erythrophthalmus*), tenca (*Tinca tinca*) e truta arco-íris (*O. mykiss*) excretaram principalmente o fenil glicuronídeo (PG), fenil sulfato (PS) e a hidroquinona sulfato.

Estudos sobre a biotransformação hepática do fenol em truta arco-íris, *O. mykiss*, e em carpa, *C. carpio*, indicam que os principais produtos formados desse processo são a hidroquinona (1,4 dihidroxibenzeno ou quinol, HQ) e o catecol (1,2 dihidroxibenzeno ou CAT), e as taxas máximas de formação encontradas para truta arco-íris são de 6 pmols/min para HQ e 0,32 pmols/min para o CAT (KOLANCZYK & SCHMIEDER, 2002; SOLEM et al., 2003).

McKIM e colaboradores (1999) ao expor truta arco-íris ao fenol verificaram que o rim da truta arco-íris apresenta uma taxa máxima de eliminação do fenil-sulfato de 30 mL de plasma/h/kg, e que hidroquinona não foi detectada na urina da truta arco-íris, e sim de PS, PG e fenol. Esses autores sugerem que tanto a sulfatação quando a glicuronidação são caminhos para desintoxicação de compostos fenólicos e produtos excretados após a exposição ao fenol corroboram essa hipótese. A ação da enzima fenol sulfotransferase pode ser limitada pela disponibilidade do PAPS ou mesmo de sulfato inorgânico, e, portanto, a glicuronidação se torna a principal via de conjugação para excreção do fenol após 144 horas de exposição (McKIM et al., 1999).

Em células hepáticas isoladas de trutas arco-íris, *O. mykiss*, expostas ao pentaclorofenol (PCP) foi verificada também a formação de PCP-glicuronídeo e PCP-sulfato. A atividade específica da UDPGT, EROD e GST foi aumentada no fígado de carpa (*C. carpio*) após a exposição ao 3-metilcolantreno (TAYSSE et al, 1998)

Vale a pena ressaltar que a quantidade de tóxico excretado por um dado animal depende da disponibilidade do mesmo no plasma, e o fenol é um composto que pode se ligar a diversas proteínas plasmáticas (SCHMIEDER & HENRY, 1988), além de ser lipofílico.

A FIGURA 12 mostra os possíveis caminhos do fenol sofrendo uma conjugação e sendo transformado em fenil glicuronídeo, ou em fenil sulfato pela UDPGT e sulfotransferase, respectivamente. Ele também pode sofrer uma

hidroxilação e ser transformado em uma hidroquinona, que se mostra muito mais tóxica que o fenol (ROCHE & BOGE, 2000). Posteriormente, esta hidroquinona pode ser transformada em monoglicuronídeo de hidroquinona ou hidroquinona monossulfato. Em todos estes casos, as diversas reações de biotransformação formaram produtos muito mais solúveis e mais fáceis de serem eliminados.

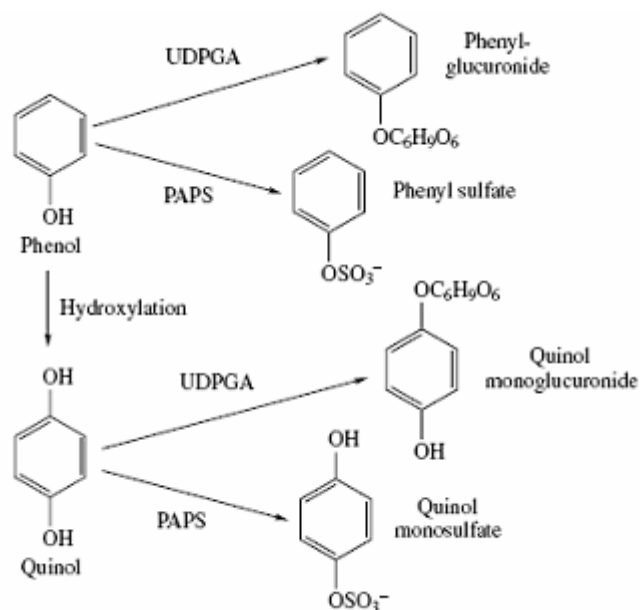


FIGURA 12 - Principais produtos da biotransformação do fenol (HODGSON, 2004).

Em ratos, o fenol também é biotransformado em hidroquinona e catecol (SAWAHATA & NEAL, 1983) no retículo endoplasmático liso hepático. Segundo HODGSON (2004), 24 horas após a intoxicação por fenol, o produto de excreção foi o fenil glicuronídeo. Já em morcegos e macaco Rhesus foram o fenil glicuronídeo e o fenil sulfato. Em gatos, que não apresentam a enzima UDPGT, foram encontrados somente fenil sulfato e hidroquinona sulfato. No homem, macaco de cheiro, porquinho-da-índia, hamster e ratos foram encontrados o fenil sulfato, fenil glicuronídeo e hidroquinona-glicuronídeo. Entretanto, em furões, coelhos e Gerbil (esquilo da Mongólia) foram encontrados o fenil sulfato, fenil glicuronídeo e a hidroquinona sulfatada (HODGSON, 2004).

2.5 Distúrbios nos órgãos de peixes.

A exposição e o acúmulo de xenobióticos pode levar à injúrias nos tecidos, e conseqüentemente, às disfunções dos órgãos em peixes. As disfunções dos órgãos afetarão o bem estar dos peixes, e levarão às doenças. Existem diversas formas de verificação dos distúrbios causados aos órgãos pelo fenol.

Os métodos de detecção de distúrbios fisiológicos podem ser biomarcadores enzimáticos, os métodos histológicos e análises dos intermediários metabólicos. Muitos xenobióticos causam sérias alterações histológicas principalmente nas brânquias, no fígado, no intestino e no rim e a análise histológica é considerado uma ferramenta adequada para verificar os tecidos (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003). Segundo WESTER e colaboradores (2002) o estudo das alterações histológicas em peixes é um bom modelo para compreender os danos causados pelos xenobióticos, assim como, são as alterações histológicas consideradas bem sensíveis, e devem ser utilizados como ferramentas para a avaliação de efeitos tóxicos principalmente ambientais.

2.5.1 Brânquias

As brânquias estão dentre os órgãos mais atingidos pelos xenobióticos, pois se trata do primeiro órgão a entrar em contato com a água. Sendo assim, a avaliação das brânquias é de enorme importância, pois este órgão é responsável pela troca gasosa (entrada de O₂ e saída de CO₂), transporte de íons mono e divalentes, excreção de produtos nitrogenados e entrada e excreção de vários xenobióticos. As brânquias também apresentam atividade de desintoxicação de xenobióticos (HEATH, 1987).

As alterações mais comuns encontradas em brânquias de peixes que foram expostos a xenobióticos são a hipertrofia do epitélio e das células cloreto, necrose e hiperplasia, assim como a displasia da cartilagem. São também encontradas a proliferação das células de muco e a produção de excesso de muco, muitas vezes como uma forma de defesa. Outras lesões importantes em tecidos associados são as alterações no fluxo sanguíneo, incluindo a congestão vascular, aneurisma, trombos,

telangiectasias e a constrição dos sinusóides (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003). Também ocorreu hiperplasia das células cloretos ao longo da lamela secundária com hiperplasia das células epiteliais interlamelares causando completa fusão da lamela secundária, necrose nas células epiteliais e reação inflamatória nas brânquias (TRIEBSKORN et al., 2002).

2.5.2 Sangue

Após a entrada pelas brânquias, os xenobióticos alcançam o sangue, que tem o papel fundamental de fazer o transporte de oxigênio, de diversas substâncias e de defesa do organismo. As células sanguíneas de peixes são produzidas pelo tecido hematopoiético que está localizado no rim. As células sanguíneas são compostas pela série vermelha (eritrócitos), e série branca, porém os peixes não apresentam plaquetas (HEATH, 1987).

Os xenobióticos causam efeitos nos eritrócitos de teleósteos, causando alterações no transporte de íons, no metabolismo e na morfologia das células (NIKINMAA, 1992). As alterações hematológicas dão informações muito importantes sobre a fisiologia dos organismos, pois podem indicar anemia e ou produção de metahemoglobina (NIKINMAA, 1992; AVILEZ et al, 2004).

A anemia hemolítica foi diagnosticada em matrinxãs, *B. amazonicus* exposto ao nitrito (AVILEZ et al, 2004). Segundo HORI e colaboradores (2006), em matrinxãs, o fenol pode levar a um aumento do hematócrito. Truta arco-íris também apresentou aumento do hematócrito, seguido do aumento de glicose após exposição a 3,2 mg/L de fenol por 2 horas, o cortisol aumentou na concentração 3,9 mg/L de fenol após 2 horas de exposição (SWIFT, 1981, SWIFT, 1982). Injeções intra-abdominais de fenol e compostos fenólicos em *Dicentrarchu. labrax* por 3 a 15 dias mostraram um declínio da hemoglobina total e hematócrito (ROCHE & BOGÉ 2000). Segundo BUKOWSKA & KOWALSKA (2004) o fenol causou um aumento nos valores de metahemoglobina em hemácias humanas.

2.5.3 Fígado

O fígado é um órgão que apresenta a função de conversão de vários nutrientes, estoque de glicogênio, síntese de proteínas importantes para o plasma, secreção de enzimas digestivas, destruição de hemácias e metabolismo de hormônios, além da formação da bile. A bile apresenta vários produtos entre eles os sais biliares que auxiliam na digestão de gorduras, pigmentos biliares, que são produtos da degradação do grupamento heme da hemoglobina, xenobióticos e de produtos do metabolismo dos mesmos (BRUMLEY et al, 1998).

O fígado é o foco de estudos sobre as injúrias causadas pelos tóxicos, sendo o órgão mais estudado em ecotoxicologia (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003). As principais alterações hepáticas estudadas são aquelas que podem levar a formação de tumores como a degeneração do epitélio biliar, hepatócitos ou polimorfismos nucleares, alterações celulares de foco (como a vacuolização), neoplasias benignas; como adenoma dos hepatócitos, tumor nos ductos biliares, e neoplasias malignas. O segundo grupo de alterações são regeneração dos hepatócitos, hiperplasia dos ductos biliares e fibrose hepática, lesões degenerativas locais e ou difusas como o aumento da apoptose e surgimento de corpos hialina. O terceiro grupo de lesões são de estocagem e inflamações (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003).

Durante a exposição aos xenobióticos que causam alterações histopatológicas é comum encontrar descrições de infiltração celular com processo de inflamação, degenerações, congestão sangüíneas (GÜL et al., 2004). TRIEBSKORN e colaboradores (2002) verificaram que truta marrom (*Salmo trutta*) submetida à água poluída (que continha vários pesticidas, organoclorados, PCB, bifenil policlorado, e PAH, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) da região sul da Alemanha, mostrou alterações na ultraestrutura do fígado com pouco armazenamento de glicogênio, várias vesículas, cisterna do retículo endoplasmático dilatada, muitas mitocôndrias e um aumento do número de macrófagos.

As lesões no fígado podem elevar os valores de atividade das enzimas hepáticas no plasma. As principais enzimas utilizadas para diagnosticar lesões no fígado são alanina aminotransferase (ALAT), aspartato aminotransferase (ASAT),

lactato desidrogenase (LDH) (HEATH, 1987) e também GST (MULDER et al, 1997). Quando a atividade destas enzimas é determinada no plasma, indica que o fígado foi lesado e a enzima foi extravasada para o plasma. No fígado também é possível diagnosticar alterações do metabolismo hepático através da atividade de enzimas hepáticas como LDH, glutamato desidrogenase (GDH), piruvato quinase (PK), fosfatase alcalina e ácida, bem como medir diretamente vários intermediários metabólicos (HEATH, 1987).

Segundo VERMA e colaboradores (1982) *Saccobranchnus fossilis* expostos por 30 dias ao tiotox e malation mostraram que estes xenobióticos inibiram a atividade das fosfatase ácida e alcalina e glicose-6-fosfato desidrogenase hepática. Matrinxã, *B. amazonicus* exposto ao metil-paration apresentou queda da atividade ALAT no fígado com seu conseqüente aumento da atividade no plasma (AGUIAR et al, 2004). HORI e colaboradores (2006) também encontraram um aumento na atividade da ASAT e queda na atividade da ALAT no fígado de matrinxã exposto ao fenol, e diminuição da concentração dos aminoácidos livres e proteína total e aumento da concentração de amônia mostrando que o fenol causou alterações no metabolismo de proteínas. Neste mesmo estudo foi observado o aumento da atividade de malato desidrogenase (MDH) e da LDH com queda dos valores de glicose, piruvato e glicogênio, indicando os efeitos no fenol no metabolismo intermediário.

2.5.4 Rim

O rim de peixes teleósteos de água doce tem como maior função excretar água, portanto formam uma urina diluída, e sem perda de eletrólitos. O rim dos peixes é um órgão dorsal, dividido em duas partes: o rim anterior e o rim posterior. O rim cefálico é responsável pela produção do sangue (tecido hematopoético). Na porção caudal é responsável pela filtração e excreção, como a cápsula de Bowman, com o glomérulo, túbulo contorcido distal e túbulo contorcido proximal. A maioria dos xenobióticos causa alterações no sistema excretor e as principais alterações histológicas encontradas são: necrose do epitélio dos túbulos distais e proximais, aumento do espaço da cápsula de Bowman e fibrose do glomérulo (HEATH, 1987).

TRIEBSKORN e colaboradores (2002) verificaram que a truta marrom (*S. trutta*) submetida à água poluída (pesticidas, organoclorados, PCB e PAH) da região sul da Alemanha apresentou alterações histopatológicas das brânquias e dos rins com sinais de doença renal, proliferação do tecido interrenal e necrose com mudanças nos tecidos hematopoéticos e excretor. Em bremas (*Abramis brama* e *Aspeus aspeus*) expostas ao bifenil policlorado (PCB) foram verificadas: dilatação dos capilares glomerulares, edema mesangial e aumento do espaço da cápsula de Bowman (KOPENEN et al., 2001).

O fenol tem potencial para causar alterações histológicas nos tecidos no qual ele entrar em contato, porém, poucos trabalhos mostraram as alterações histológicas sofridas por peixes expostos ao fenol. MITROVIC e colaboradores (1968) compararam as alterações histológicas relacionadas a morte de truta arco-íris intoxicada por fenol, por 48 horas, com animais que sobreviveram após exposições à concentrações menos elevadas e, verificaram que os animais expostos à concentração letal apresentavam inflamação e necrose da faringe e das brânquias, hemorragias internas, com sangue na cavidade e inchaço no baço. Os animais que sobreviveram após a exposição por 7 dias em concentrações menores apresentavam alterações nas brânquias com inflamação no epitélio da lamela secundária e destruição de parte do filamento. Estes animais também apresentavam alterações no fígado, no rim, no baço, no intestino e no ovário, porém em menor grau, insuficiente para levar a morte.

Cottus gobio exposto ao fenol (6 mg/L) por 35 dias apresentou hiperplasia severa nas brânquias e focos de necrose e, em alguns pontos fusão apical da lamela secundária, hiperplasia, infiltração de leucócitos e edema da linha lateral com degeneração do parênquima hepático e formação de vacúolos e nenhuma alteração foi encontrada nos rins (BUCKER & HOFER, 1993). BENEDECKY e NEMCSÓK (1990) expuseram carpas ao fenol (5 mg/L) por 24, 48, 72 e 96 horas, e mostraram por microscopia eletrônica ausência de mitose, formas nucleares irregulares, queda na cromatina, segregação do nucléolo, numerosos fagossomas e vacúolos autofágicos no citoplasma de hepatócitos.

2.5.5 Cérebro

As alterações neurológicas causadas pelos xenobióticos são bem estudadas em mamíferos e têm sido estudadas em peixes. A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) tem sido usada como umas das principais ferramentas para diagnosticar os efeitos de xenobiótico no tecido nervoso, pois alguns deles causam inibição da atividade desta enzima (AGUIAR, 2002). A acetilcolinesterase é uma enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina em colina e acetato. Esta reação é necessária para que o neurônio colinérgico volte ao seu estado de repouso e conseqüentemente, que o músculo volte ao seu estado de repouso (HEATH, 1987). Dentre os xenobióticos, os mais conhecidos inibidores da AchE são os organosfosforados como o metil paration, e os carbamados, como o molinato. Segundo AGUIAR e colaboradores (2004) o matrinxã apresentou inibição da acetilcolinesterase quando foi exposto ao metil paration por 96 horas, e durante a recuperação de 192 horas não foi possível recuperar toda a atividade. O mesmo ocorreu com enguias *A. anguilla* exposta ao molinato por 96 horas, ou seja, inibição a atividade de acetilcolinesterase cerebral e não houve retorno aos valores controle da atividade enzima durante a recuperação (SANCHO et al., 2000). A inibição da atividade da acetilcolinesterase pode levar a conseqüências muito graves, pois ao diminuir sua viabilidade, o organismo torna-se mais susceptível aos predadores (SCOTT & SLOMAM, 2004).

2.6 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Alguns estudos mostraram que o fenol pode causar estresse oxidativo em peixe (BOGÉ & ROCHE, 1996; ROCHE & BOGÉ, 2000), entretanto os mecanismos de ação dos compostos fenólicos são múltiplos e muitas vezes antagônicos (ROCHE & BOGÉ, 2000). Esses compostos podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), que geram grandes danos celulares, como por a oxidação de membranas celulares (PRADHAM et al., 1990; KOTKAT et al., 1999) e, danos a proteínas, causando alterações nas atividades das enzimas, nos receptores e transportadores de membranas entre outros (SALVI et al., 2001). As espécies reativas de oxigênio

também podem ser formadas durante o metabolismo de drogas (PORTER & COON, 1991; HODGSON, 2004).

As espécies reativas de oxigênio surgiram na Terra somente após o surgimento de uma atmosfera oxidante, ou seja, após o surgimento de uma atmosfera rica em oxigênio, substituindo a atmosfera redutora que existia anteriormente, e conseqüentemente, do surgimento de organismos que eram capazes de oxidar moléculas orgânicas tendo o oxigênio como último aceptor de elétrons (McCORD, 2000).

As ERO são moléculas derivadas de substâncias comuns ao ambiente celular, e normalmente são encontradas em baixa concentração. São moléculas orgânicas ou inorgânicas, e os seus átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados e chamados como radicais livres. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (WINSTON, 1991; ABDALLA, 1993). Como nem todas as espécies reativas de oxigênio são radicais livres, também nem todos os radicais são espécies reativas de oxigênio, podendo ser também de espécies reativas de nitrogênio (McCORD, 2000).

2.6.1 Oxigênio singlete - $^1\text{O}_2$

O oxigênio singlete é formado a partir da excitação do oxigênio no estado fundamental triplete ($^3\text{O}_2$) aos seus estados singlete ($^1\text{O}_2$) e para tal, requer energia térmica ou fotoquímica e pode ocorrer quando vários pigmentos (sensibilizadores) são iluminados na presença de $^3\text{O}_2$. Essas formações, por exemplo, podem ocorrer na retina do olho (ABDALLA, 1993).

2.6.2 Radical superóxido - O_2^-

Durante oxidação de moléculas orgânicas, tendo o oxigênio com o último aceptor de elétrons, que ocorre na mitocôndria dos organismos eucarióticos, estima-

se que até 2% do oxigênio formado seja na forma de ânion superóxido (O_2^-) (SILVEIRA, 2004). Segundo este mesmo autor, a formação de espécies reativas de oxigênio pode se dar tanto durante a fosforilação oxidativa na mitocôndria, como pelos neutrófilos durante o ataque às bactérias e outros microorganismos (esta formação é extremamente importante para a eficiência da resposta imunológica).

O anion superóxido não é permeável a membrana, porém o óxido nítrico sim, e este pode ser produzido em um lugar e atingir outro. Reagindo entre si, o anion superóxido e o óxido nítrico podem formar o peroxinitrito (McINTYRE et al., 1999) que é um radical bem tóxico. O radical superóxido também pode ser formado pela autooxidação da hemoglobina, mioglobina, citocromo C reduzido, catecolaminas, quinonas e fenóis poliidricos (CANADA & CALABRESE, 1989). Uma outra fonte de produção dá-se durante os exercícios físicos, pois existe uma maior demanda de oxigênio (35% maior) pela musculatura durante a atividade (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

2.6.3 Peróxido de hidrogênio - H_2O_2

O peróxido de hidrogênio pode ser formado a partir do anion superóxido, através da reação da dismutação natural ou pela enzima superóxido dismutase (SOD) (SALTMAN, 1989). Enzimas citoplasmáticas, mitocondriais (succinato desidrogenase e ácido graxos desidrogenase) e peroxissomais (lactato oxidase, urato oxidase, d-aminoácido oxidase) geram peróxido de hidrogênio diretamente. Ele é considerado um agente oxidante fraco, porém oxida grupos tiol e alguns aminoácidos, podendo inativar enzimas (ABDALLA, 1993).

2.6.4 Radical hidroxila - OH^\bullet

Existem duas vias principais de produção de radical hidroxila OH^\bullet em sistemas biológicos: a primeira via é a das radiações ionizantes. Em decorrência do alto teor de água nas células, a exposição de células às radiações ionizantes como

raios X e raios gama resultam na formação de radical hidroxila em soluções aquosas (ABDALLA, 1993).

A segunda via é a interação de ERO com metais de transição. Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, na presença de metais de transição como íons ferro ou cobre, é formado o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima, e assim, atuar em enzimas, membranas ou ácidos nucleicos. A reação é conhecida como reação de Fenton:



Os íons dos metais de transição ferro e cobre podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxil, a chamada reação de Haber-Weiss:



O radical hidroxil é extremamente reativo, ou seja, uma vez formado, tem uma meia-vida extremamente curta, reagindo rápida e inespecificamente com os alvos celulares mais próximos, causando lesões no DNA, proteínas, açúcares e lipídios (ABDALLA, 1993). O radical hidroxil é o que apresenta um menor tempo de vida (SIES, 1991).

Outros tipos de radicais livres importantes são o radical peroxil ($\text{ROO}\cdot$), que é o radical de tempo de vida mais longo, causando vários problemas biológicos entre eles a oxidação de ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) (SIES, 1991), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), radical semiquinona ($\text{Q}\cdot$). Além destas reações mostradas o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico (NO), um radical livre centrado no nitrogênio, gerando peroxinitrito. Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxil.



2.7 Sistema de defesa antioxidante

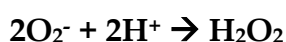
As espécies reativas de oxigênio são danosas para a célula e não podem ficar livres. Para prevenir tal situação, existe um sistema de defesa antioxidante. Este sistema de defesa antioxidante é dividido em dois tipos: um sistema de defesa antioxidante enzimático e um sistema de defesa antioxidante não enzimático. O objetivo deste sistema antioxidante é inibir a oxidação, ou quando em baixa concentração, quando comparada à do substrato oxidável, ou diminuir ou inibir significativamente a oxidação daquele substrato (ABDALLA, 1993; McCORD, 2000; SILVEIRA, 2004). Além destes dois tipos de sistema, devemos ainda destacar o sistema de reparo do DNA e o de reparo de proteínas oxidadas, que não tem o papel de prevenção, mas sim de reparo.

Sendo assim, os sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático são considerados bons biomarcadores de possíveis alterações no balanço de antioxidantes e oxidantes que podem ser causados pelos xenobióticos.

2.7.1 Sistema antioxidante enzimático

Superóxido dismutase - SOD

O anion superóxido pode receber um elétron e dois íons hidrogênio e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através do processo chamado de dismutação. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e acelera a reação 10^4 vezes quando comparada à dismutação espontânea em pH fisiológico (ZELKO et al, 2002).



Esta enzima também é encontrada em peixes em diferentes formas. A forma de Zn-CU SOD (SOD1) citoplasmática é formada por 2 subunidades com 16kDa cada, contendo um átomo de cobre e um de zinco, é extremamente sensível ao cianeto

(McINTYRE et al., 1999; ZELKO et al, 2002). A Mn SOD (SOD 2) mitocondrial é formada por um homotetramero, também com 16 kDa cada subunidade, e cada uma delas contendo um átomo de manganês (McINTYRE et al., 1999, ZELKO et al, 2002). A Fe SOD é encontrada em procariotos, algumas algas e plantas (SCANDALIOS, 2005). É encontrada também uma extracelular Cu-Zn EC-SOD (SOD3) em humanos e é secretada pelos fibroblastos e células gliais, e são secretadas para o fluido extracelular sendo considerada neste caso a principal SOD (McINTYRE et al., 1999).

Catalase - CAT

Com o objetivo de diminuir a concentração de H_2O_2 existem duas saídas para que o peróxido de hidrogênio, não se transforme em radical hidroxil. A primeira saída é a enzima catalase (CAT) que é responsável por transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio:



A catalase está localizada nos peroxissomos, porém ela pode alcançar os H_2O_2 produzidos em outras partes da célula, e é encontrada em todos os organismos aeróbicos, sendo considerada uma enzima amplamente distribuída e bem conservada, e com rápida capacidade de degradação do H_2O_2 , aproximadamente 10^{-7} minutos, sendo considerada um passo evolutivo extremamente importante, pois permitiu aos organismos viverem em ambientes aeróbicos (SCANDALIOS, 2005).

A catalase é uma enzima tetramérica, na qual cada subunidade apresenta 60kDa, com um grupo heme por tetrâmero (KIRKMAN & GAETANI, 1984). Segundo estes autores, a catalase eritrocitária de humanos é o maior reservatório de NADPH, e este não é necessário para o funcionamento da enzima, porém ele apresenta um papel protetor à catalase, inativando o peróxido de hidrogênio, ou seja, funcionando como um antioxidante não-enzimático. Em plantas são conhecidas múltiplas formas de CAT, porém somente uma em animais (SCANDALIOS, 2005).

Glutationa Peroxidase - GPX

A outra via de degradação do peróxido de hidrogênio é a enzima glutathione peroxidase (GPx), que também é capaz de utilizar outros peróxidos, além disso a enzima GPx utiliza a glutathione reduzida como doadora de elétrons para este processo:



ou



A glutathione peroxidase é uma enzima que necessita da renovação de glutathione reduzida no meio. A enzima glutathione reductase (GR) é a responsável pela manutenção do teor de glutathione reduzida.



Glicose-6-fosfato desidrogenase - G6PDH

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) está presente no citoplasma de todas as células, é uma enzima importante da fase oxidativa da via das pentoses, pois produz NADPH para a célula (SALTMAN, 1989). Esta coenzima atua como doadora de hidrogênio em várias rotas metabólicas, age sobre a estabilidade da catalase (KIRKMAN & GAETANI, 1984) e regeneração da forma reduzida da glutathione através da atividade da glutathione reductase, ambas essenciais para a desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), embora a defesa das células contra o H_2O_2 não dependa fundamentalmente da G6PDH. Esta enzima é também importante para a formação de NADPH necessário para a integridade das hemácias (SALTMAN, 1989).



Além destas enzimas descritas outras também auxiliam na defesa do organismo são: NADPH quinona oxidoreductase, epóxido hidrolase, enzimas de conjugação (UDPGT, Sulfotransferase e GST), glutathiona redutase, 6 fosfo gluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e enzima málica (SIES, 1991).

Os mecanismos de regulação sobre a sensibilidade das células as ERO não são bem conhecidos, porém um grande número de fatores de transcrição que regulam a expressão dos genes que codificam as enzimas antioxidantes já estão bem caracterizadas em leveduras (SCANDALIOS, 2005). Segundo este autor, em mamíferos existem duas classes de fatores de transcrição o kB e o ativador da proteína -1 que estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. A indução de genes de proteínas antioxidantes em mamíferos são feitos pelos elementos responsivos antioxidantes conhecidos como ARE, que são comumente encontrados próximos às regiões promotoras dos genes. Os ARE estão presentes nos genes que codificam GST, metalotioneína e MnSOD.

2.7.2 Sistema antioxidante não enzimático

As células também apresentam moléculas com o papel antioxidante, ou seja, que auxiliam o organismo no ataque às espécies reativas de oxigênio, e é este conjunto de moléculas que formam o sistema antioxidante não enzimático. As principais moléculas são: vitamina C ou ácido ascórbico (FIGURA 13), glutathiona reduzida (FIGURA 10), vitamina E ou α -tocoferol (FIGURA 14), β caroteno (FIGURA 15), flavonóides (FIGURA 16), proteínas do plasma, melatonina, metalotioneínas, selênio, clorofilina, L-cisteína, curcumina, ubiquinona, fenilalanina, ácido úrico e glicose (BIANCHI & ANTUNES, 1999; SILVEIRA, 2004; VALAVADINIS et al., 2006).

Glutathiona reduzida

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido γ -glutâmico, e atua como um seqüestrador de radicais hidroxil e de oxigênio singlete. É um cofator de várias enzimas em diferentes vias

metabólicas, participa do processo de desintoxicação (conjugação com xenobiótico) e também na remoção de peróxidos via glutathione peroxidase (ABDALLA, 1993). Deficiências da síntese de glutathione têm conseqüências sérias como a hemólise (ABDALLA, 1993).

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico (FIGURA 13) é uma vitamina hidrossolúvel, também conhecido como vitamina C. É necessário para os organismos, pois tem a função de ser cofator de enzimas, como da prolina e lisina hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno, e da dopamina β hidroxilase, que converte a dopamina em adrenalina. Pode ser sintetizado a partir da glicose por várias espécies de vegetais (ABDALLA, 1993).

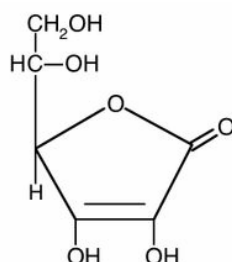


FIGURA 13 - Formula estrutural plana do ácido ascórbico

Devido ao seu baixo potencial redutor o ascorbato reage como antioxidante com a maior parte dos radicais oxidantes formados nos sistemas biológicos. A oxidação do ascorbato (via um elétron) resulta na formação do radical ascorbil, e pode ser considerado como um indicador do estresse oxidativo.

Alguns peixes podem sintetizar vitamina C no rim posterior. Segundo FRACALOSSO e colaboradores (2001), o *Potamotrygon* e o *Lepidosirem paradoxa* apresentam atividade da enzima L-gulonolactona oxidase que é o passo final para transformar a L-gulonolactona em ácido ascórbico. Segundo BENITEZ e HALVER

(1982), alguns peixes, que não sintetizam ácido ascórbico, é possível o acúmulo de ácido ascórbico nos tecidos quando o ácido ascórbico é transformado em L ascorbato 2-sulfato pela enzima L-ascorbato 2 sulfato sulfohidrolase (C₂sulfatase), e desta forma, o ácido ascórbico pode ser utilizado quando necessário, e transportado para os tecidos com maior necessidade. Os tecidos que apresentam as maiores concentrações de ácido ascórbico em peixes são o rim, o fígado, o cérebro e as brânquias (CARR et al., 1983).

Alfa-tocoferol

O alfa-tocoferol, também conhecido como vitamina E (FIGURA 14), tem sido considerado o mais importante antioxidante, pois tem a função de proteção das membranas celulares, pois é uma molécula lipossolúvel que pode se acumular nas membranas, e o seu transporte é feito pelas LDL.

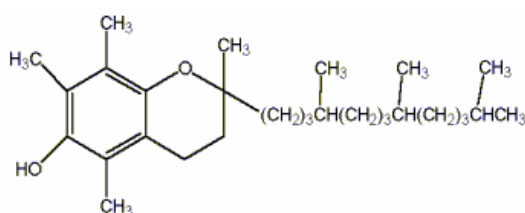


FIGURA 14 - Estrutura química do α -tocoferol (vitamina E)

As principais ações do α -tocoferol é seqüestrar o anion superóxido e radical hidroxil e bloquear a ação da peroxidação lipídica. Ao doar um átomo de hidrogênio para os radicais peroxil e alcoxil derivados da oxidação dos ácidos graxos, impede assim a propagação da lipoperoxidação (ABDALLA, 1993). Em matrinxã, não foi detectado vitamina E nos eritrócitos, apenas no fígado (WILHELM FILHO, 1996).

Beta-Carotenos

O β -caroteno é o mais potente dos carotenos (FIGURA 15), e também é conhecido como pró-vitamina A. É lipossolúvel e é transportado no plasma por

lipoproteínas plasmáticas e, sendo assim, se concentra principalmente no fígado. Os carotenóides, em geral, atuam na supressão do oxigênio singlete e como seqüestrador de radicais livres, e apresentam uma atividade relevante especialmente nas baixas tensões de oxigênio observadas em condições fisiológicas e também impede a peroxidação lipídica (ABDALLA, 1993).

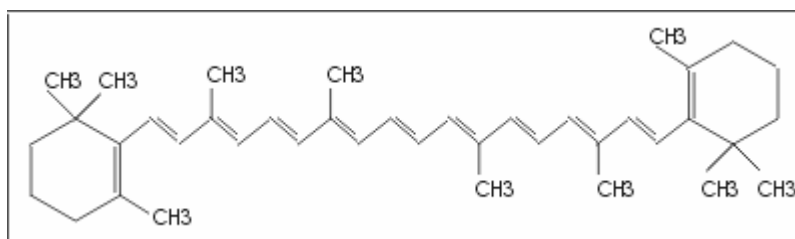


FIGURA 15 - β -caroteno

2.8 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre em situações de desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e de pró-oxidantes, com predomínio destes últimos. Assim, a diminuição dos sistemas de defesa antioxidante ou o aumento da geração de espécies oxidantes podem resultar em oxidações de macromoléculas de diversas estruturas celulares (FIGURA 16) que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (SIES, 1991; ABDALLA, 1993; VALAVANIDIS et al, 2006).

As espécies reativas de oxigênio podem atuar nas estruturas das proteínas causando a oxidação destas, principalmente nos grupos amina e também a oxidação dos grupos tiol, este processo pode levar a uma inativação da proteína (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003). As ERO também podem levar a oxidação do DNA, alterando a expressão dos genes, a peroxidação de lipídios, que conseqüentemente, causaria um dano ao funcionamento das membranas como uma maior permeabilidade da célula e a inativação de receptores de membrana. Este processo pode causar danos celulares irreparáveis podendo levar a morte celular, diminuindo a capacidade do organismo de lutar contra doenças e pela sobrevivência (VALAVADINIS et al, 2006).

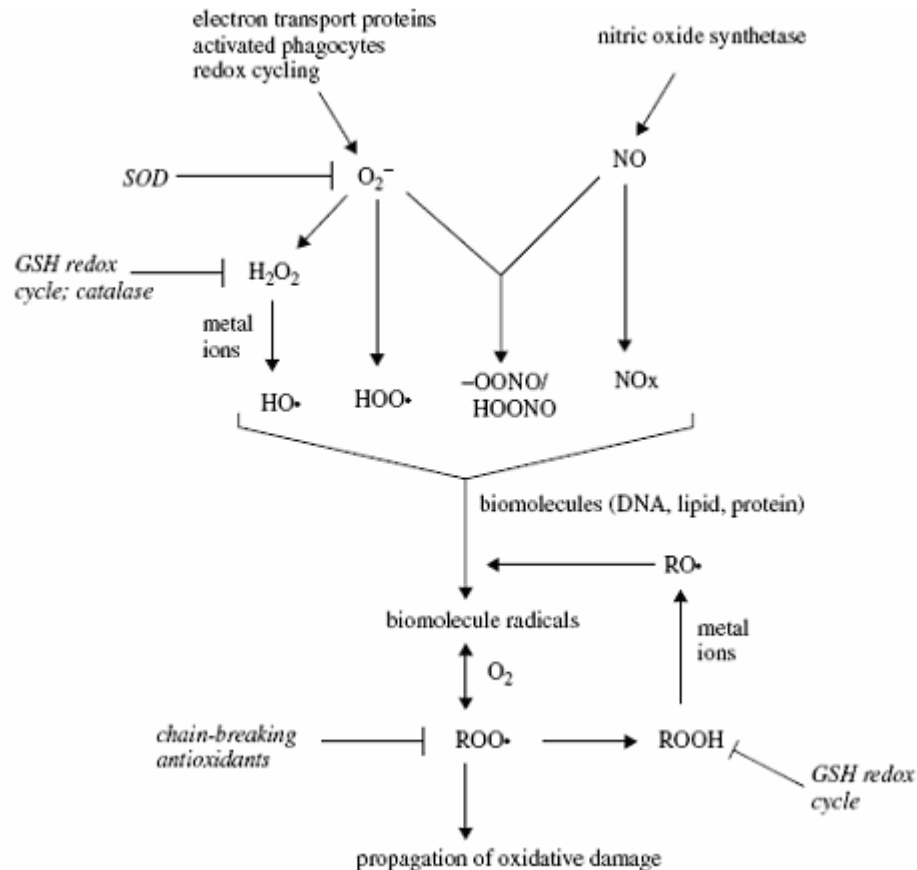


FIGURA 16 – Esquema de produção de ERO, o sistema antioxidante enzimático e os danos causados as macromoléculas (HODGSON, 2004).

Existem poucos estudos sobre o metabolismo antioxidante em peixes, principalmente com peixes tropicais. Entretanto, o ambiente aquático recebe diariamente muito poluentes aquáticos que tem potencial para causar estresse oxidativo em organismos aquáticos e disfunções em órgãos (VALAVANIDIS et al, 2006).

Estudos sobre estresse oxidativo revelam que em comparação com outros vertebrados, os peixes parecem exibir atividade de SOD e CAT mais baixas, porém a atividade GPX muito mais altas que em outros vertebrados (VALAVADINIS et al, 2006). AHMAD e colaboradores (2000) verificaram que *C.punctatus* exposta por longo tempo (15 a 90 dias) ao “paper mill”, mostrou aumento dos níveis de glutathiona reduzida, GPx, GST e CAT no fígado. Este estudo mostrou também que as vias de proteção para os diversos órgãos têm suas diferenças e que as brânquias e o rim são estruturas mais susceptíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio que o fígado.

A truta arco-íris exposta e alimentada por *Lemma minor*, uma planta aquática conhecida como lentilha d'água, contaminada com hexaclorobenzeno (HCB, 2 µg/L), apresentou um aumento na concentração de glutathione reduzida em todos os tecidos analisados: fígado, músculo branco, músculo vermelho, coração e sangue, mostrando o quanto estes tecidos apresentam defesa efetiva contra o estresse oxidativo (LINDSTROM-SEPPA et al., 1996).

As células vermelhas são consideradas as que mais produzem espécies reativas de oxigênio (SALTMAN, 1989). Segundo ROCHE e BOGÉ (1996, 2000) o fenol causa um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio em eritrócitos, e sendo assim, a investigação é muito importante para espécies ameaçadas por este tipo de água contaminada.

Compostos fenólicos causam "in vitro" citotoxicidade em eritrócitos do sea bass *D. labrax*, aumentando também a atividade das peroxidases e hemólise (BOGÉ & ROCHE, 1996). Injeções intra-abdominais de fenol e compostos fenólicos em sea bass por 3 a 15 dias mostraram um declínio da hemoglobina total e da atividade da Mn-superóxido dismutase, mas aumentou os valores de cortisol, glutathione peroxidase, levando o peixe a um estado de estresse oxidativo (ROCHE & BOGÉ 1996; ROCHE & BOGÉ 2000). Em carpa, concentrações subletais de fenol causaram a peroxidação lipídica afetando a composição fosfolipídica das membranas dos eritrócitos (KOTKAL et al., 1999).

3 OBJETIVO

Considerando que o fenol tem sido pouco estudado em peixes neotropicais do Brasil, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do fenol sobre o matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829), durante uma exposição a uma concentração subletal por 96 horas e sua capacidade de recuperação após uma semana e duas semanas em água livre de fenol.

Para atingir este objetivo foram avaliados:

- 1 - Avaliação da toxicidade aguda do fenol durante 96 horas.
- 2 - Avaliação dos efeitos de uma concentração subletal (10% da CL₅₀) na histologia de brânquias, de fígado e de rim após 96 horas de exposição.
- 3 - Avaliação dos efeitos de uma concentração subletal (10% da CL₅₀) sobre o sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático de eritrócitos, de células do fígado e do cérebro após 96 horas de exposição, bem como após a recuperação destas alterações por uma e duas semanas em ambiente livre de fenol.
- 4 - Avaliação dos efeitos de uma concentração subletal (10% da CL₅₀) na biotransformação hepática após 96 horas de exposição e após recuperação por uma e duas semanas em ambiente livre de fenol.
- 5 - Avaliação dos efeitos de uma concentração subletal (10% da CL₅₀) em lesões hepáticas, avaliando enzimas hepáticas no plasma após 96 horas de exposição e após recuperação por uma e duas semanas em ambiente livre de fenol.
- 6 - Avaliação dos efeitos de uma concentração subletal (10% da CL₅₀) sobre a atividade da acetilcolinesterase cerebral após 96 horas e após recuperação por uma e duas semanas em ambiente livre de fenol.

4 MATERIAS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza. Os equipamentos utilizados durante este trabalho foram: espectrofotômetro Beckman DU[®]520, espectrofotofluorímetro Hitachi F-3010, ultra-centrífuga refrigerada Sorvall pro-80, centrífuga refrigerada Eppendorf 002CB, microcentrífuga de capilar Micro 20 Hettich Zentrifuge, balança analítica, banho de 60°C, banho fervente, agitador tipo vórtex, leitora de placas Thermomax[®] Molecular Devices, homogeneizador Potter-Elvehjem, potenciômetro pHmetro, fotofluorímetro Barnsted, micrótomo Leica RM-2155, homogeneizador tipo Potter Ika, oxímetro YSI-55 e multianalisador Check Mate II Corning.

4.1 Desenho Experimental

Os animais de experimentação foram adquiridos da fazenda “Águas Claras” - Mococa -SP e permaneceram por um mês em tanques de 2000 L com água aerada, fotoperíodo natural e temperatura controlada (25 °C) para aclimatação. Os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 35 % de proteína bruta. Após este período, os animais foram transportados para os tanques de teste (com mesma qualidade de água que as caixas anteriores, porém, com 200 L de água) nos quais permaneceram por uma semana em aclimatação ao novo ambiente; sendo privados de alimentação por 24 horas antes início do protocolo experimental e durante toda exposição ao fenol.

4.1.1 Teste de toxicidade aguda do fenol - CL₅₀/96h

Esse teste preliminar foi realizado em caixas de 250 L com 10 peixes em cada caixa. Foram ensaiadas cinco concentrações de fenol (0, 1, 5, 10, 25 e 50 mg/L) (FIGURA 17) durante 96 horas de exposição, em um sistema semi-estático (com renovação da água a cada 12 horas). O fenol, tanto neste experimento quanto nos próximos que serão apresentados neste trabalho, sempre foi dissolvido em água, e

então, adicionado às caixas. A concentração do fenol foi renovada a cada 12 horas, pois devido à sua volatilidade havia um declínio periódico da concentração. Durante as 96 horas de exposição, as caixas foram mantidas com aeração constante, temperatura controlada de 25 °C, fotoperíodo natural, privação de alimentação. A densidade de peixe em cada caixa está descrita na TABELA 1. Durante este teste foram analisados os parâmetros de qualidade de água a cada 12 horas: oxigênio, temperatura, pH, condutividade, alcalinidade, dureza, nitrito, amônia e fenol. A cada 24 horas foi registrado o número de animais mortos para posterior cálculo de CL_{50} .

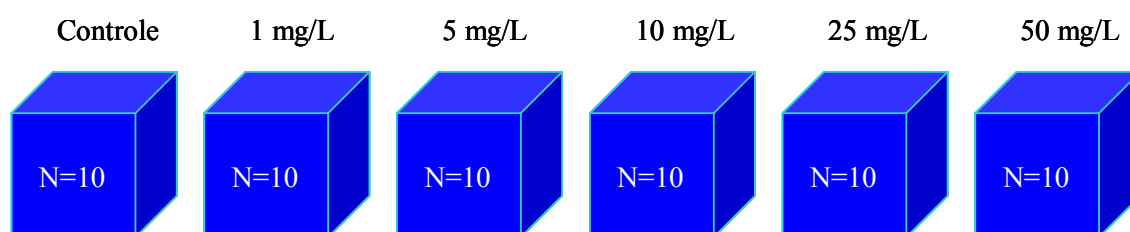


FIGURA 17 - Desenho experimental do teste de toxicidade do fenol em matrinxã durante 96 horas.

TABELA 1 - Densidade de matrinxã em cada caixa no início do teste de toxicidade de fenol (CL_{50}) durante 96 horas.

Concentração de fenol	Peso de peixe por litro de água (g/L)
0 mg/L	3,29
1 mg/L	2,68
5 mg/L	2,99
10 mg/L	2,75
25 mg/L	2,59
50 mg/L	2,66

4.1.2 Exposição ao fenol I - Avaliação dos tecidos

Neste experimento foram utilizados 20 peixes, com peso e comprimento descritos na TABELA 2, divididos igualmente em 2 lotes, e distribuídos em tanques de 250 L. Os animais foram privados de alimentação, permanecendo sob fotoperíodo natural, aeração constante e temperatura controlada (25 °C). Um lote (controle) permaneceu em água livre de fenol e o outro foi exposto a 2 mg/L (10 % do CL₅₀/96h, obtido após o teste de toxicidade) por 96 horas (FIGURA 18). Ambos permaneceram em sistema semi-estático (com renovação de água a cada 24 horas), e com renovação da concentração do fenol a cada 12 horas. Os parâmetros de qualidade da água: oxigênio, temperatura, pH, condutividade, alcalinidade, dureza, amônia e fenol foram medidos a cada 24 horas, antes e logo após a renovação da água. Após a exposição, todos os animais foram sacrificados para a retirada da brânquia, do fígado e do rim para avaliação histológica.

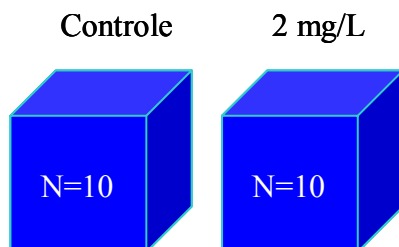


FIGURA 18 - Desenho experimental da exposição ao fenol I - avaliação histopatológica do matrinxã.

TABELA 2 - Biometria dos matrinxãs no final do experimento da avaliação histológica após a exposição ao fenol por 96 horas.

Concentração de fenol	Peso (g) \pm SD	Comprimento (cm) \pm SD
0 mg/L	276,1 \pm 50,97	25,88 \pm 1,67
2mg/L	256,3 \pm 77,34	25,37 \pm 2,17

4.1.3 Exposição ao fenol II e recuperação – Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo e da biotransformação hepática após a exposição ao fenol e após a recuperação por uma e duas semanas.

Nestes experimentos foram utilizados 120 exemplares de matrinxã, com peso e comprimento tal como na TABELA 3, divididos igualmente em doze lotes em tanques de 250 L. Os peixes foram privados de alimentação permanecendo sob fotoperíodo natural, aeração constante e temperatura controlada.

Exposição ao fenol

Seis lotes foram ensaiados como controle, ficando em água livre de fenol. Os outros seis lotes foram expostos por 96 horas a 2 mg/L (10% da CL₅₀). Os parâmetros de qualidade da água: oxigênio, temperatura, pH, condutividade, alcalinidade, dureza, amônia e fenol foram medidos a cada 24 horas. Após as 96 horas de exposição, dois tanques controle e dois expostos ao fenol foram escolhidos aleatoriamente. Destes foram retirados seis animais de cada tanque totalizando doze animais por lote; 12 peixes controles e 12 peixes expostos ao fenol (FIGURA 19). O sangue dos animais foi retirado com seringa heparinizada para análise dos parâmetros hematológicos e análises bioquímicas. Em seguida, os animais foram sacrificados para a excisão do fígado e do cérebro, que juntamente com o plasma foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C. Os eritrócitos lisados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C.

Recuperação da exposição ao fenol

Os lotes restantes, ou seja, os 80 exemplares de matrinxã com peso e comprimento tal como na TABELA 3, foram divididos igualmente em oito caixas de 250 L, sendo que 4 lotes passaram pela exposição ao fenol e os outros quatro não, e esses foram considerados controles e permaneceram em água livre de fenol. Todos os

lotes foram, então, submetidos a dois períodos distintos de recuperação; uma e duas semanas, após a exposição. Os parâmetros de qualidade da água: oxigênio, temperatura, pH, condutividade, alcalinidade, dureza, amônia e fenol (descritos mais abaixo) foram medidos a cada 24 horas durante a recuperação. Após uma semana de recuperação, quatro tanques (dois tanques controle e dois expostos ao fenol) foram escolhidos aleatoriamente e seis animais de cada tanque foram retirados totalizando doze animais por lote (12 controles e 12 expostos ao fenol/ recuperação de uma semana). O mesmo foi feito com as quatro caixas restantes, porém após duas semanas de recuperação totalizando 12 controles e 12 expostos ao fenol/recuperação de duas semanas (FIGURA 19).

TABELA 3 - Biometria dos matrinxãs do experimento de exposição ao fenol por 96 horas e da recuperação por uma e duas semanas.

Condição experimental	Peso (g)	Comprimento (cm)
Controle da exposição	117,5 ± 21,78	21,6 2± 1,99
Exposto ao fenol	151,66 ± 50,18	23,04 ± 2,17
Controle da recuperação de 1 semana	132,91 ± 24,51	22,04 ± 1,19
Recuperação de 1 semana	129,50 ± 53,34	21,62 ± 2,62
Controle da recuperação de 2 semanas	122,66 ± 39,66	22,66 ± 1,40
Recuperação de 2 semanas	118,16 ± 43,38	20,58 ± 2,17

O sangue dos animais foi retirado com seringa heparinizada para análise dos parâmetros hematológicos e do sangue, e em seguida os animais foram sacrificados para a excisão do fígado e do cérebro, que juntamente com plasma foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, e os eritrócitos lisados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C.

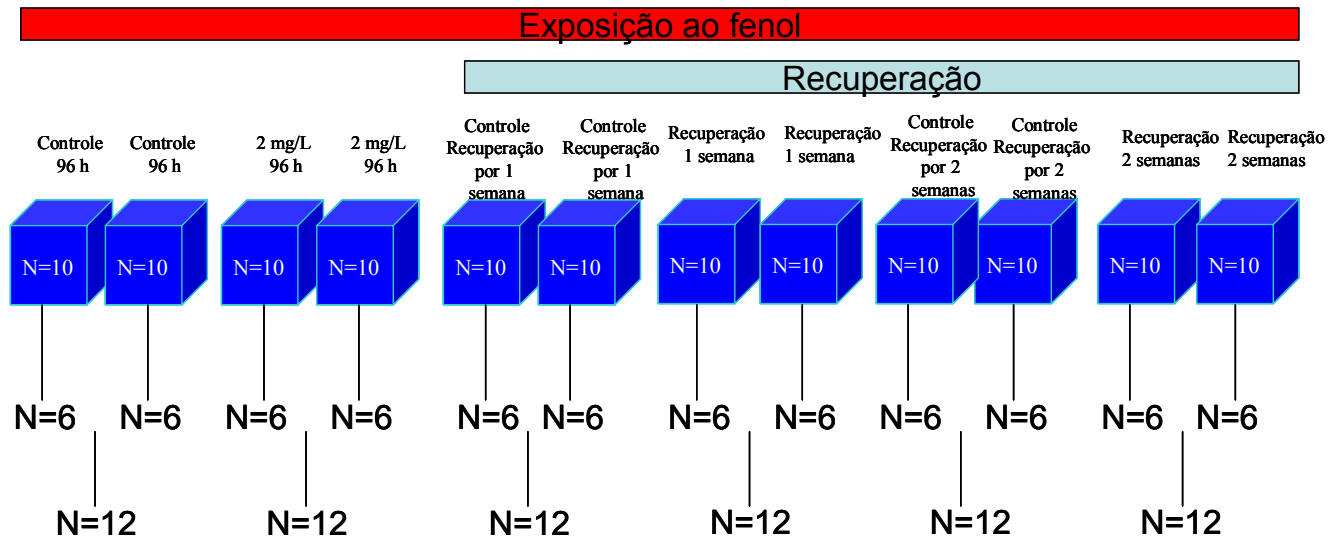


FIGURA 19 - Desenho experimental da exposição de matrinxã ao fenol II e da recuperação por uma e duas semanas em matrinxã.

4.2 Parâmetros de qualidade de água

4.2.1 Oxigênio, temperatura, condutividade e pH.

Os valores de oxigênio e temperatura foram determinados eletrometricamente com um oxímetro YSI-55, a condutividade com um Check Mate II Corning e o pH com um pH-metro Orion 710.

4.2.2 Dureza

As determinações de dureza foram feitas segundo a AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) (1980). Amostras de água contendo de 100 mL de cada caixa foram usadas na determinação da dureza da água. As amostras foram inicialmente tamponadas com 2 mL tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ (dissolvidos 67,5 g de NH_4Cl em 570 mL de NH_4OH e completado para um litro com água destilada), em seguida, acrescentou-se 8 gotas da solução indicadora ericromo negro T (dissolvida 4,5 g de NH_2OH . HCl e 0,5 g de ericromo negro T em 100 mL de etanol). Esta

solução foi então titulada com solução de EDTA (0,4 % com $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 %) até o ponto de viragem de lilás para azul puro. Para o cálculo da dureza em $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$ foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Dureza} = (\text{mL de EDTA}) \cdot (1000) \cdot F / \text{vol. da amostra}, \text{ onde } F = 1,001$$

4.2.3 Alcalinidade

As determinações de alcalinidade foram efetuadas segundo a técnica descrita por GOLTERMAN & CLYMO (1969). As amostras de água contendo 100 mL foram coletadas para as determinações de alcalinidade. Para a análise utilizou-se o ácido sulfúrico 0,01 N como indicador da alcalinidade para titular até o pH 4,0. Para o cálculo da alcalinidade das amostras, em mg/L de carbonatos e bicarbonatos, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Alcalinidade} = (\text{mL de H}_2\text{SO}_4) \cdot N \cdot 50000 / \text{vol. da amostra (mL)}$$

sendo N = normalidade do ácido sulfúrico.

4.2.4 Amônia

A amônia foi quantificada por nesslerização (método modificado de GENTZKOW & MASEN, 1942), tendo sido utilizados 2,0 mL da água e 0,5 mL de reativo de Nessler. Após 20 minutos, a leitura óptica foi realizada a 420nm. A concentração de amônia foi estimada contra um padrão de amônia contendo 100 nmols.

4.2.5 Nitrito

O nitrito foi determinado segundo TAVARES (1994) utilizando-se 5 mL da amostra da água. Às amostras foram adicionados 100 μ L de sulfanilamida (58,07 mM) seguido de agitação e repouso por 10 minutos. Após este período adicionou-se 100 μ L de solução de bicloridrato N-1 naftilenodiamina (3,86 mM), o produto da reação, de coloração rosa escura, foi determinado colorimetricamente em 540 nm. A concentração de nitrito foi estimada a partir de um padrão de nitrito contendo 50 nmols.

4.2.6 Fenol

As concentrações de fenol na água foram determinadas utilizando-se a reação de compostos fenólicos com aminoantipirina na presença de ferricianeto de potássio em pH 7,9 (APHA, 1980). A 100 mL de amostra foram adicionados 2,5 mL de NH_4OH (0,5 N) e em seguida o pH foi acertado com tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,8. Então, 1 mL de 4-aminoantipirina (2 %) e 1 mL de ferricianeto de potássio (8 %) foram adicionados às amostras, e após 15 minutos de reação o produto final foi lido em 500 nm contra um branco contendo água destilada. A curva padrão variou de 0,1 a 0,5 mg de fenol.

4.3 Preparações histológicas

Para a avaliação histológica, fragmentos de mais ou menos 1,5 cm de comprimento por 1 cm de altura de cada órgão foram retirados dos animais e pré-fixados em solução de formaldeído 10 % tamponado com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3, por cinco minutos em placa de parafina. Este procedimento foi utilizado para evitar retração do tecido e acúmulo de líquido intersticial em algumas regiões. Posteriormente, estes fragmentos foram imersos em solução de formaldeído 10 %

tamponado, por 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados para a retirada do fixador, em álcool 70 % por oito dias.

Após estes procedimentos, foi realizada a desidratação em série crescente de álcool (70 a 100 %) por 4 horas, diafanização em xilol por 2 horas e inclusão em parafina plástica por uma hora e trinta minutos. Na seqüência, foi feita a inclusão em parafina plástica Histosec® (Merck). Os blocos histológicos obtidos foram mantidos em geladeira. Em seguida, foi realizada a microtomia em micrótomo automático com auxílio de navalhas descartáveis, obtendo-se cortes de 5 µm em seqüência semi-seriada de um corte para 100 µm de descarte. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina/eosina e reação de PAS, segundo metodologia de BEHMER e colaboradores (1976).

4.4 Parâmetros Hematológicos

4.4.1 Hematócrito

Para determinação do hematócrito foram utilizados micro-capilares, que uma vez preenchidos com uma amostra de sangue foram vedados com massa de modelar e centrifugados a 12.000 x g por três minutos. Os valores, em porcentagem, foram determinados a partir de um cartão de leitura de hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971).

4.4.2 Hemoglobina total

Os níveis de hemoglobina total foram determinados utilizando-se a solução de Drabkin: KCN (0,5 g), KH₂PO₄ (1,4 g), K₃[Fe(CN)₆] (2 g) em 1 litro de água destilada (DRABKIN, 1948). Alíquotas de 10 µL de sangue foram adicionados a 2 mL dessa solução sendo os tubos agitados para obtenção de uma mistura homogênea. A densidade óptica foi medida em 540 nm contra um branco contendo somente a solução de Drabkin. Os valores de hemoglobina total foram determinados pela expressão matemática:

Hb total (gHb/dL)= densidade óptica x 1,6114/11 x diluição.

4.4.3 Contagem de eritrócitos (RBC):

A contagem de eritrócitos foi feita utilizando câmara de Neubauer em um microscópio óptico. Utilizou-se 10 µL de sangue misturados a 2 mL de solução de citrato formol (1,9 g citrato de sódio e 1 mL formaldeído 40 % em 50 mL de água). A contagem foi feita em cinco grupos de quadrados da câmara, os das quatro pontas (situados nos ângulos da área reticulada) e o quadrado do centro, que são subdivididos em 16 quadrados menores, resultando um total de 80 quadradinhos contados. Para o cálculo, somava-se o valor de eritrócitos dos 5 grupos de quadrados tendo um total de eritrócitos em 1/5 de 0,1 mm³, e então calculava-se o número de células em 1 mm³ levando em conta a diluição (LIMA, 1969). A formula utilizada foi:

$$\text{RBC} = \sum \text{número de eritrócitos}/100 \times 10^6/\text{mm}^3$$

4.4.4 Volume corpuscular médio (VCM)

O cálculo do volume corpuscular médio foi feito através da seguinte expressão:

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

4.4.5 Hemoglobina corpuscular média (HCM)

O cálculo da hemoglobina corpuscular média foi feito através da seguinte expressão:

$$\text{HCM (pg/célula)} = [\text{Hbttotal (g\%)/RBC (milhões/mm}^3)] \times 10$$

4.4.6 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

O cálculo da concentração de hemoglobina corpuscular média foi feito através da seguinte expressão:

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

4.5 Antioxidantes não enzimáticos

4.5.1 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi determinado pelo método de condensação com a 2,4 dinitrofenilhidrazina na presença de tiouréia (CARR et al., 1983). Foram homogeneizados, em banho de gelo, uma alíquota de cérebro e uma de fígado (50 mg) em 1 mL de TCA a 20 %, e centrifugado a 12.000 x g por 3 minutos. A reação foi determinada pela adição de 250 µL de água destilada, 250 µL de homogeneizado de cérebro e de fígado e 25 µL de 2,6-diclorofenolindofenol a 0,2 %. Esta mistura reagiu por 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente foram adicionados 250 µL do reagente que continha tioureia (0,2 %), ácido metafosfórico (5 %) e 250 µL de dinitrofenilhidrazina a 0,2 % (em ácido sulfúrico 12 M). Esta mistura permaneceu por 3 horas a 60°C. Após este período foram adicionados 500 µL de ácido sulfúrico 18 M gelado e a amostra foi centrifugada a 500 x g por 10 minutos. Os tubos foram resfriados em gelo e a leitura óptica foi feita contra um padrão de 100 nmols de ácido ascórbico em 524 nm.

4.5.2 Glutathiona reduzida no sangue

Para a determinação da glutathiona reduzida foi utilizado o método de BEUTLER (1984) modificado. Um volume de 50 µL de sangue total foi adicionado a 0,5 mL de água destilada, para promover a lise das células. Deste hemolisado foi retirado 50 µL para a determinação da concentração de hemoglobina total. Ao

restante do hemolisado (500 μ L) foi adicionado 0,75 mL de solução de precipitação (1,67 g de ácido metafosfórico, 0,2 g de EDTA, 30 g de NaCl em 100 mL de água destilada), a suspensão foi centrifugada 12.000 \times g por 3 minutos em temperatura ambiente, 0,5 mL do sobrenadante foi retirado para a determinação da concentração de glutathiona reduzida. Ao volume do sobrenadante foi adicionado 2 mL de fosfato de sódio dibásico 0,3 M e a leitura óptica foi realizada em 412 nm contra um branco contendo água. Após esta leitura foi adicionado 0,25 mL de DTNB (ácido 5,5' - ditiobis- 2- nitrobenzóico), e depois de 10 minutos foi feita nova leitura, também a 412 nm. A concentração de glutathiona reduzida foi determinada contra um padrão de glutathiona reduzida contendo 100 nmols.

4.6 Antioxidantes enzimáticos eritrocitários

Todas as enzimas eritrocitárias foram determinadas segundo BEUTLER (1984).

4.6.1 Preparação dos eritrócitos para determinações enzimáticas.

Para a determinação das atividades enzimáticas nos eritrócitos foram necessários os processos de separação e lavagem destas células. Para isto, o sangue total foi centrifugado por 3 minutos em 12.000 \times g para separação do plasma. Em seguida o plasma e as células vermelhas foram separados por sucção, e o plasma foi estocado a -20 °C para análises posteriores.

Os eritrócitos foram lavados em três centrifugações, seguidas de diluição com cloreto de sódio. Para cada 1 mL de sangue total foi adicionado 1 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%, e os eritrócitos foram submetidos a uma centrifugação de 15 minutos a 5.000 \times g a 4 °C. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o cloreto de sódio foi novamente adicionado. A amostra foi, então, submetida a mais uma centrifugação de 5.000 \times g por dez minutos. Esta última centrifugação foi repetida mais uma vez. Após esta lavagem, os eritrócitos foram lisados com Tris-HCl 5 mM pH 8,0, e as amostras foram centrifugadas a 5.000 \times g por 10 minutos a 4 °C . O

sobrenadante foi utilizado para as medidas das enzimas eritrocitárias e de ânion superóxido.

4.6.2 Superóxido dismutase total - SOD

A atividade da SOD foi determinada através da auto-oxidação do pirogalol, que é inibido na presença da SOD. Em 100 μL de solução de eritrócitos lisados foram adicionados 700 μL de água destilada gelada, 200 μL de etanol PA e 120 μL de clorofórmio PA. O etanol e o clorofórmio foram utilizados para a precipitação da hemoglobina, pois o ferro dificulta a auto-oxidação do pirogalol. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a $4.000 \times g$ a 4°C e este sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade de superóxido dismutase.

Em uma cubeta de 3 mL foi adicionado 200 μL de Tris HCl-EDTA 1 M, pH 8,0 e um gradiente de volumes do hemolisado-etanol-clorofórmio, completando-se o volume para 1.960 μL com água destilada. As amostras foram pré-incubadas a 25°C por 5 minutos, seguido da adição de 40 μL de pirogalol 10 mM em HCl 10 mM. A atividade da SOD foi determinada sabendo-se que 1 unidade de SOD inibe 50 % da autooxidação do pirogalol. A variação da densidade óptica foi determinada em 420 nm em reações cinéticas de 5 minutos, com registro a cada 10 segundos.

4.6.3 Catalase - CAT

Para cada 100 μL do hemolisado foi adicionado 200 μL de solução de β -mercaptoetanol-EDTA (10 mL de EDTA 10 % somado a 50 μL de β -mercaptoetanol e completado para 1 L) e 20 μL de etanol 95 % para impedir a reversão da atividade da enzima.

Para ser feita a solução de peróxido de hidrogênio foi necessária a determinação da concentração exata do peróxido de hidrogênio estoque. Em uma cubeta foi adicionado 1,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 e a leitura óptica foi feita em 230 nm e foi chamada de DO_1 . Após esta leitura foi adicionado à mesma cubeta 200 μL da H_2O_2 estoque, diluído 100 vezes, e uma nova leitura óptica

foi realizada e chamada de DO₂. O cálculo baseou-se na subtração de DO₁ de DO₂ e multiplicando-se por 141, dado que o ξ da H₂O₂ é 0,071 e o volume final na cubeta era de 2 mL.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = (\text{DO}_2 - \text{DO}_1) \times 141$$

Para a determinação da atividade enzimática da catalase foi adicionado em uma cubeta de 3 mL 100 μ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, 1.800 μ L de H₂O₂ 50 mM e água destilada para completar o volume para 1.960 μ L. A mistura foi incubada por 2 minutos com um volume apropriado de hemolisado, em reação cinética, registrou-se o decréscimo de DO₂₃₀ a cada 10 segundos. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi 0,071/mM·cm.

4.6.4 Glutathione peroxidase -GPx

Para cada 100 μ L do hemolisado foi adicionado 200 μ L de solução de β -mercaptoetanol-EDTA (10 mL de EDTA 10% somado a 50 μ L de β -mercaptoetanol e completado para 1 L). A glutathione peroxidase foi determinada através da atividade da glutathione redutase e oxidação do NADPH, usando hidroperóxido como substrato.

Para a determinação enzimática foram adicionados à cubeta 100 μ L de Tris-EDTA 1 M pH 8,0, 20 μ L de glutathione reduzida (GSH) 0,1 M, 100 μ L glutathione redutase 10 U/mL, 100 μ L de NADPH 2 mM, 380 μ L de azida sódica 2,6 μ M, volume apropriado de hemolisado e água destilada para completar o volume de 970 μ L. Esta amostra foi pré-incubada por 4 minutos. Após este passo, foram adicionados 30 μ L de t-butil hidroperóxido 7 mM. O decréscimo da densidade óptica foi determinado contra um branco a 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi 6,20/mM·cm.

4.6.5 Glicose- 6-fosfato desidrogenase - G6PDH

Para cada 100 μL do hemolisado foi adicionado 200 μL de solução de β -mercaptoetanol-EDTA (10 mL de EDTA 10% somado a 50 μL de β -mercaptoetanol e completado para 1 L). A glicose 6 fosfato desidrogenase foi determinada através da reação de redução do NADP^+ .

O ensaio cinético continha 100 μL de tampão Tris-HCl 1 M pH 8,0 com EDTA 5 mM, 100 μL de MgCl_2 0,1 M, 100 μL de NADP^+ 2 mM, um volume apropriado da amostra e em seguida foi adicionado 50 μL de glicose 6 fosfato 0,1M. A produção de NADPH foi determinada por 2 minutos com registros a cada 10 segundos, a 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi 6,20/mM.cm.

4.7 Antioxidantes enzimático hepático

Todas as enzimas foram determinadas segundo BEUTLER (1984).

4.7.1 Preparação dos homogeneizado de fígado.

O homogeneizado de fígado foi feito com alíquotas contendo aproximadamente 40 mg às quais foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 contendo sacarose 0,25 M. As amostras foram homogeneizadas em homogeneizador tipo Turrax em banho de gelo, em baixa velocidade. Posteriormente, foram centrifugadas por 10 minutos a 15.000 $\times g$ a 4 °C e o sobrenadante, contendo em média 4 mg/mL de proteína, foi utilizado para as determinações enzimáticas.

4.7.2 Superóxido dismutase total - SOD

A atividade da SOD foi determinada através da auto-oxidação do pirogalol, que é inibido na presença da SOD. A atividade da enzima foi estimada no fígado, do

qual o homogeneizado foi diluído 10 vezes no mesmo tampão de homogeneização (tampão fosfato-sacarose).

A determinação da superóxido dismutase foi feita em uma cubeta de 3 mL, onde foi adicionado 200 μL de Tris HCl-EDTA 1 M, pH 7,5, e um gradiente de volumes do homogeneizado de fígado, completando-se o volume para 1.960 μL com água destilada. As amostras foram pré-incubadas a 25 °C por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 40 μL de pirogalol 10 mM em HCl 10 mM. A atividade da SOD foi determinada sabendo-se que uma unidade de SOD inibe 50 % da auto-oxidação do pirogalol. A variação da densidade óptica foi determinada a 420 nm em reações cinéticas de 2 minutos, com registro a cada 10 segundos.

4.7.3 Catalase - CAT

O homogeneizado de fígado foi diluído 200 vezes em tampão de homogeneização (tampão fosfato-sacarose). Ao homogeneizado foi adicionado 20 μL de etanol a 95% para impedir a reversão da atividade enzimática.

Para ser feita a solução de peróxido de hidrogênio foi necessária a determinação da concentração exata do estoque. Em uma cubeta foi adicionado 1,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 e a leitura óptica foi feita em 230 nm e foi chamada de DO_1 . Após esta leitura, foi adicionado à mesma cubeta 200 μL da H_2O_2 estoque, diluído 100 vezes, e uma nova leitura óptica foi realizada e chamada de DO_2 . O cálculo se baseou na subtração de DO_1 de DO_2 e multiplicando-se por 141, dado que ξ da H_2O_2 é 0,071 e o volume final na cubeta era de 2 mL.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = (\text{DO}_2 - \text{DO}_1) \times 141$$

A atividade da catalase foi determinada adicionando-se a uma cubeta de 3 mL 100 μL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, 900 μL de H_2O_2 a 50 mM e água destilada para completar 1.950 μL . A mistura foi incubada por 2 minutos com um volume apropriado de homogeneizado, em reação cinética, registrando-se os

decréscimos de DO_{230} a cada 10 segundos. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi 0,071/mM.cm.

4.7.4 Glutathione peroxidase -GPx

O homogeneizado utilizado na determinação de glutathione peroxidase foi diluído 100 vezes em tampão de homogeneização fosfato-sacarose. A glutathione peroxidase foi determinada através da reação glutathione redutase e da oxidação do NADPH, utilizando o hidroperóxido como substrato.

Para a determinação enzimática foram adicionados à cubeta de 1 mL: 100 μ L de Tris-EDTA 1 M pH 8,0, 20 μ L GSH 0,1 M, 100 μ L glutathione redutase 10 U/mL, 100 μ L de NADPH 2 mM, 380 μ L de azida sódica 2,6 μ M, volume apropriado de homogeneizado e um volume de água destilada para completar 970 μ L. Esta amostra foi pré-incubada por 2 minutos. Após este passo, foram adicionados 30 μ L t-butil hidroperóxido 7 mM. O decréscimo da densidade óptica foi determinado contra um branco a 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi 6,20/mM.cm.

4.7.5 Glicose 6 fosfato desidrogenase - G6PDH

O homogeneizado de fígado foi diluído 10 vezes em tampão fosfato-sacarose para as determinações. A glicose 6-P desidrogenase foi determinada através da reação redução do NADP⁺.

A atividade da enzima foi determinada em um ensaio cinético contendo tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, MgCl₂ 0,01 M, NADP⁺ 0,2 mM e um volume apropriado da amostra, para um volume final igual a 950 μ L. A reação ocorreu adicionando-se 50 μ L de G6P 0,1 M. A produção de NADPH foi determinada por 2 minutos registrando-se a cada 10 segundos em 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi 6,20/mM.cm.

4.8 Bioindicadores cerebrais e plasmáticos de toxicologia

4.8.1 Acetilcolinesterase (AChE)

Amostras de cérebro contendo aproximadamente 50 mg foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM contendo glicerol a 50% (v/v) pH 7,0 a 1000 rpm por 1 minuto em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado por 8 minutos a 21000 x g a uma temperatura de 4 °C, descartando-se o sedimento.

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi determinada no cérebro, através do método de ELLMAN modificado (1961). A atividade desta enzima foi medida cineticamente através da hidrólise da acetiltiocolina em ácido acético e tiocolina.

Em uma cubeta de 1 mL, adicionava-se tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 em quantidade suficiente para 1 mL, 50 µL de ácido ditiobisnitrobenzólico (DTNB) 6,4 mM (em tampão de reação) e um volume de homogeneizado contendo aproximadamente 11 µg de proteína. Em seguida, a reação foi iniciada pela adição de 50 µL do substrato acetiltiocolina 3,73 mM (também em tampão de reação). A formação do produto 5-tio-2-nitrobenzoato foi determinada cineticamente em espectrofotometro em 412 nm, a cada 15 segundos, por 2 minutos. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi 16,950/mM-cm.

4.8.2 Glutathione -S-transferase (GST)

A determinação da atividade geral de GST plasmática foi feita pelo método de HABIG e colaboradores (1974), cineticamente pela conjugação entre a glutathione e o xenobiótico 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Para a determinação da atividade foi adicionado a uma cubeta de 3 mL o plasma (com aproximadamente 5,41 mg de proteína), 80 µL de CDNB 50 mM em etanol (P.A) e quantidade suficiente de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 para completar o volume para 1.640 µL. A reação foi

pré-incubada por 1 minuto, e 360 μ L glutationa reduzida (GSH) 50 mM (preparado no mesmo tampão da reação) foram adicionados. O aparecimento do conjugado foi registrado por 2 minutos a cada 10 segundos 340 nm. O branco da reação continha todos os reagentes com exceção da amostra. A atividade enzimática foi obtida pela subtração dos valores do ensaio total dos valores do branco de enzima. Para cálculo da concentração de produto formado foi utilizado o coeficiente de extinção molar de CDNB (9,6/mM.cm).

4.9 Enzimas de biotransformação hepática

4.9.1 Preparação de microsomas e fração solúvel de fígado

Para a preparação da fração microsomal e da fração solúvel de fígado, as amostras foram homogeneizadas na razão de 1 g de tecido para 4 mL de tampão de homogeneização (tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 contendo sacarose a 0,25 M) a 2.000 rpm por 2 minutos, em banho de gelo. Posteriormente, o material foi centrifugado por 30 minutos por 14.000 $\times g$ a 4 °C, e o sobrenadante foi submetido a uma ultracentrifugação a 105.000 $\times g$ por 90 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como a fração solúvel e os precipitados foram suspensos no mesmo tampão de homogeneização, numa relação de 1 g (pesados no início) para 1 mL de tampão, com a utilização de homogeneizador manual do tipo Potter. Os microsomos foram fracionados, congelados em N₂ líquido e mantidos a -80 °C. As frações solúveis foram fracionadas e congeladas a -20 °C.

4.9.2 Glutathione S transferase (GST)

A determinação da atividade geral de GST hepática foi realizada segundo o método de HABIG e colaboradores (1974), determinado cineticamente através da formação do conjugado da glutathione com o 1, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A

reação foi realizada em uma cubeta de 3 mL contendo uma alíquota com até 150 µg de proteínas da fração solúvel hepática, 80 µL de CDNB 50 mM em etanol e uma quantidade de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 suficiente para completar 1.640 µL, que foi pré-incubando por 1 minuto. Após este tempo, adicionava-se 360 µL de glutathiona reduzida (GSH) 50 mM (preparada em tampão de reação). O aparecimento do conjugado foi registrado por 2 minutos a 340 nm. O branco da reação era idêntico ao ensaio, mas sem a fração solúvel. A atividade enzimática foi obtida pela subtração dos valores do ensaio total dos valores do branco de enzima. Para cálculo da concentração de produto formado foi utilizado o coeficiente de extinção molar de CDNB (9,6/mM·cm).

4.9.3 Teste de inibição da GST “in vitro” pelo fenol

O teste de inibição da GST pelo fenol “in vitro” foi feito em uma cubeta de 3 mL contendo uma alíquota com até 150 µg de proteínas da fração solúvel hepática, 80 µL de CDNB 50 mM em etanol, fenol 0,2 mg/L ou 1 mg/L ou 2 mg/L e uma quantidade de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 suficiente para completar 1.640 µL, a qual foi pré-incubada por 30 minutos. Após este tempo, adicionava-se 360 µL de glutathiona reduzida (GSH) 50 mM (preparado em tampão de reação). O aparecimento do conjugado foi registrado por 2 minutos a 340 nm. A atividade enzimática foi obtida pela subtração dos valores do ensaio total menos os valores do branco de enzima. Para cálculo da concentração de produto formado foi utilizado o coeficiente de extinção molar de CDNB (9,6/mM·cm).

4.9.4 Uridina difosfato glicuronosil transferase (UDPGT)

A atividade da enzima UDPGT foi feita através da formação do conjugado α -naftol com a uridina 5' difosfato glicurônico (SALLES, 2000). Para esta determinação foram adicionados a 25 µL de MgCl₂ (108 mM), volume suficiente da fração microsomal contendo aproximadamente 60 µg de proteína, 25 µL de uridina 5' difosfato glicurônico (UDPGA) 36 mM (preparado em tampão de reação) e uma

quantidade suficiente de tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7,0 para completar 300 μ L. Esta mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e, na seqüência, foi adicionado 30 μ L de α -naftol 6 mM (preparado em 24 % em etanol P.A. e 76 % de tampão de reação). A mistura foi homogeneizada em vortex e incubada à 40 ° C por 20 minutos. Após este período, a reação foi interrompida com a adição de 0,9 mL de ácido tricloroacético (TCA) 3 %. A mistura foi centrifugada a 5.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a leitura.

Um volume de 0,9 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de tampão glicina-NaOH 1,6 M pH 10,0 e a leitura foi feita em um espectrofluorímetro com 287 nm de excitação e 337 nm de emissão. A atividade enzimática foi determinada subtraindo os valores do ensaio total e do branco de enzima, e o cálculo do produto formado foi estimado contra um padrão de naftil-glicuronídeo contendo 6 nmol.

4.9.5 Teste de inibição da Uridina difosfato glicuronosil transferase (UDPGT) pelo fenol "in vitro"

Para este teste de inibição da UDPGT ou UGT pelo fenol "in vitro" foi feita uma reação contendo 25 μ L de $MgCl_2$ (108 mM), volume suficiente da fração microsomal contendo aproximadamente 60 μ g de proteína, 25 μ L de uridina 5' difosfato glicurônico (UDPGA) 36 mM (preparado em tampão de reação), fenol nas concentrações de 0,2 mg/L ou 1 mg/L ou 2 mg/L e uma quantidade suficiente de tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7,0 para completar 300 μ L. Esta mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e, na seqüência, foi adicionado 30 μ L de α -naftol 6 mM (preparado em 24% em etanol P.A e 76% de tampão de reação). A mistura foi homogeneizada em vortex e incubada a 40 ° C por 20 minutos. Após este período, a reação foi interrompida com a adição de 0,9 mL de ácido tricloroacético (TCA) 3 %, e a mistura foi centrifugada a 5.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a leitura.

Um volume de 0,9 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de tampão glicina-NaOH 1,6 M pH 10,0 e a leitura foi feita em um espectrofluorímetro com 287 nm de excitação e 337 nm de emissão. A produção do conjugado foi determinada em

um espectrofluorímetro com 287nm de excitação e 337 nm de emissão. A atividade enzimática foi determinada subtraindo os valores do ensaio total e do branco de enzima, e o cálculo do produto formado foi estimado contra um padrão de naftil-glicuronídeo contendo 6 nmol.

4.9.6 Sistemas de monoxigenases hepáticas dependente do citocromo P 450

Para determinação da atividade do sistema de monooxigenases hepáticas dependentes do citocromo P450 hepático, tomamos por base duas atividades enzimáticas de O-desetilação; uma da 7-etoxicumarina e outra da 7-etoxiresorufina, já que ambas dependem de catálise mediada por citocromo P450 na fração microsomal.

7-etoxicumarina-O-desetilase (ECOD)

A atividade de ECOD foi determinada segundo o método de CUNHA-BASTOS (2001) através da desetilação da 7- etoxicumarina em umbeliferona. A reação foi feita em um meio com volume final de 500 µL contendo água destilada, 50 µL tampão fosfato de potássio 0,5 M (pH 7,4), 5 µL de etoxicumarina 0,2 M em dimetil-sulfóxido (DMSO), 5 µL de MgCl₂ 1 M e fração microsomal contendo aproximadamente 400 µg de proteína. A reação foi pré-incubada por 3 minutos a 37 °C, e então, iniciada pela adição de 20 µL de NADPH 25 mM. Após 15 minutos a 37°C a reação foi paralisada pela adição de 500 µL de TCA 5%. Os brancos de enzima só receberam NADPH após a interrupção da reação.

Os tubos foram centrifugados a 500 x g por 15 minutos e 500 µL do sobrenadante foram adicionados a 2 mL de tampão glicina 1,6 M (pH 10,3), e imediatamente a umbeliferona foi misturada a reação e medida contra um branco em um fotofluorímetro em 390 nm de excitação e 440 nm de emissão. A curva padrão de umbeliferona (10, 20 e 40 pmol preparada em etanol) foi realizada nas mesmas

condições do ensaio usando-se 100 μ L albumina sérica bovina 5 mg/mL em substituição às proteínas microssomais.

7-Etoxiresorufina-O- desetilase (EROD)

A atividade da EROD foi determinada segundo o método de CUNHA-BASTOS (2001) através da O-desetilação da 7-etoxiresorufina em resorufina. A atividade foi medida cineticamente em volume de incubação de 2 mL, por 3 minutos, utilizando um volume apropriado de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,8), 10 μ L de 7-etoxiresorufina em DMSO 0,5 mM, um volume da fração microssomal contendo aproximadamente 350 μ g de proteína, 10 μ L de $MgCl_2$ 1 M, 20 μ L de NADPH 25 mM . A reação foi iniciada pelo acréscimo NADPH e a formação de resorufina foi detectada por no fotofluorímetro com 550 nm de excitação e 582 nm de emissão. A curva padrão de resorufina foi feita nas mesmas condições do ensaio medindo-se a intensidade de fluorescência após a reação. A atividade da enzima foi determinada calculando-se a variação da intensidade de fluorescência contra o padrão de resorufina que continha 20 pmol.

4.10 Proteína no homogeneizado dos tecidos

A proteína total foi determinada nos mesmos homogeneizados utilizados nas determinações enzimáticas. A quantificação foi feita pelo método descrito por KRUGER (1994) que utiliza o reagente de Bradford, consistindo de uma mistura de 100 mL ácido fosfórico 85 %, 50 mL de etanol 95 % e 100 mg de "Comassie Brilliant Blue", e completando-se o volume para 1 L. Esta mistura foi filtrada 2 vezes e armazenada a 4 ° C. Depois de feitas as diluições apropriadas para cada tecido, 10 μ L de cada amostra foram transpostas em duplicata numa micro-placa, e 200 μ L do reagente de BRADFORD foram adicionados em cada poço. A leitura da placa foi realizada após 5 minutos de descanso, no escuro, em 600 nm utilizando um leitor de micro placas.

4.11 Análise Estatística

A determinação do CL₅₀/96 horas foi feita através do software “Trimmed Spearman-Kärber” “LC50 Programs JSPEAR” (HAMILTON et al., 1978) para um intervalo de 96 horas.

O delineamento estatístico utilizado foi o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov com 90% de confiança, e as diferenças entre os grupos foram testadas com um teste paramétrico não pareado, que compara os grupos dois a dois, com $p < 0,05$. Os dados foram calculados utilizando o software Graph Pad InStat, versão 3.0/1997. Cada grupo foi comparado somente com o seu controle.

As determinações de correlações entre os dados foram feitas pelo teste não paramétrico de Spearman, com 95% de confiança, realizado pelo software Graphpad Prism, versão 4.0, abril, 2003.

Os dados são apresentados como médias \pm desvio-padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Toxicidade aguda- CL₅₀/96h

Os dados de qualidade de água estão representados no Quadro 1 e não mostraram alteração durante todo o experimento, exceto para a amônia e fenol que aumentaram cada 24 horas.

Os animais expostos ao fenol apresentaram um comportamento diferente do controle, com atividade natatória reduzida e menor agressividade. O matrinxã costuma nadar em cardume sendo constantemente ativo, e com exemplares apresentando maior agressividade. Porém, os peixes expostos ao fenol se mostraram menos agressivos e nenhum canibalismo foi registrado durante o experimento.

Os resultados do teste de CL₅₀/96h para o matrinxã mostraram mortalidade zero no controle e nas concentrações 1, 5 e 10 mg/L. No grupo que foi tratado com 25 mg/L, cinco peixes morreram após 48 horas. Na concentração mais alta, 50 mg/L, todos os animais morreram em 24 horas. Esses dados estão sumarizados na TABELA 4. A CL₅₀/96h do fenol foi 17,4 mg/L com 95% de confiança, apresentando variação de 14,71 mg/L a 19,96 mg/L (FIGURA 20), e os dados foram calculados através do software "Trimmed Spearman-Kärber-LC₅₀ Programs JSPEAR" (HAMILTON et al., 1978). O valor de fenol utilizado em todos os experimentos de exposição foi 10% da CL₅₀ de 96 horas, ou seja, 2 mg/L.

TABELA 4. Sobrevivência de *B. amazonicus*, matrinxã, expostos ao fenol.

Fenol (mg/L)	Sobrevivência		
	n (inicial)	n (96 horas)	(%)
0	10	10	100
1	10	10	100
5	10	10	100
10	10	10	100
25	10	5	50
50	10	0	0

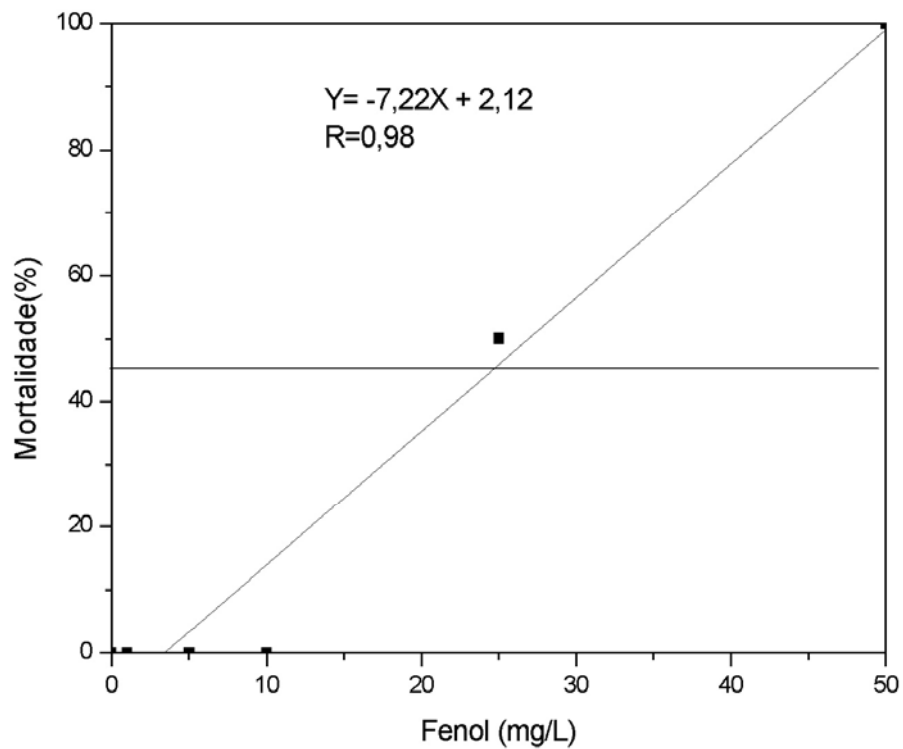


FIGURA 20 - Frequência de mortalidade de *Brycon amazonicus* exposto ao fenol para cálculo da CL_{50} de 96 horas. O valor de 50% de mortalidade calculada corresponde a 17,4 mg/L

QUADRO 1 - Qualidade da água durante o teste de toxicidade do fenol (CL₅₀) por 96 horas para *Brycon amazonicus* matrinxã.

Parâmetro	Fenol (mg/L)											
	0		1		5		10		25		50	
	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h
pH	7,41±0,15	7,66±0,20	7,45±0,09	7,63±0,15	7,46±0,07	7,75±0,15	7,52±0,25	7,58±0,33	7,41±0,08	7,46±0,17	7,47±0,07	7,47±0,07
Cond. (µS/cm ³)	86,3±12,7	78,7±1,81	87,8±12,7	79,1±2,0	88,0±13,5	77,82±1,9	91,4±18,5	80,95±4,0	89,2±13,4	81,0±1,19	101,8±0,2	101,8±0,2
OD (mg/L)	6,04±0,36	5,75±0,93	6,04±0,26	5,8±0,81	5,73±0,25	5,29±1,36	5,70±0,39	4,70±1,05	5,74±0,49	4,91±1,31	5,91±0,23	5,91±0,23
Temp. (C°)	23,1±0,88	22,25±1,5	23,1±0,88	22,25±1,5	23,12±0,8	22,2±1,48	23,22±0,8	23,07±2,1	23,2±0,85	22,77±1,9	22,3±0,07	22,3±0,07
Dureza (mg/L)	37,4±6,98	33,75±1,7	36,6±6,34	34,75±1,8	37,6±5,59	36,75±4,9	41±7,54	33±0,81	38,8±6,37	38±1,41	46±1,41	46±1,41
Alc. (mg/L)	48,4±6,85	42,15±1,3	47,4±7,17	42,12±1,4	46,9±6,37	46,3±3,75	49,5±10,3	46,0±5,36	47,1±7,36	45,2±3,32	54,5±0,70	54,5±0,70
NH ₃ (mg/L)	0,35±0,03	0,27±0,03	0,27±0,02	0,40±0,03	0,53±0,05	1,42±0,1	0,38±0,02	0,89±0,03	0,40±0,02	0,70±0,01	0,52±0,02	0,52±0,02
NO ₂ (mg/L) x10 ⁻³	1±0,2	6,9±0,3	1,6±0,1	5,8±0,3	6,4±0,4	10 ± 0,5	4,7±0,1	14±0,9	10±0,1	8±0,6	4,5±0,7	4,5±0,7

Os valores estão expressos em Média ± DP. Cond=condutividade; OD= oxigênio dissolvido; Temp=temperatura; Alc= alcalinidade; NH₃= amônia; NO₂=nitrito

5.2 Exposição ao fenol I - Avaliação histopatológica

Os resultados da avaliação histológica estão apresentados por fotos. Durante todo o experimento a concentração de 2 mg/L fenol não causou a morte de nenhum animal. Foi observado quando exposição ao fenol diminuem um pouco a sua atividade de natação em relação ao controle. Não ocorreu canibalismo. Os dados da qualidade de água mostraram que os valores permaneceram constantes durante o experimento exceto pelo aumento da amônia durante as 24 horas e a queda da concentração do fenol durante as mesmas 24 horas. Os dados sobre a qualidade de água deste experimento estão no Quadro 2.

5.2.1 Brânquias

As brânquias do grupo controle mostraram epitélio interlamelar baixo e estas células de revestimento formaram no máximo 2 ou 3 camadas de células. As brânquias apresentaram tanto as lamelas primárias altas como as lamelas secundárias altas. As células apresentaram núcleo com a coloração roxa (acidófilo) e citoplasma com a coloração rosa (basófilo). Foram encontrados de 1 a 2 núcleos por célula e estes também se apresentaram de tamanho uniforme. Não foram encontradas muitas células mucosas, porém foram verificadas muitas células cloreto na lamela primária. As células apresentaram-se sem edema, bem organizadas e havia muito sangue no sistema branquial. Não foram encontradas injúria nas brânquias dos matrinxãs do grupo controle.

Os matrinxãs que foram expostos ao fenol apresentaram células branquiais com citoplasma e núcleo de coloração preservada. A lamela secundária apresentou fusão apical e, em vários pontos, apresentou também fusão total. Além disso, também foi possível observar congestão sanguínea e edema subepitelial pequenos, e em alguns casos, necrose com núcleos em picnose. Em alguns pontos foi possível verificar a formação de aneurisma na lamela primária. O sistema branquial dos animais exposto apresentou mais sangue que o controle, além de apresentar congestão sanguínea. Os resultados estão representados na FIGURA 21.

5.2.2 Fígado

O fígado do matrinxã controle exibiu hepatócitos pequenos, com formato hexagonal, levemente arredondado, com núcleo central e basófilo e citoplasma pouco acidófilo. Os hepatócitos apresentaram-se organizados ao redor dos capilares sinusóides, porém não se exibiram organizados em um arranjo cordonal característico. Ao redor das veias verificou-se a presença de grande quantidade de tecido pancreático exócrino altamente basófilo e com muitos grânulos. O fígado de matrinxã mostrou pouca reserva de glicogênio nos hepatócitos, quando corados com a PAS, apresentando uma coloração rosa intensa e pouca reação pode ser observada. O fígado não apresentou alterações injúrias nos tecidos observados.

O fígado dos matrinxãs expostos ao fenol apresentou um aumento no diâmetro dos capilares sinusóides e estase sanguínea nesses capilares, com possível estase biliar. A quantidade de glicogênio na coloração de PAS diminuiu em relação ao controle. Um corte histológico hepático é apresentado nas figuras 22 e 23.

QUADRO 2 - Qualidade da água durante a exposição de *Brycon amazonicus* matrinxã ao fenol (2mg/L) por 96 horas.

Tempo (horas)	pH		Cond. ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)		OD (mg/L)		Temp. ($^{\circ}\text{C}$)		Alc. CO_3^- (mg de /L)		Dureza CaCO_3 (mg /L)		NH_3 (mg/L)		Fenol (mg/L)	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
0 I	7,64	7,70	104,9	104,0	5,25	5,12	27,1	27,1	63	63	105,1	89	0,27	0,25	0	0
0 R	7,70	7,81	104,6	99,8	5,53	5,90	26,6	26,6	63	63	91	97	0,42	0,37	0	1,91
24 I	7,78	7,84	115,7	112,4	5,91	5,85	24,3	24,5	63,5	70	97	98	0,53	1,42	0	1,67
24 R	7,39	7,45	110,0	101,5	5,84	5,92	25,4	25,4	50,5	50	66	63	0,21	0,15	0	1,950
48 I	7,75	7,35	105,0	110,5	6,26	6,22	24,7	25,4	60	61	66	63	0,405	0,79	0	1,52
48 R	8,02	7,33	10,30	108,2	5,70	5,75	24,9	25,0	65	64	70	70	0,095	0,06	0	2,03
72 I	7,40	7,35	111,0	108,6	6,27	5,92	25,6	26,3	63	63	67	68	0,186	0,09	0	1,59
72 R	7,5	7,65	111,0	107,9	5,57	5,29	27,6	27,6	62,5	63	67	66	0,169	0,16	0	1,98
96 I	7,65	7,45	104,6	103,5	6,23	5,20	26,5	26,6	63	63	67	66	0,233	0,16	0	1,45

Teste realizado para avaliação histopatológica da exposição ao fenol. Cond=condutividade; OD=oxigênio dissolvido; Temp= temperatura; Alc=alcalinidade; NH_3 =amônia; C= controle; E=exposto ao fenol. 0h é o início do experimento. I= água após 24 horas em sistema semi estático. R= após a renovação da água e reposição do fenol nos tratamentos.

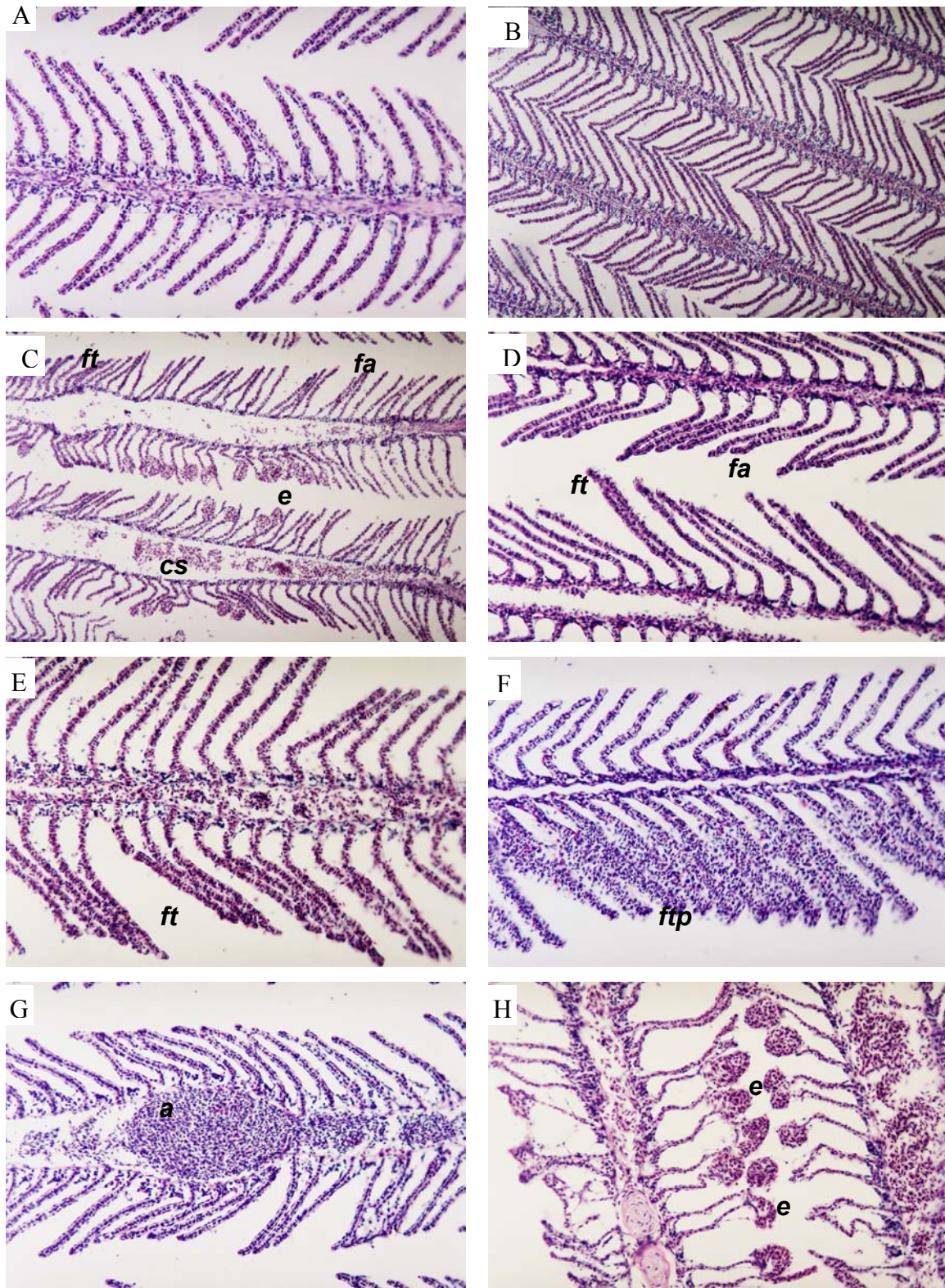


FIGURA 21 - Brânquia de *Brycon amazonicus*. **A** - controle, HE (20X); **B** - controle, HE (10X); **C** - Expostos ao fenol, HE (10X), *ft* - fusão lamelar total, *fa* - fusão lamelar apical; *e* - edema subepitelial e *cs* - congestão sanguínea; **D** - Expostos ao fenol, PAS (20X), *ft* - fusão lamelar total; **E** - Expostos ao fenol, HE (20X), *ft* - fusão lamelar total; **F** - Expostos ao fenol, PAS (20X), *ftp* - fusão lamelar total com perda da função; **G** - fenol, PAS (20X) *a* - aneurisma na lamela primária e **H** - Expostos ao fenol, HE (20X), *e* - edema subepitelial.

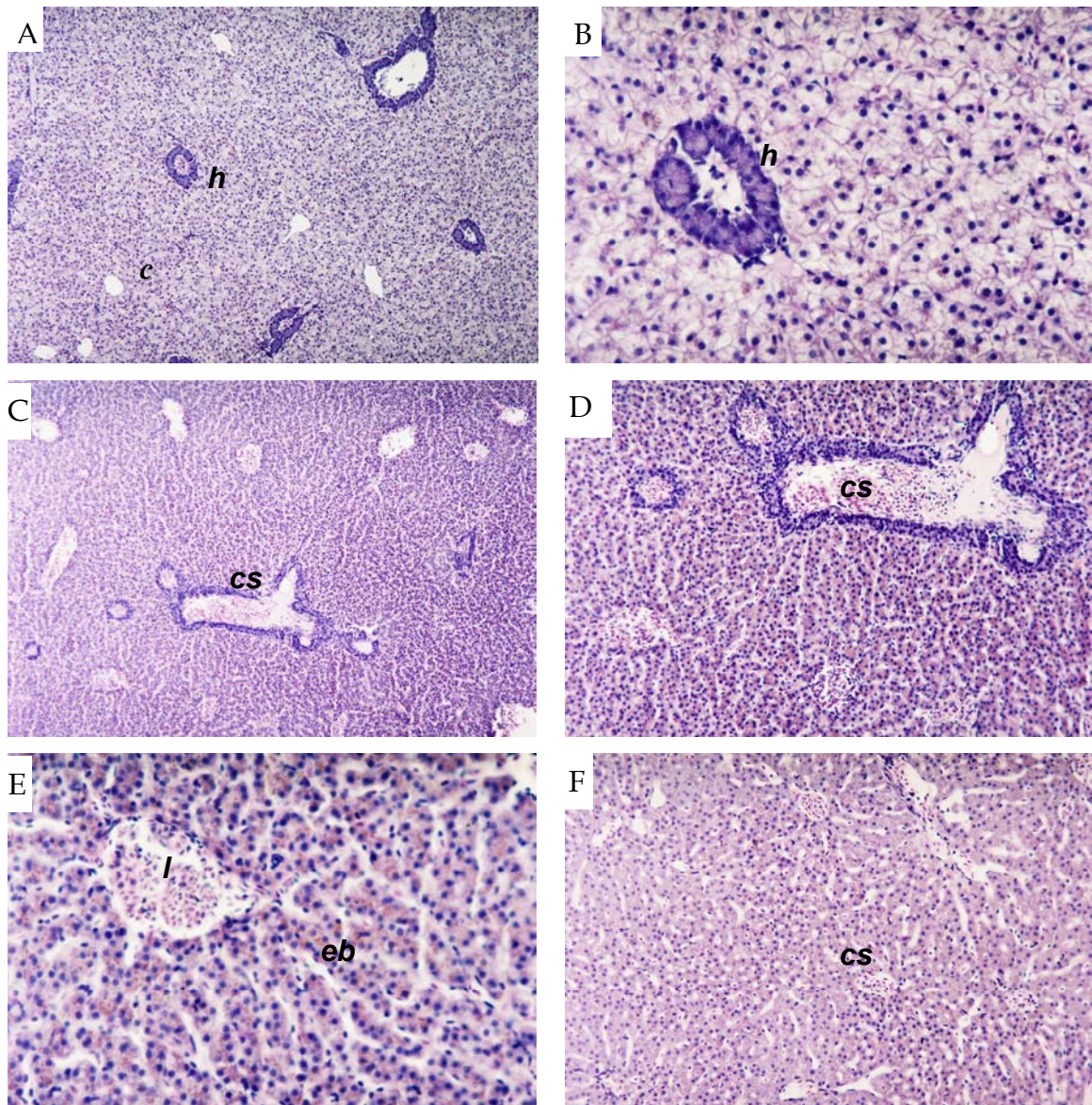


FIGURA 22 - Fígado de *Brycon amazonicus*. **A** - controle, HE (10X), arranjo não cordonal; **B** - controle, HE (40X) hepatopâncreas; **C** - Expostos ao fenol, HE (10X), *c s* - congestão sanguínea; **D** - Expostos ao fenol, HE, (20X), *s* - muito sangue nos vasos sanguíneos; **E** - Expostos ao fenol, HE, (40X), *l* - aumento da luz nos capilares sinusóides, *eb* - estase biliar **F** - Expostos ao fenol, HE, (20X) e **F** - Expostos ao fenol, HE, 20X, *cs* -congestão sanguínea.

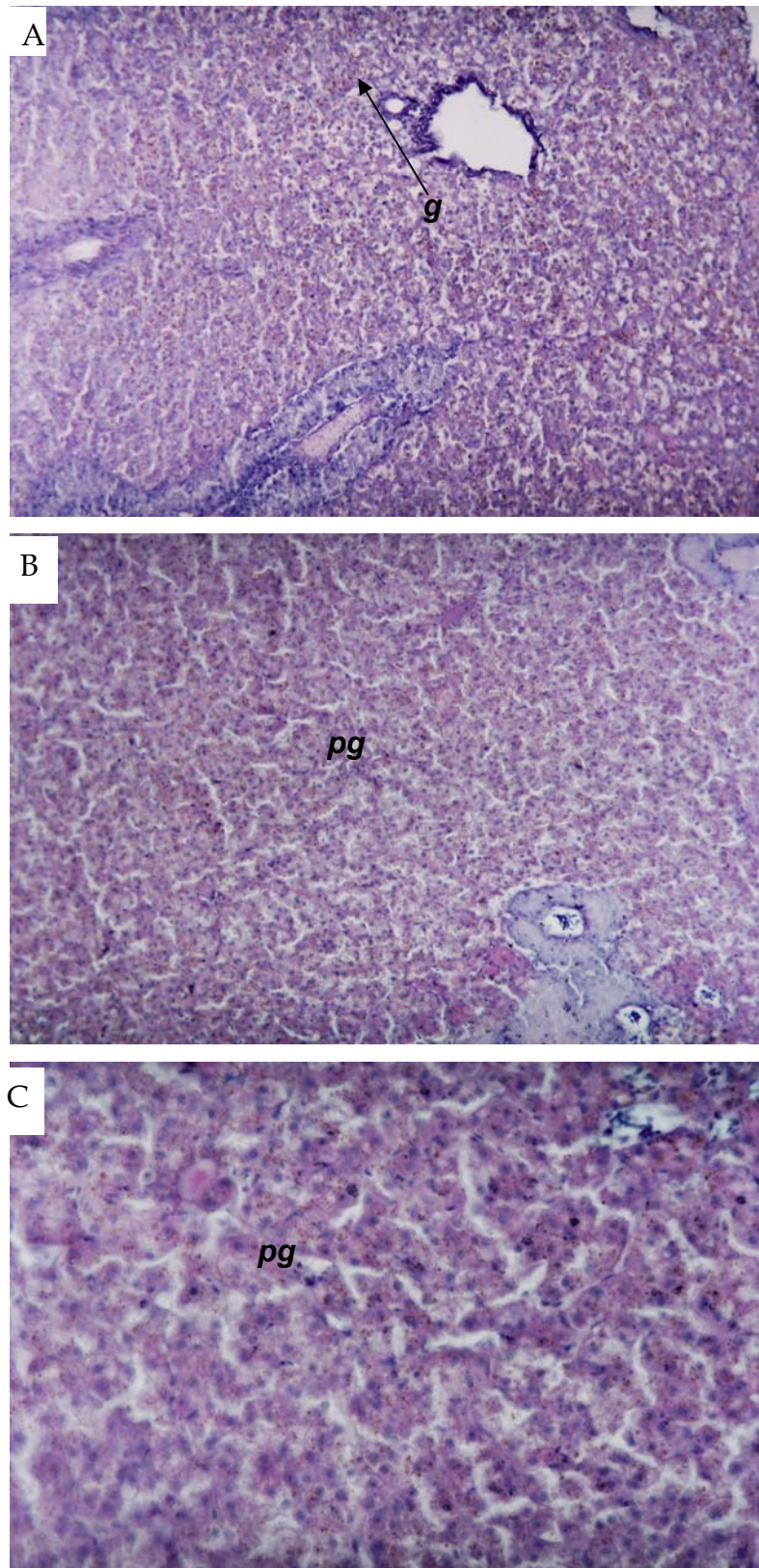


FIGURA 23 - Fígado de *Brycon amazonicus*. A - controle, PAS (20 X), g - glicogênio; B - Expostos ao fenol, HE (20X), pg - pouco glicogênio em cada hepatócito; C - fenol, PAS (40X), pg - pouco glicogênio em cada hepatócito.

5.2.3 Rim

O rim de matrinxã não exposto ao fenol apresentou-se revestido por uma delgada cápsula de tecido conjuntivo frouxo e uma serosa externa composta por mesotélio. O tecido renal é composto por néfrons constituídos pela cápsula renal (glomérulo e cápsula de Bowman ou cápsula glomerular), túbulo urinário e túbulos contorcidos proximais e distais. Entremeados ao rim, observou-se a presença de tecido intersticial. O corpúsculo renal é composto de cápsula glomerular constituída externa e internamente por uma ou duas camadas de epitélio pavimentoso simples e pelo glomérulo que é constituído de arteríolas aferentes que voltam a se unir formando as arteríolas eferentes. Os túbulos contorcidos proximais apresentaram os maiores diâmetros de lúmen. Eles são formados por um epitélio cúbico simples ciliado caracterizado por coloração rosa intensa (PAS positivos), que indica presença de glicoproteínas em sua constituição. Esta estrutura também é conhecida como borda em escova. As células deste epitélio apresentaram citoplasma levemente acidófilo e núcleo oval ou arredondado localizado na porção mediana da célula. Os túbulos contorcidos distais exibiram os menores diâmetros e não apresentaram borda em escova. As células e a organização do epitélio foram similares ao observado nos túbulos contorcidos proximais. O tubo urinário apresentou-se revestido por epitélio pavimentoso simples com longos cílios. O tecido intersticial é formado por tecido linfocitário e tecido hematopoiético, ou seja, células sanguíneas em processo de formação e maturação. Os rins de matrinxãs do grupo controle apresentaram estruturas tissulares normais.

Os matrinxãs expostos ao fenol apresentaram formação de um espaço entre o glomérulo e a cápsula renal, devido à hipertrofia das arteríolas aferentes e eferentes. Os rins estão representados pela FIGURA 24.

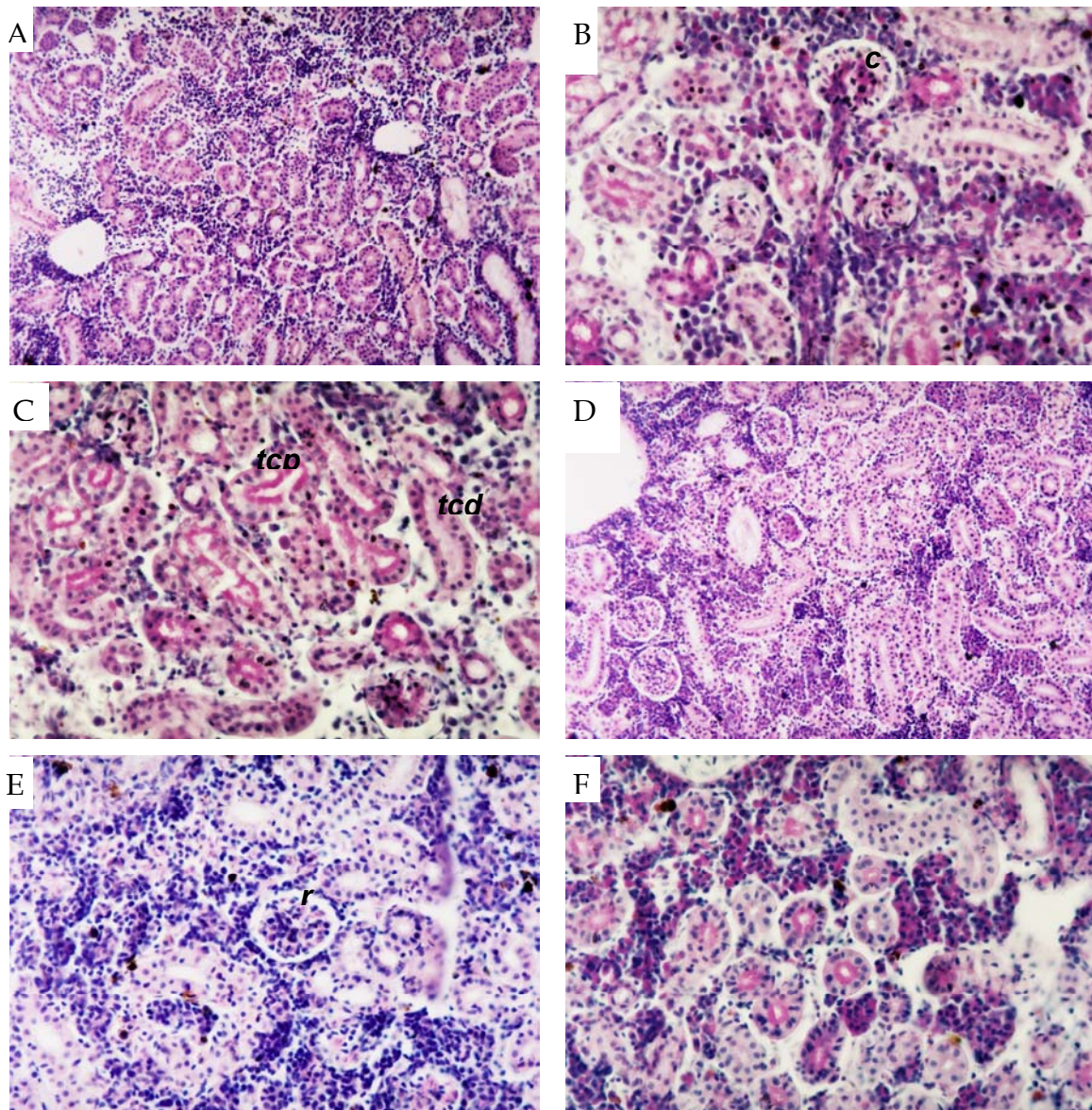


FIGURA 24 - Rim de *Brycon amazonicus*. **A** - controle, HE (20 X); **B** - controle, PAS (40X), *c* - cápsula de Bowman **C** - controle, PAS (40X), *tdp* - túbulos contorcidos proximais e *tcd* - túbulos contorcidos distais; **D** - Expostos ao fenol, HE (20X); **E** - Expostos ao fenol, HE (40X), *r* - retração da cápsula de Bowman; **F** - Expostos ao fenol, PAS (40X).

5.3 Exposição ao fenol II - Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo, biotransformação hepática e recuperação.

Os matrinxãs apresentaram uma diminuição da atividade natatória durante a exposição ao fenol, porém isso não ocorreu durante a recuperação. Durante todo o experimento, mesmo sem ser alimentados, não foi observada nenhuma mortalidade, porém, ao final das duas semanas de recuperação verificamos mortalidade de 2 peixes controles e 2 da recuperação.

Os dados de qualidade da água permaneceram semelhantes durante todo o experimento, ocorrendo um aumento da amônia e uma redução da concentração do fenol no final das 24 horas. Os dados sobre a qualidade de água estão no Quadro 3.

QUADRO 3 - Qualidade da água durante a exposição do *Brycon amazonicus* matrinxã ao fenol por 96 horas, e a recuperação.

Tempo (horas)	pH		Cond. ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)		OD (mg/L)		Temp. ($^{\circ}\text{C}$)		Alc. CO_3^- (mg /L)		Dureza CaCO_3 (mg L)		NH_3 (mg/L)		Fenol (mg/L)	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
0 I	7,39	7,58	80,2	80,5	5,87	4,6	24,3	24,3	110	110	37	37	0,27	0,25	0	0
0 R	7,48	7,53	80,	81,3	5,7	4,7	24,5	24,4	109	109	37	37	0,42	0,37	0	1,91
24 I	7,59	7,70	82	81	4,33	5,08	23,2	23,1	100	100	38	38	0,53	1,42	0	1,67
24 R	7,75	7,73	80	80	5,5	4,45	23,2	23,2	105	105	38	38	0,21	0,15	0	1,950
48 I	7,30	7,53	79	78	5,66	5,74	23,0	23,1	100	100	40	40	0,405	0,79	0	1,52
48 R	7,40	7,60	79	78	5,5	5,32	24,8	24,9	100	100	40	40	0,095	0,06	0	2,03
72 I	7,60	7,70	80,5	80,5	4,93	5,0	24,6	24,6	100	100	40	40	0,186	0,09	0	1,59
72 R	7,60	7,70	80,5	80,5	5,56	5,15	25,5	25,2	100	100	40	40	0,169	0,16	0	1,98
96I	7,42	7,52	79,6	78,7	4,23	4,99	25,8	25,6	100	100	40	41	0,233	0,16	0	1,45
1 Rec	7,60	7,60	80,5	80,5	6,0	6,36	25,8	26,0	105	105	38	39	0,145	0,14	0	0
2 Rec	7,5	7,50	80,5	80,5	6,90	6,65	23,8	23,5	105	105	40	40	0,15	0,15	0	0

C= controle; E=exposto ao fenol; Cond=condutividade; OD=oxigênio dissolvido; Temp= temperatura; Alc=alcalinidade; NH_3 =amônia; C= controle; E=exposto ao fenol. 0h é o início do experimento. I= após 24 horas em sistema semi-estático. R= após a renovação da água e reposição do fenol nos tratamentos Rec=recuperação (semanas 1 e 2).

5.3.1 Parâmetros hematológicos

5.3.1.1 Hematócrito - Hct

O hematócrito de matrinxã exposto ao fenol apresentou um aumento de 10%. Os matrinxãs da recuperação de uma semana apresentaram um aumento significativo de 16% enquanto os de duas semanas mostraram uma redução de 9% em relação aos seus controles. As médias e desvios padrão do hematócrito estão apresentados na FIGURA 25.

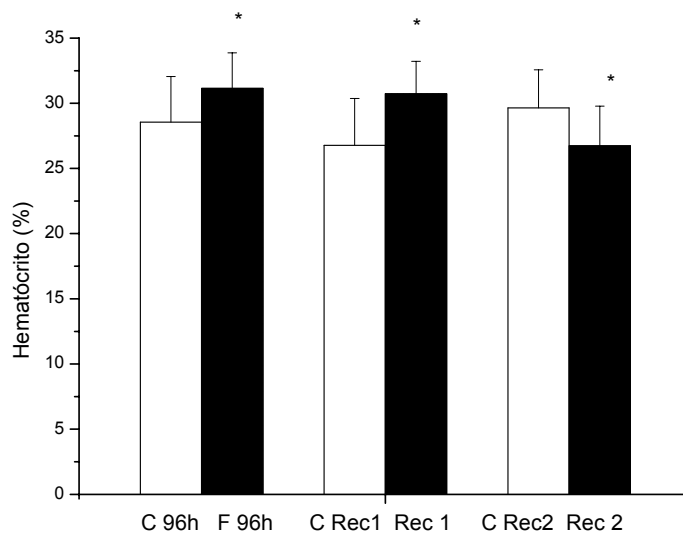


FIGURA 25 - Hematócrito (%) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.1.2 Hemoglobina total

A hemoglobina total não variou ao longo do período experimental (exposição e recuperação) As médias e desvios padrão estão apresentados na FIGURA 26.

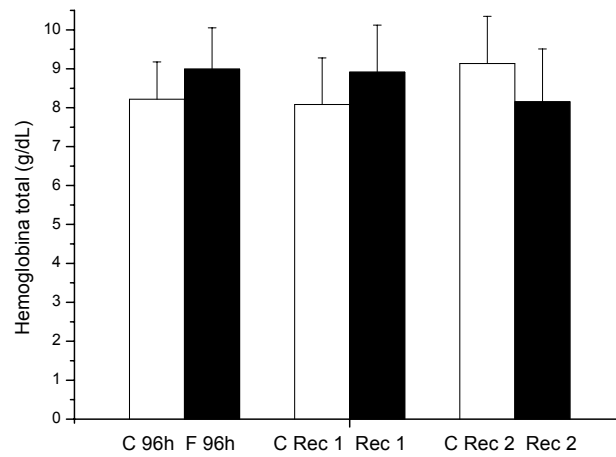


FIGURA 26–Hemoglobina total (g/dL) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.1.3 Contagem de eritrócitos

Não se observou alteração no número de eritrócitos do matrinxã durante a exposição ao fenol ou após a recuperação em relação aos respectivos controles. As médias e desvios padrão estão na FIGURA 27.

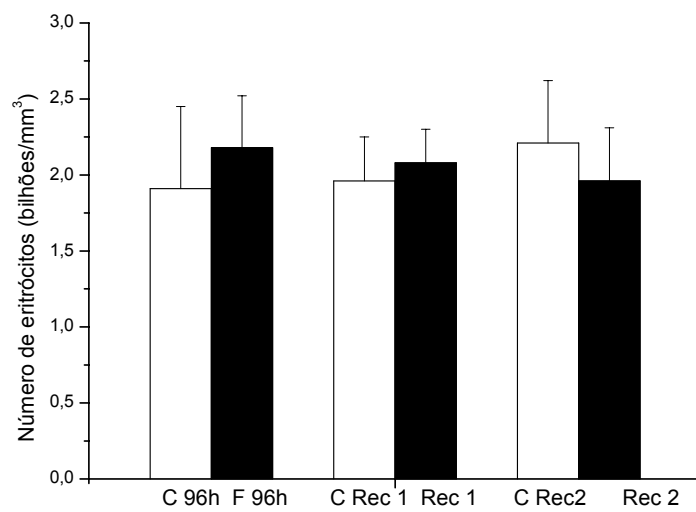


FIGURA 27 - Número de eritrócitos (bilhões/ mm³) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.1.4 Volume corpuscular médio

Os valores de volume corpuscular médio dos eritrócitos não variaram ao longo do período experimental (exposição e recuperação). As médias e desvios padrão estão apresentados na FIGURA 28.

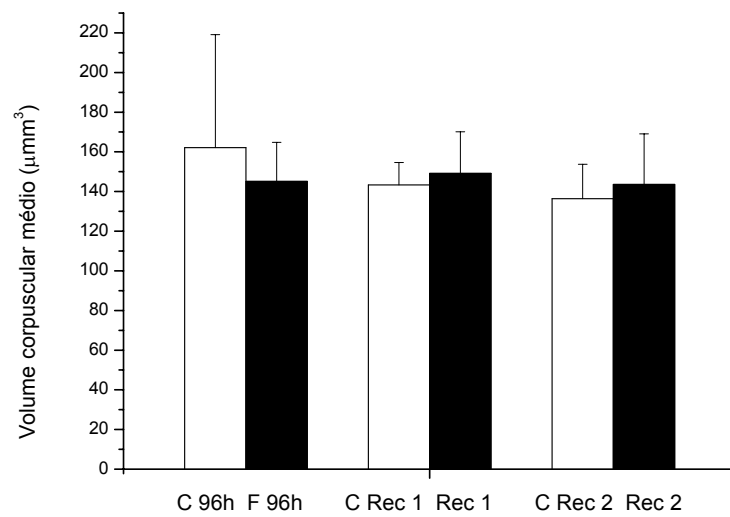


FIGURA 28 - Volume corpuscular médio (μmm^3) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.1.5 Hemoglobina corpuscular média

Os valores de hemoglobina corpuscular média não se alteraram no matrinxã quer durante a exposição ao fenol quer durante a recuperação. As médias e desvios padrão estão na FIGURA 29.

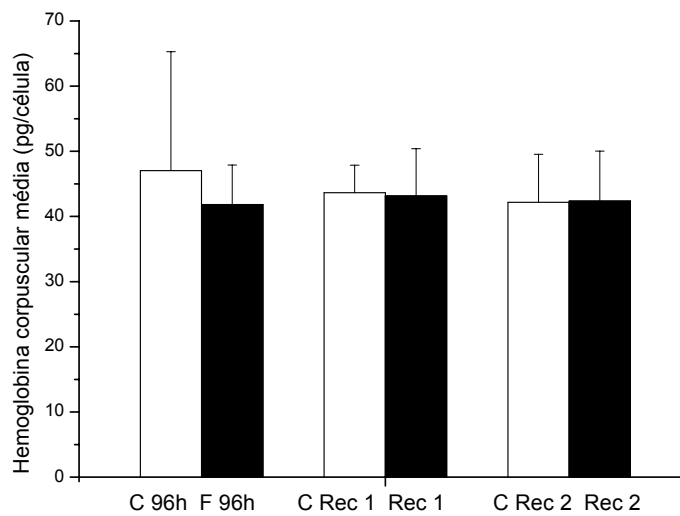


FIGURA 29 - Hemoglobina corpuscular médio (pg/célula) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.1.6 Concentração de hemoglobina corpuscular média

Os valores da concentração de hemoglobina corpuscular média não apresentaram diferenças significativas tanto nos animais expostos ao fenol quanto nos em recuperação. As médias e os desvios padrão estão na FIGURA 30.

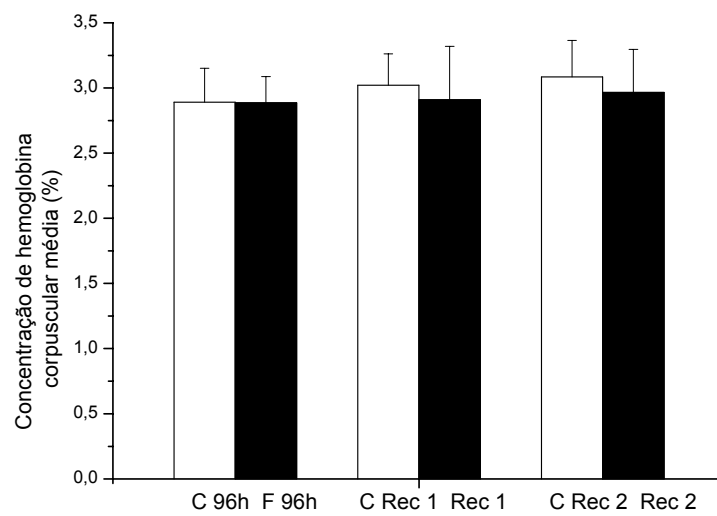


FIGURA 30 - Concentração de Hemoglobina corpuscular médio (%) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.2 Antioxidantes não enzimáticos

5.3.2.1 Ácido ascórbico

A concentração de ácido ascórbico no fígado de matrinxã exposto ao fenol apresentou redução de 32% em relação ao controle. Os matrinxãs que permaneceram em recuperação da exposição ao fenol por 1 e 2 semanas não apresentaram diferenças significativas entre seus respectivos controles. As médias e os desvios padrão do ácido ascórbico hepático estão na FIGURA 31.

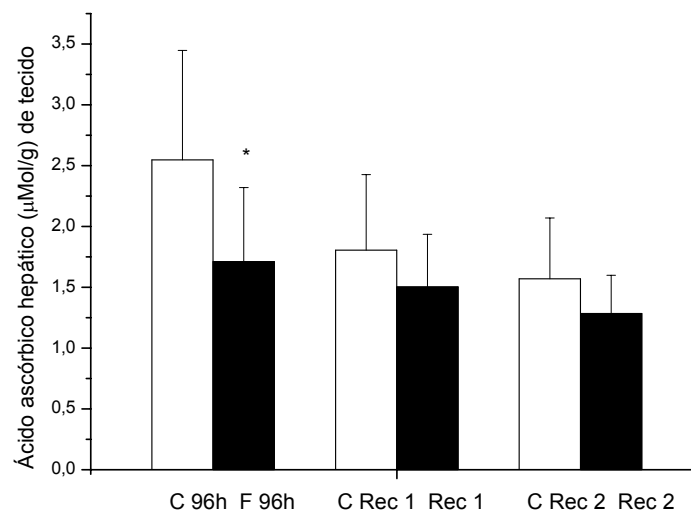


FIGURA 31 - Ácido ascórbico hepático ($\mu\text{Mol/g}$ de tecido) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

A concentração de ácido ascórbico cerebral dos matrinxãs expostos ao fenol não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Porém, após a primeira e a segunda semana de recuperação da exposição, os valores de ácido

ascórbico apresentaram um aumento significativo de 30% e de 42%, respectivamente, em relação aos seus controles. As médias e os desvios padrão estão na FIGURA 32.

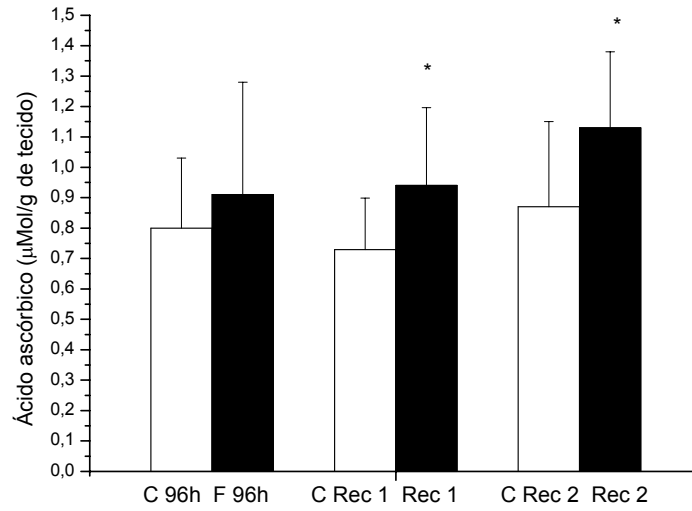


FIGURA 32 - Ácido ascórbico cerebral ($\mu\text{Mol/g}$ de tecido) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.2.2 Glutaciona reduzida

Os valores sanguíneos de glutaciona reduzida não apresentaram diferença em relação ao controle, tanto após a exposição ao fenol quanto na recuperação. As médias e os desvios padrão estão na FIGURA 33.

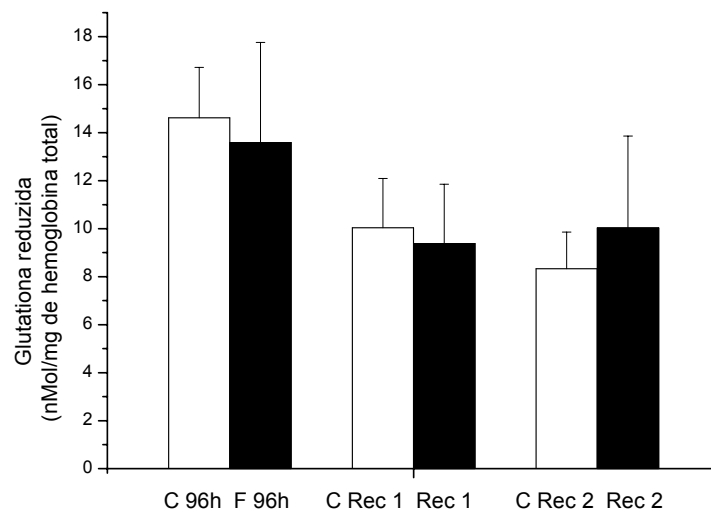


FIGURA 33 – Glutaciona reduzida no sangue (nMol/mg de hemoglobina total) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.3 Antioxidantes enzimáticos eritrocitários

5.3.3.1 Superóxido dismutase total

A atividade específica da SOD eritrocitária não variou durante a exposição ao fenol e a recuperação. As médias e os desvios padrão estão na FIGURA 34.

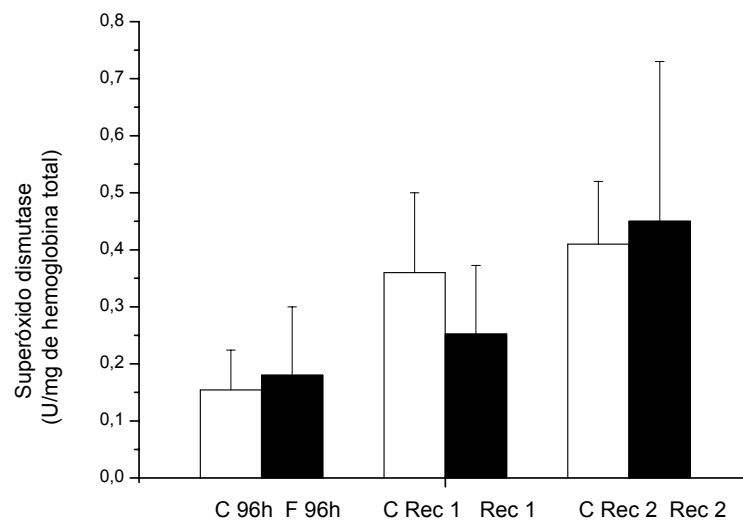


FIGURA 34 - Superóxido dismutase eritrocitária (U/mg de hemoglobina total) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.3.2 Catalase

A atividade específica da CAT eritrocitária apresentou uma redução significativa de 40% nos matrinxãs expostos ao fenol. Os animais da primeira semana de recuperação não apresentaram variação significativa em relação ao seu controle. Todavia, os matrinxãs submetidos à recuperação por duas semanas apresentaram uma redução significativa de 64%. As médias e os desvios padrão da atividade específica estão na FIGURA 35.

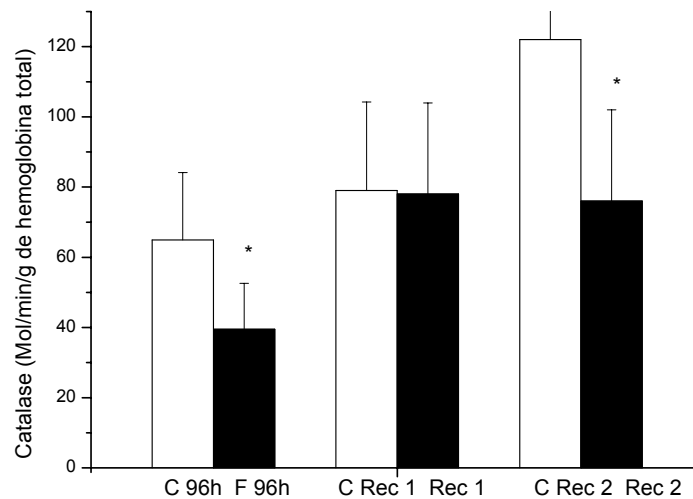


FIGURA 35 - Catalase eritrocitária (mol/min/g de hemoglobina total) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O * indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.3.3 Glutaciona Peroxidase

A atividade específica da GPx eritrocitária não variou significativamente quer nos matrinxãs expostos ao fenol quer nos de recuperação. As médias e os desvios padrão da atividade específica da GPx estão na FIGURA 36.

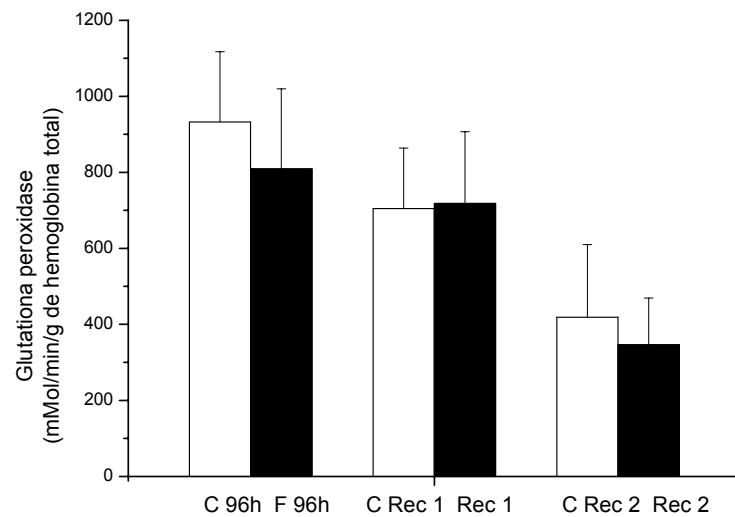


FIGURA 36 - Glutaciona peroxidase eritrocitária (mmol/min/g de hemoglobina total) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.3.4 Glicose 6 Fosfato desidrogenase

A atividade específica da G6PDH eritrocitária aumentou significativamente em 69% durante a exposição ao fenol. Porém, os grupos submetidos a uma e duas semanas de recuperação não variaram. As médias e os desvios padrões da atividade específica estão na FIGURA 37.

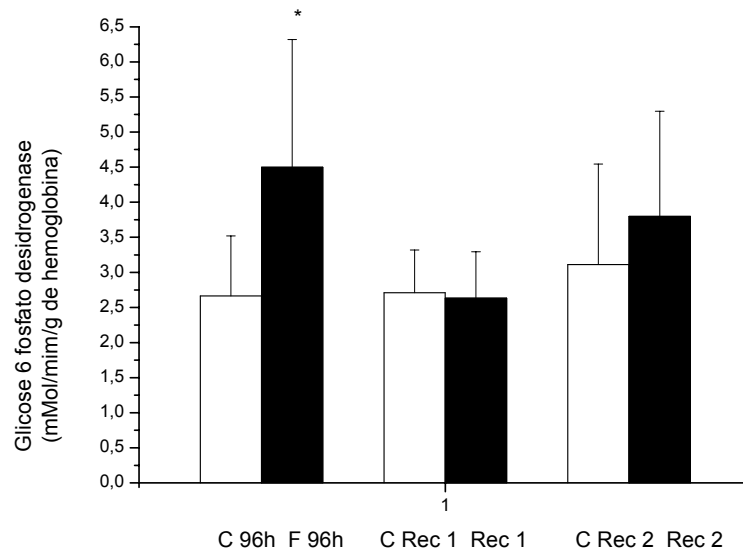


FIGURA 37 - Glicose 6 fosfato desidrogenase eritrocitária (mmol/min/g de hemoglobina total) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.4 Antioxidantes Enzimáticos hepáticos

5.3.4.1 Superóxido dismutase total

Os valores da atividade específica da SOD total hepática não variaram entre os tratamentos e seus respectivos controles. As médias e os desvios padrão da atividade específica estão na FIGURA 38.

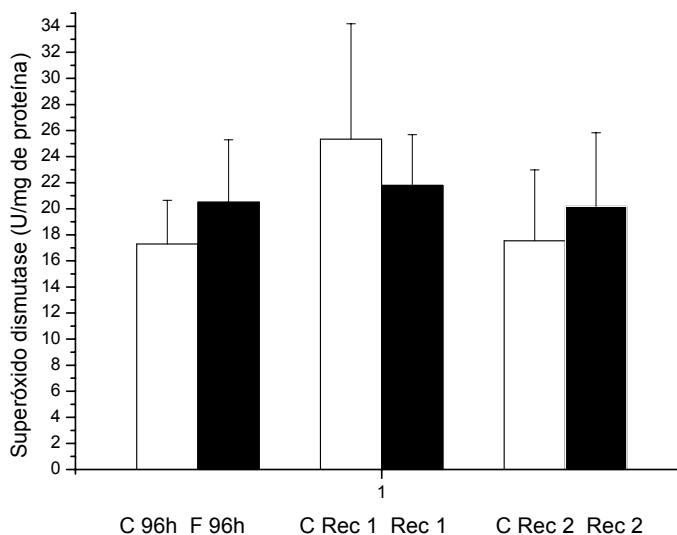


FIGURA 38-Superóxido dismutase hepática (U/mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.4.2 Catalase

A atividade específica da CAT hepática não variou nos matrinxãs quer expostos ao fenol ou nas recuperações. As médias e os desvios padrão da atividade específica da CAT estão na FIGURA 39.

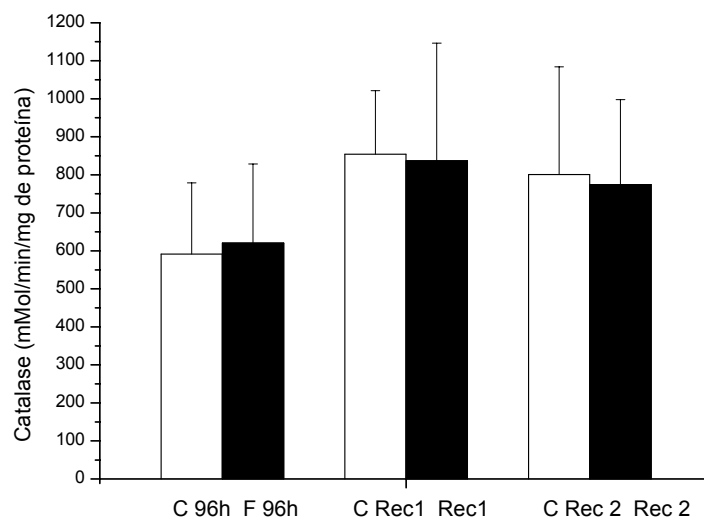


FIGURA 39 - Catalase hepática (mMol/min/mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2).

5.3.4.3 Glutationa Peroxidase

A atividade específica da GPx hepática não variou significativamente entre os matrinxãs expostos ao fenol por 96 horas. Porém, aumentou significativamente em 90% após a primeira semana de recuperação. Após a segunda semana de recuperação, a atividade da GPx diminuiu significativamente em 30% em relação ao seu controle. As médias e os desvios padrão da atividade específica de Gpx estão na FIGURA 40.

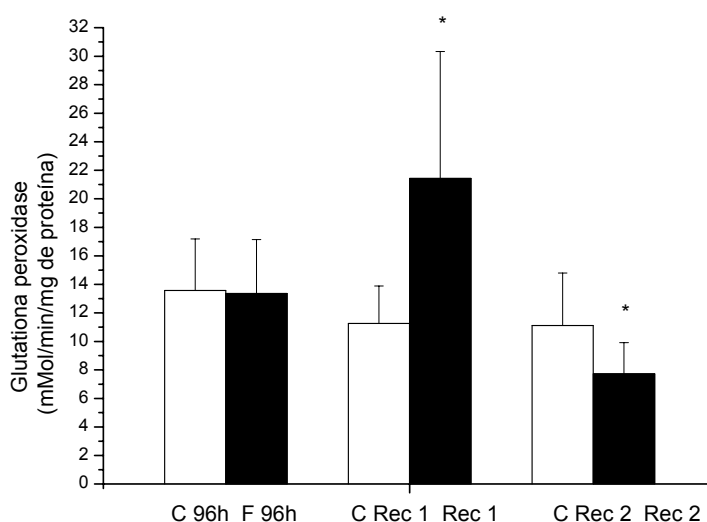


FIGURA 40 - Glutationa peroxidase hepática (mMol/min/mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.4.4 Glicose 6 fosfato desidrogenase

A atividade específica da G6PDH hepática apresentou uma redução significativa de 34% apenas nos matrinxãs em recuperação por duas semanas. As médias e os desvios padrão da atividade específica da G6PDH estão na FIGURA 41.

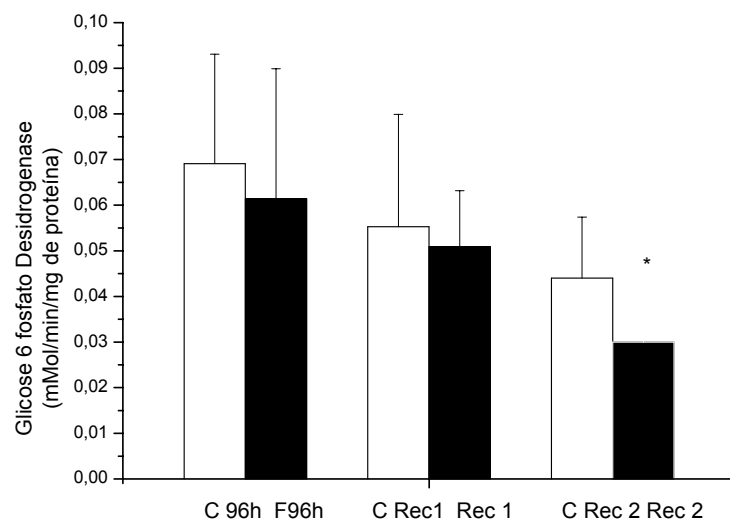


FIGURA 41- Glicose 6 fosfato desidrogenase hepática (mMol/min/mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.5 Acetilcolinesterase

A atividade específica da acetilcolinesterase cerebral de matrinxã exposto ao fenol apresentou uma redução significativa de 27% em relação ao seu controle. A redução, apesar de menor (16%), também foi significativa ao final da primeira semana de recuperação. Entretanto, ao final da segunda semana de recuperação, os matrinxãs apresentaram um aumento de 69% da atividade da AChE em relação ao seu controle. As médias e os desvios padrão da atividade específica da AChE cerebral estão na FIGURA 42.

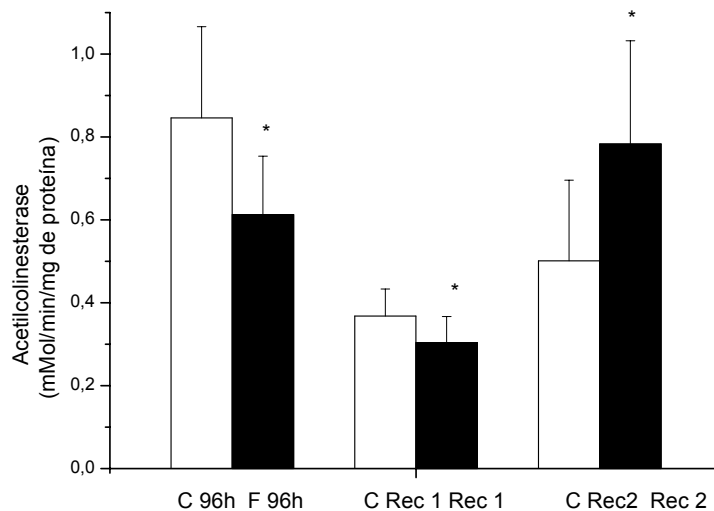


FIGURA 42 - Acetilconesterase cerebral (mMol/ min/ mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.6 Glutathiona - S - transferase

A atividade específica da GST plasmática não variou entre o grupo exposto ao fenol e o seu controle. Todavia, aumentou significativamente (35%) nos matrinxãs em recuperação de 1 semana. Um aumento significativo de 66% foi verificado entre os matrinxãs ao final da segunda semana de recuperação. As médias e os desvios padrão das atividades específicas de GST plasmática estão na FIGURA 43.

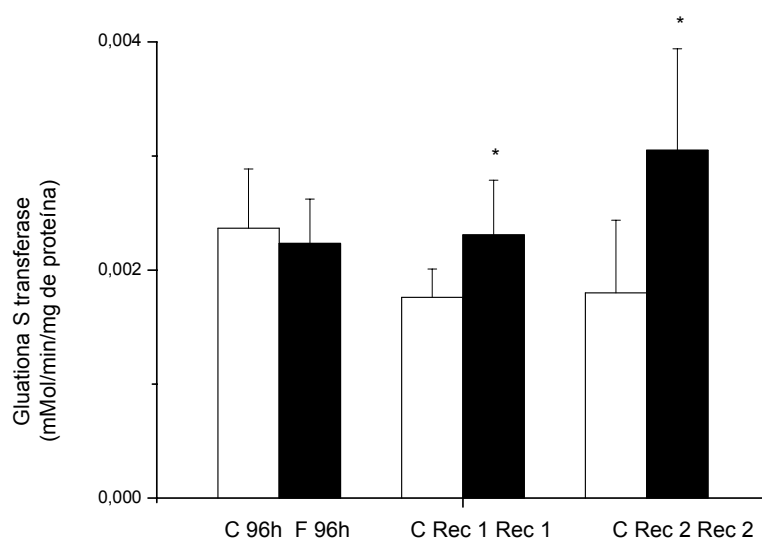


FIGURA 43 - Glutathiona S-transferase plasmática (mMol/min/mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.7 Biotransformação Hepática

5.3.7.1 Glutathiona - S-transferase

A atividade da enzima GST hepática nos matrinxãs expostos ao fenol por 96 horas apresentou uma redução significativa de 46% em relação ao seu controle. Contudo, ao final da primeira semana de recuperação, essa atividade apresentou um aumento de 30%, e o mesmo comportamento foi observado no final da segunda semana de recuperação, quando se observou um aumento de 65%. As médias e os desvios padrão das atividades específicas de GST hepáticas estão na FIGURA 44. A GST hepática e a GST plasmática analisadas pelo teste de correlação de Spermán mostraram uma correlação de 84,07%.

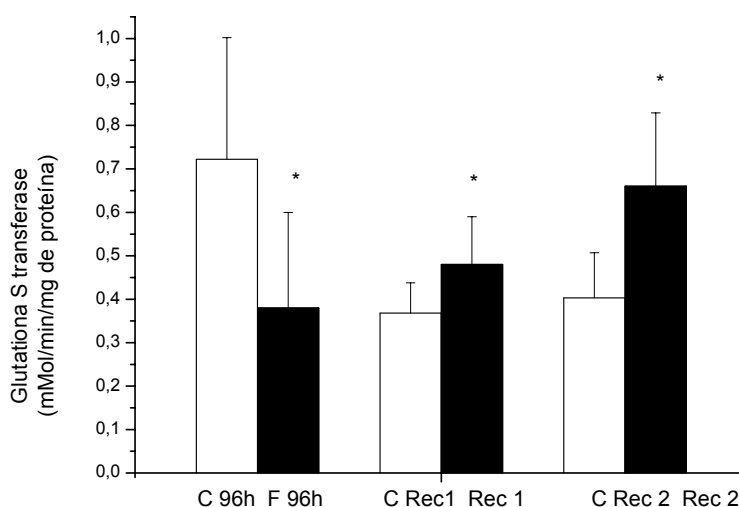


FIGURA 44 - Glutathiona S-transferase (mMol/min/mg de proteína) de fígado de matrinxã *Brycon amazonicus* exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.7.2 Efeito “in vitro” do fenol na atividade da GST hepática

Não se observou inibição “in vitro” da GST hepática pelo fenol e se constatou aumento da atividade em 84% na presença de 0,2 mg/L de fenol. Os valores da atividade da enzima estão na FIGURA 45.

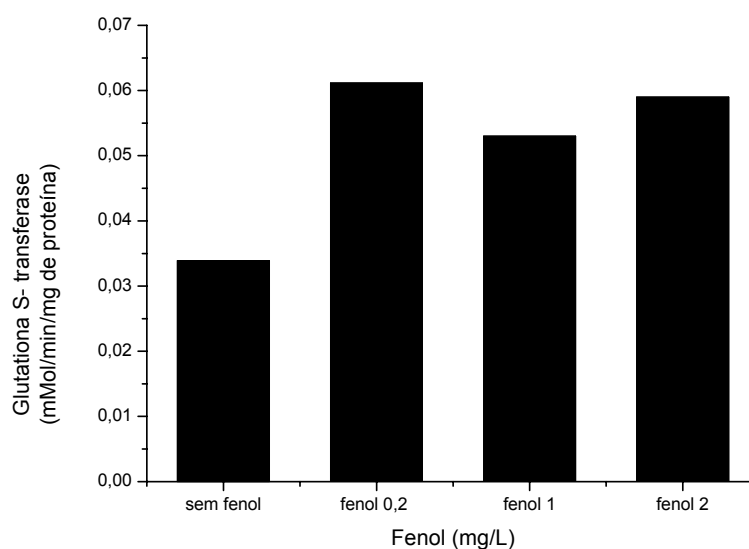


FIGURA 45 - Efeito “in vitro” do fenol sobre a atividade de GST hepática de matrinxã (mMol/min/mg de proteína) exposto ao fenol “in vitro” nas concentrações de 0, 2, 1 e 2 mg/L.

5.3.7.3 Uridina difosfato glucuronosil transferase

Os matrinxãs expostos ao fenol por 96 horas apresentaram uma redução significativa de 34% da atividade de UDPGT em relação ao controle. Entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo de recuperação de 1 semana e seu respectivo controle. A atividade específica da UDPGT dos matrinxãs no final da segunda semana de recuperação apresentou um aumento significativo de 75% em relação ao seu controle. As médias e os desvios padrão das atividades específicas de UDPGT hepática estão na FIGURA 46.

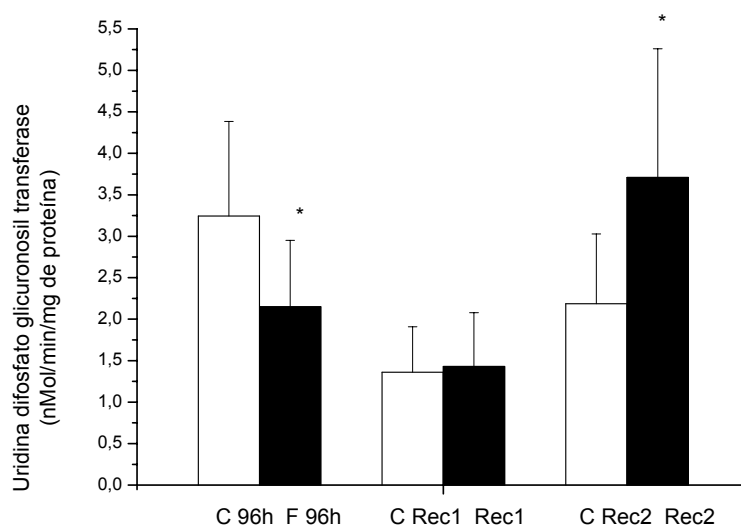


FIGURA 46 - Uridina Difosfato glicuronosil transferase (nMol/min/mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.7.4 Efeito “in vitro” do fenol na atividade da UDPGT hepática de matrinxã

A atividade desta enzima ensaiada na presença de 2 mg/L de fenol “in vitro” mostrou uma inibição de 42% na atividade, 40% na concentração de 1 mg/L e 30% na concentração de 0,2 mg/L. Os valores da atividade desta enzima estão na FIGURA 47.

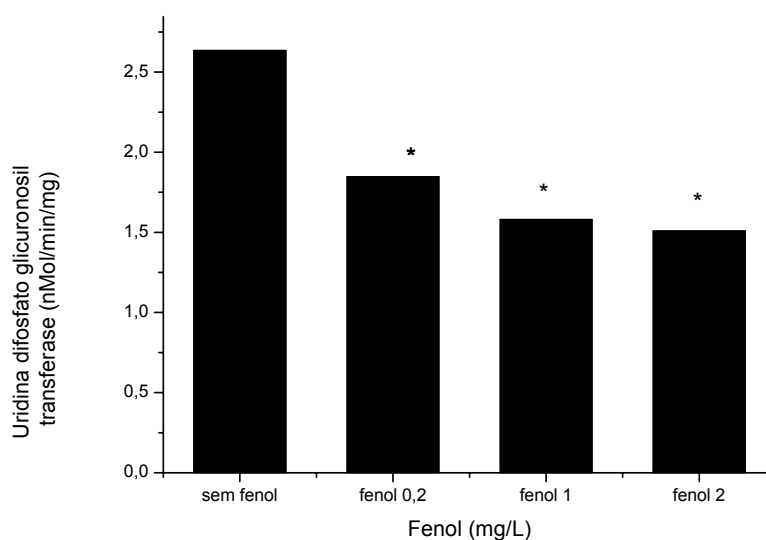


FIGURA 47 - Efeito “in vitro” do fenol na atividade da UDPGT hepática de matrinxã (nMol/min/mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol “in vitro” nas concentrações de 0, 2, 1 e 2 mg/L. O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao tubo sem fenol.

5.3.7.5 Sistemas de monooxigenases hepáticas

5.3.7.5.1 7- Etoxicumarina desetilase - ECOD

A atividade da ECOD não apresentou diferença significativa durante a exposição ao fenol em relação ao seu controle. Todavia, apresentou um aumento de 48% em relação ao seu controle durante primeira semana de recuperação. No final da segunda semana de recuperação essa atividade aumentou 49% em relação ao seu controle. As médias e os desvios padrão das atividades específicas de ECOD hepática estão na FIGURA 48.

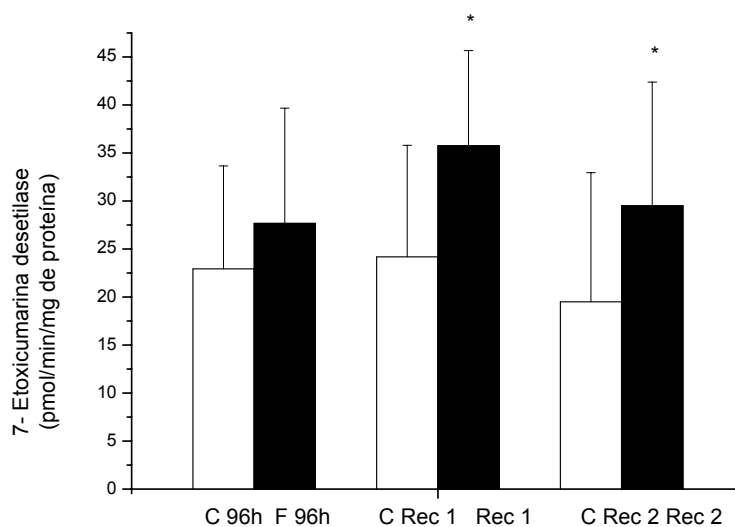


FIGURA 48 - 7 - Etoxicumarina desetilase hepática (pMol/min/mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.7.5.1 7-Etoxiresorufina desetilase- EROD

A atividade da EROD não variou significativamente nos experimentos de exposição ao fenol e durante a primeira semana de recuperação em relação aos seus grupos controles. No final da segunda semana de recuperação, a atividade da EROD apresentou aumento significativo de 72% em relação ao seu controle. As médias e os desvios padrão das atividades específicas de EROD hepática estão na FIGURA 49.

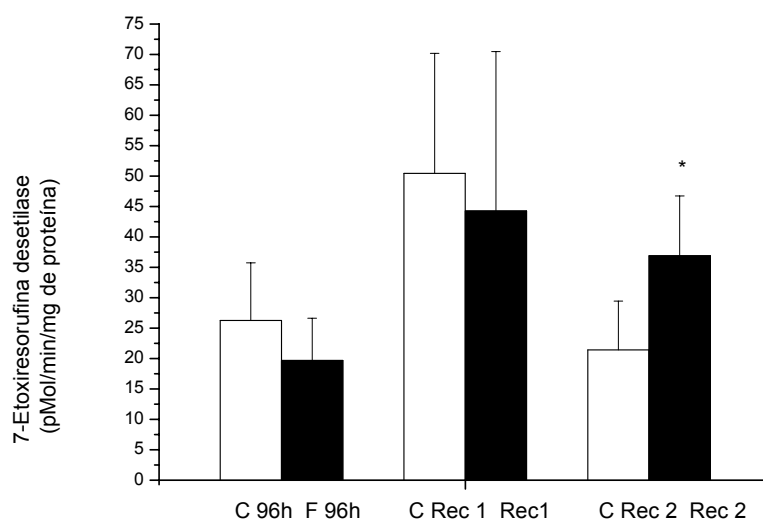


FIGURA 49 - 7- Etoxiresorufina desetilase hepática (pMol/min/mg de proteína) de *Brycon amazonicus* matrinxã exposto ao fenol (F 96h) e após a recuperação de 1 e de 2 semanas (Rec 1 e Rec 2). O (*) indica a existência de diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

6 DISCUSSÃO

6.1 Teste de toxicidade de fenol CL₅₀/96h

O matrinxã foi escolhido para este estudo por ser uma espécie de importância crescente, principalmente para a aqüicultura nacional (BRASIL, 2007). Para o desenvolvimento do nosso trabalho foi necessário saber qual a CL₅₀ do fenol para matrinxã e, assim, poder escolher uma concentração capaz de causar efeitos tóxicos, sem risco de morte para os animais, tornando possível estudar as adaptações bioquímicas e alterações morfológicas através dos biomarcadores utilizados. O teste de toxicidade aguda (CL₅₀/96h) para o fenol revelou um valor de 17,41 mg/L. A concentração utilizada, 2 mg/L aproximadamente 10 % do valor da CL₅₀, foi escolhida por não ser letal durante o teste e, todavia, causar efeitos metabólicos no matrinxã (HORI et al., 2006).

Estudos para definir a CL₅₀ de algumas espécies de peixes mostraram que as CL₅₀ para o fenol variam de 5 a 48 mg/L (GUPTA et al., 1982; KIBRET et al., 2000). Segundo GUPTA e colaboradores (1984), a CL₅₀/96h para *N. notopterus* é de 12,53 mg/L. Para *L. reticulatus* é de 47,50 mg/L (GUPTA et al., 1982). Em tilápia, *O. mossambicus*, esse valor é de 35 mg/L (SANNADURGAPPA et al., 2007). Em espécies neotropicais, estas determinações são escassas. Em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, a CL₅₀/96h é de 33,52 mg/L (SALGADO, 2007 comunicação pessoal), que, comparado ao matrinxã, é muito menos sensível. O matrinxã é ainda mais sensível ao fenol que a *Daphnia pulex* (CL₅₀/96h é 25 mg/L) (TISLER & KOCAN, 1997), um crustáceo amplamente utilizado em testes de toxicidade para avaliar a qualidade de água, principalmente pela CETESB no Estado de São Paulo. Estes dados mostram que a faixa de toxicidade do fenol é muito variável de espécie para espécie e que a determinação desta concentração é muito importante como um primeiro passo para estudos toxicológicos com fenol. A resolução Conama 357 (BRASIL, 2005b) determina que a concentração máxima de fenóis permitida para águas da classe I, destinadas à conservação da vida aquática, é de 0,003 mg/L. Todas as CL₅₀ encontradas estão acima do máximo permitido pela legislação brasileira, mesmo

após este valor ter sido aumentado três vezes (BRASIL, 1986). Segundo a classificação da VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION (1996) a concentração encontrada para o CL₅₀ para o fenol apresenta uma toxicidade leve para o *B. amazonicus*. Porém, tais fatos podem levar a uma interpretação enganosa com relação aos danos causados pelo fenol, pois como depreendemos de nossos resultados e foi relatado por HORI e colaboradores (2006), o fenol provoca sérias alterações fisiológicas e metabólicas em matrinxã, ainda que nas quantidades em que a contaminação da águas não cause mortalidade.

Do ponto de vista da piscicultura, os danos do fenol podem ter ainda maior relevância, pois a mortalidade não é o único problema na criação de peixes. O matrinxã é considerado uma espécie com grande potencial para aqüicultura (ZANIBONI-FILHO et al, 2006) e é possível que melhoria de seu cultivo possa deixá-lo tão competitivo no mercado quanto a tilápia. Observamos que a intoxicação com fenol causou uma série de distúrbios no metabolismo de drogas, alterações histológicas em alguns tecidos e estresse oxidativo, além do aumento do catabolismo de proteínas e carboidratos relatado por HORI e colaboradores (2006). Essas alterações evidenciam o risco de diminuição da viabilidade desta espécie em cultivo sob a contaminação de fenol.

Os parâmetros de qualidade de água não apresentaram nenhuma alteração ou variação significativa durante o experimento, mostrando que pelo menos na concentração de 2 mg/L o fenol não induziu mudanças nas propriedades físico-químicas da água, como dureza, alcalinidade, pH, ou seja, entre os parâmetros avaliados.

6.2 Experimento de exposição ao fenol por 96 horas - avaliação histopatológica.

Os tecidos de matrinxã avaliados após exposição ao fenol mostraram que as maiores alterações foram encontradas nas brânquias. Estas alterações histológicas traduziram mudanças do funcionamento das brânquias. Elas apresentaram-se mais irrigadas nos animais submetidos ao fenol. Na lamela secundária observou-se fusão apical e, em vários pontos, fusão total. Além disso, houve também congestão

sanguínea e pequenos edemas subepiteliais. Em alguns casos, foi possível verificar necrose com núcleos de tamanho reduzido, hiperconcentrados e mortos (picnose). Em alguns pontos foi verificada a formação de aneurisma na lamela primária.

A fusão apical é uma forma de a lamela secundária diminuir o contato com o xenobiótico e reduzir assim a entrada de fenol pelo sistema branquial. Entretanto, a fusão apical pode levar à fusão total, provavelmente por um processo de hiperplasia ou pelo aumento do muco entre as células. Com a fusão total a função da brânquia ficaria comprometida nesta região, podendo levar o peixe à hipóxia, anóxia, e conseqüentemente à morte (CARNEIRO et al, 2006). Este dano foi observado em várias amostras analisadas, mostrando a extensão de danos causados pelo fenol na estrutura e conseqüentemente na função branquial. A fusão da lamela secundária foi observada em truta arco-íris exposta a 6,9 mg/L de fenol por 2 horas (MITROVIC et al. 1968), em *C. gobio* exposto à 6 mg/L por 35 dias (BUCKER & HOFER, 1993), em “winter flounder”, *Pleuronectes americanus*, exposto a efluentes de fábricas de papel (KHAN et al., 1994), em truta marrom, *Salmo trutta*, exposta à água contaminada com DDT, pesticidas, clorobenzenos, PCB e PAH (TRIEBSKORN et al., 2002), em *Solea senegalensis* exposta ao sedimento do estuário de Guadalquivir (Espanha) (RIBA et al., 2004) e em salmão, *S. salar*, contaminado por amebas (BERMINGHAM & MULCAHY, 2004).

As alterações das brânquias fundamentam a elevação do hematócrito observada. Esse aumento deve ter sido compensatório em face de a brânquia ter ficado fragilizada pelo fenol. A hiperemia verificada, que é um aumento do fluxo sanguíneo em um determinado órgão, ocorreu provavelmente para aumentar a oxigenação sanguínea devido à perda de função em algumas partes da brânquia. HORI (2005) também verificou em matrinxã, nas mesmas condições deste experimento, uma redução de cloreto plasmático, que resultou provavelmente de alterações branquiais.

Os edemas subepiteliais encontrados nas brânquias de matrinxã levaram a uma diminuição na difusão respiratória ou das trocas gasosas (MACHADO, 1999), o que também justificaria os valores aumentados de hematócrito. O edema branquial foi relatado em bagre, *Ariopsis assimilis* exposto ao PCB (NOREÑA-BARROSO, 2004).

Além de edema, o aneurisma de brânquias foi descrito em “roach” (*R. rutilus*) e “big-head gobies” (*Benthophilus macrocephalus*) do mar Cáspio, que está poluído com vários tipos de resíduos industriais e domésticos (MOORE et al., 2003).

O matrinxã exposto ao metilparation apresentou maior sensibilidade nas brânquias que no fígado quando avaliado através de biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo (MONTEIRO et al., 2006). Por avaliação histopatológica foi também possível perceber nos matrinxãs maior sensibilidade nas brânquias do que em outros tecidos. Todavia, o fígado de matrinxã apresentou também algumas alterações quando exposto ao fenol, tais como aumento no diâmetro e estase sanguínea nos capilares sinusóides com possível estase biliar.

O aumento do diâmetro dos capilares sinusóides e a hiperemia indicam um aumento no fluxo sanguíneo hepático, o que sugere uma estratégia de eliminação dos resíduos produzidos pelo fígado para posterior excreção renal ou branquial. Em *Parophrys vetulus* exposto a CCl₄ (tetracloreto de carbono) observa-se aumento dos capilares sinusóides com congestão sanguínea (CASILLAS et al., 1983). Em bagres, *Ariopsis assimilis*, da baía de Chetumal, México, expostos a organoclorados e hidrocarbonetos, também se observou hiperemia (NOREÑA-BARROSO et al., 2004). Fígado de truta arco-íris exposta ao fenol por duas a oito horas apresenta um aumento do diâmetro dos capilares (MITROVIC et al., 1968). Todavia, *C. gobio* exposto por 35 dias a 6 mg/L apresenta degeneração vacuolar do tecido hepático (BUCKER & HOFER, 1993), o que não foi observado em matrinxã.

Assim, a exposição do matrinxã ao fenol provocou poucas alterações hepáticas, até mesmo quando comparadas com alterações hepáticas causadas por outros tóxicos. Nestes foram verificadas necrose, formação de tumores e de vacúolos (KHAN et al., 1994; BERNET et al., 1999; MOORE et al., 2003; NOREÑA-BARROSO et al., 2004). Não observamos lesão hepática durante a exposição ao fenol por 96 horas, corroborando os achados de HORI e colaboradores (2006) que não relatam aumento de ALAT (alanina-aminotransferase) plasmática sugerindo que o fenol não causou lesões hepáticas em matrinxã nestas condições. Entretanto, o matrinxã apresentou estase biliar, que pode ter sido causada por diversos fatores, desde parasitas até o xenobiótico. Admite-se, entretanto, que tenha sido devido à alteração

da permeabilidade dos hepatócitos, permitindo a passagem de bile para o parênquima hepático que resultou na retenção da bile (MELO et al., 1999). Como os sais biliares aumentam a permeabilidade à membrana celular, este processo pode causar danos hepáticos. Os antioxidantes podem atenuar este processo (MEDEIROS et al., 2005). Alguns estudos têm mostrado a participação de espécies reativas de oxigênio na fisiopatologia da cirrose causada por estase biliar em humanos (MILTERSTEINER et al., 2003) e os dados sobre o estresse oxidante avaliados neste trabalho, indicam que ele não ocorreu durante a exposição ao fenol, mas principalmente durante a recuperação, como será discutido mais adiante. Entretanto, a estase biliar raramente é observada em peixes (WOLF & WOLFE, 2005). Em *Proteocephalm ambloplitis* infectado com parasitas foi relatada estase biliar (JOY & MADAN, 1989). Em *Danio rerio* exposto ao PBC, (OLSSON et al, 1999), ao Paraquat (FYTIZAS, 1980), e ao Endrin (SASTRY & SHARMA, 1978). Estes relatos substanciam os dados de estresse oxidativo e do metabolismo de drogas discutidos adiante.

O glicogênio observado nas colorações com PAS diminuiu. Esse fato pode estar relacionado ao catabolismo de carboidratos observado por HORI e colaboradores (2006) em matrinxã nas mesmas condições. Estes autores relatam redução dos valores de glicogênio em 30% ao mesmo tempo em que ocorre aumento do catabolismo protéico. O glicogênio teria sido hidrolisado como fonte de energia em uma situação de maior necessidade de energia causada pela intoxicação. Os carboidratos são a primeira fonte energética utilizada para lidar com situações adversas como essa (DANGÉ, 1986). Doses letais de vários poluentes, inclusive fenol, causam reduções nas reservas de glicogênio hepático de *O. mossambicus* (DANGÉ, 1986). A exposição ao PCB resulta em redução do glicogênio muscular em *A. anguilla* (HOLMBERG et al., 1972), e músculo de *C. punctatus* exposto ao fenol (REDDY et al., 1993). Em *Micropterus dolomieu* exposto à água contaminada por PCB observa-se uma queda do glicogênio hepático (ANDERSON et al., 2003). BEGUM e VIJAYARAGHAVAN (1995) admitem que a síntese das enzimas de desintoxicação possa levar a depleção das reservas de glicogênio hepático. Porém, como verificamos, não há aumento na atividade das enzimas envolvidas com a desintoxicação hepática após a exposição ao fenol.

O rim de matrinxã apresentou menos alterações histológicas que os outros órgãos estudados. Observou-se a formação de um espaço entre o glomérulo e a cápsula renal devido à hipertrofia das arteríolas aferentes e eferentes. Bifenis policlorados (PCB), também causaram aumento desse espaço e hipertrofia das arteríolas glomerulares aferentes e eferentes em brema (*Abramis brama*) e áspio (*Aspius aspius*) indicando aumento da excreção (KOPONEN et al., 2001). O fenol também causou inflamação em algumas áreas renais de truta arco-íris, aumentou o espaço entre o glomérulo e a cápsula renal e entre os capilares (MITROVIC et al., 1968). O 4-nonilfenol causou dilatação glomerular, degeneração, fibrose e alargamento dos túbulos com necrose no rim de paulistinha *D. renio* (WEBER et al., 2003).

Os dados histológicos encontrados indicam que o fenol causou mais danos às brânquias que ao fígado e ao rim. Isso se deve principalmente ao fato de as brânquias estarem em contato direto com o ambiente. Por isso mesmo são muito utilizadas para avaliar os efeitos tóxicos de muitos produtos em ambientes aquáticos (BERNET et al., 2000). Entretanto, outros órgãos são igualmente importantes na avaliação da distribuição e metabolização dos xenobióticos.

6.3 Exposição ao fenol por 96 horas e recuperação

6.3.1 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos avaliados mostraram alteração somente do hematócrito. Isto ocorreu durante a exposição ao fenol e após a primeira semana de recuperação. Ao final da segunda semana de recuperação o hematócrito diminuiu em relação ao controle. O fenol administrado via intra-abdominal também aumentou o hematócrito e o teor de hemoglobina total em *D. labrax* (ROCHE & BOGE, 2000). O mesmo foi verificado em humanos expostos a diferentes concentrações de fenol e catecol (BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004). O aumento de hematócrito foi observado em matrinxã nas mesmas condições deste trabalho, porém com diminuição do número de eritrócitos (HORI, 2005). Estes autores também verificaram

um pequeno aumento de metahemoglobina, com hemólise parcial, o que levaria a hemoglobina a um estado não funcional. Porém, esta condição não foi verificada em nossos experimentos (dados não apresentados). O fenol elevou também os níveis de hematócrito de truta arco-íris (*O. mykiss*), com concomitante aumento de cortisol plasmático e glicose (SWIFT, 1981; SWIFT, 1982). Entretanto, os níveis de glicose plasmática em matrinxã decresceram (HORI, 2005), assim como o cortisol plasmático.

O aumento do hematócrito observado estaria relacionado principalmente ao aumento da utilização de oxigênio para gerar energia provavelmente a partir do catabolismo carboidratos, principalmente de glicogênio hepático, após a exposição ao fenol, e também como resultado das alterações branquiais ocorridas, principalmente a fusão apical e total da lamela secundária, como resposta para melhorar a captação de oxigênio. Após recuperação houve a recuperação do fenol.

6.3.2 Sistema de defesa antioxidante

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e de pro-oxidantes, com predomínio destes últimos. Assim, o enfraquecimento dos sistemas de defesa antioxidantes ou o aumento de espécies oxidantes sem aumento das defesas pode resultar em lesões oxidativas sobre macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (SIES, 1991; ABDALLA, 1993; VALAVANIDIS et al, 2006). Estas alterações, quando na estrutura das proteínas, causam sua oxidação, principalmente dos grupos amina e tiol, levando à sua inativação. A oxidação do DNA pode alterar também a expressão dos genes (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003). As ERO também podem resultar na peroxidação de lipídios, gerando danos irreparáveis à célula e podendo levá-la à morte ou à diminuição da sua sobrevivência e levando o próprio organismo à morte (KOTKAT et al., 1999; VALAVADINIS et al, 2006).

Em peixes, particularmente com as espécies neotropicais, existem poucos estudos sobre o metabolismo antioxidante, entretanto, o ambiente aquático recebe diariamente muitos poluentes, como o fenol, com potencial para causar estresse

oxidativo (VALAVANIDIS et al, 2006). Este dano pode ser considerável em especial por serem os organismos aquáticos, pois estes são mais sensíveis ao fenol que os organismos terrestres (TISLER & ZAGORC-KONCAN, 1997).

A avaliação do sistema de defesa antioxidante mostrou que o matrinxã respondeu à presença de fenol na água, e que o fígado e os eritrócitos apresentaram alterações após a exposição e a recuperação. A atividade da superóxido dismutase, que transforma o superóxido em peróxido de hidrogênio (SIES, 1991), seria esperada alterar. Em estresse oxidativo de piapara (*L. elongatus*) submetido à hipóxia (WILHELM-FILHO et al., 2005) e em eritrócitos de tilápia, *O. niloticus*, submetidas à água poluída da Represa Billings (BAINY et al., 1996) observou-se aumento desta atividade enzimática. Nos eritrócitos de matrinxã, a atividade da SOD total não foi alterada durante a exposição e a recuperação. Todavia, isto também foi observado em *D. labrax* exposto ao fenol e derivados de fenóis “in vitro” (BOGÉ & ROCHE, 1996) ou quando submetido a injeções intra-abdominais (ROCHE & BOGÉ, 1996; ROCHE & BOGÉ, 2000). Entretanto, a atividade da fração Mn SOD apresentou uma redução. Sabe-se que a SOD é uma enzima com múltiplas formas. Em peixes, sua atividade no citoplasma é dada pela forma Zn-Cu SOD e na mitocôndria pela forma Mn SOD (McINTYRE et al., 1999; ZELKO et al, 2002). Em hemácias humanas submetidas ao fenol “in vitro” também não se observam alterações na atividade da SOD (BUKOWASHA & KWASHA, 2004). Sendo assim, ao considerarmos a atividade total da SOD, podemos dizer que o fenol não causou estresse oxidativo nos eritrócitos de matrinxã.

Após a exposição ao fenol, somente a glicose 6-P desidrogenase de eritrócitos apresentou a atividade aumentada. Esta enzima é responsável pela transformação da glicose 6-P em gluconato 6-P, utilizando NADP como coenzima e formando NADPH. O NADPH é o doador de hidrogênio para a regeneração da forma reduzida da glutathiona. Esta enzima é importante para a formação de NADPH extramitocondrial responsável pela integridade dos eritrócitos (SALTMAN, 1989). A glicose 6 fosfato desidrogenase aumentada suplementa as células com NADPH para a enzima glutathiona redutase (REGOLI et al., 2002) que reduz a glutathiona (GSSG) à glutathiona reduzida (GSH), utilizando o NADPH como doador de elétrons. O aumento da

G6PDH levou a manutenção da integridade dos eritrócitos. A GSH doa elétrons durante a reação catalisada pela glutathiona peroxidase, que transforma os peróxidos em geral em compostos reduzidos. A glutathiona reduzida realiza uma variedade de importantes funções metabólicas e fisiológicas, incluindo a desintoxicação de ERO, além de se conjugar com produtos, muitas vezes xenobióticos. A conjugação serve para regular a reatividade dos xenobióticos, facilitar seu transporte através da membrana da célula e eliminá-los, além de funcionar como um mediador biológico essencial (WANG & BALLATORI, 1998).

O nível de GSH no meio celular deve acompanhar a atividade de GPX, como mostraram os dados com o matrinxã. Neste trabalho, as concentrações de GSH e a GPX não apresentaram alterações. Entretanto os níveis de GSH diminuíram em hemácias humanas expostas a altas concentrações de fenol (>250 mg/L) (BUKOWASHA & KWASHA, 2004). Em tilápia, *O. niloticus*, exposta à água poluída da represa Billings a atividade da GPX e da G6PDH de eritrócitos aumentou enquanto a GSH eritrocitária diminuiu (BAINY et al., 1996). Em *D. labrax* a atividade da GPX eritrocitária aumentou sob injeções de fenol intra-abdominais (ROCHE & BOGÉ, 1996; ROCHE & BOGÉ, 2000). Entretanto a atividade da G6PDH de hemácias humanas expostas ao fenol "in vitro" não apresentou alterações, mostrando que o efeito do fenol na atividade destas enzimas deve depender muito da dose e da forma de exposição.

Com relação ao sistema de defesa antioxidante não enzimático, que envolve a GSH e vitaminas, entre outros compostos, sabe-se que a vitamina E não é detectada nos eritrócitos de matrinxã, mas sim uma alta concentração de GSH (WILHELM-FILHO, 1996). No presente estudo também não conseguimos detectar ácido ascórbico no plasma de matrinxã (dados não apresentados). É, portanto, provável que a GSH tenha um importante papel na proteção do matrinxã contra o estresse oxidativo. Como os níveis de GSH não se alteraram no sangue de matrinxã, é mais um indício de que o fenol não teria provocado um estresse oxidativo em seus eritrócitos.

Além da GPX, que tem a função de remover os peróxidos, a catalase também tem a função de remover o peróxido de hidrogênio do citoplasma. Entretanto, essa atividade diminuiu nos eritrócitos de matrinxã expostos ao fenol e durante a segunda

semana de recuperação. Em *D. labrax* o fenol não causou uma diminuição da atividade de CAT, como ocorreu com outros compostos fenólicos (ROCHE & BOGÉ, 1996). A baixa atividade da CAT deve ter sido causada ou pela falta de radicais livres ou pela interação do fenol com a enzima propriamente dita. A CAT é uma hemoproteína que para exercer sua função necessita de NADPH (KIRKMAN & GAETANI, 1984), e este estava sendo gerado pela G6PHD, mas provavelmente para o consumo principalmente GR em matrinxã.

Considerando que os parâmetros utilizados são bons biomarcadores de estresse oxidativo (ROCHE & BOGÉ, 2000; VALAVADINIS et al., 2006), podemos assumir com os resultados encontrados que o fenol, na concentração em que foi testado, não causou estresse oxidativo e nem funcionou como um antioxidante nos eritrócitos de matrinxã, quer após a exposição, quer após a recuperação de uma e de duas semanas.

O fígado é uma estrutura com atividades altas de enzimas antioxidantes, principalmente SOD e CAT, além de ser o local no qual ocorrem várias reações oxidativas e alta geração de radicais livres (GÜLL et al, 2004). O fígado de matrinxã apresentou alterações após a exposição ao fenol, e também após a recuperação. Estas alterações ficaram restritas ao aumento da atividade da GPX e da G6PDH, enquanto as atividades da SOD e da CAT não apresentaram alterações. Os aumentos de GPX e de G6PDH mostraram que houve um aumento ou geração ERO nas células hepáticas de matrinxã.

A atividade da GPX aumentou em matrinxã após a primeira semana de recuperação, mas diminuiu após a segunda semana de recuperação. Não existem dados sobre esta enzima em peixes na avaliação de possíveis danos causados pelo fenol no fígado. Entretanto, existem dados com relação a outros tóxicos e alguns derivados de fenol. Por exemplo, a atividade da GPX aumentou em truta arco-íris após a exposição aos derivados de fenol como o hexaclorobenzeno (LINDSTRÖM-SEPPÄ et al., 1996) a efluentes de fábrica de papel (AHMAD et al., 2000), em *C. punctatus* exposto ao deltametrina (SAYEED et al., 2003) e em *C. auratus* durante uma exposição crônica ao 2,4 diclorofenol (ZHANG et al., 2004). Pouquíssimos são os trabalhos que relacionam o estresse oxidativo com a recuperação de peixes a tóxicos.

Normalmente, estes trabalhos mostram a recuperação durante o estresse causado pela hipóxia e a anóxia ou choque térmico. A anóxia e a reoxigenação não causaram aumento da atividade de GPX no fígado de peixe dourado *C. auratus*, (LUSHCHAK et al., 2001).

A atividade da enzima G6PDH é uma das menos estudadas na avaliação do estresse oxidativo. Tilápias expostas à água contaminada da represa Billings, local onde é relatado a presença de um grande número de xenobióticos (BAINY et al., 1996), mostram uma queda desta atividade no fígado. Entretanto, algumas espécies de carpa do lago Seyhan Dan, na Turquia, local também contaminado por diferentes tipos de poluentes, apresentam aumento na atividade de G6PDH (GÜLL et al., 2004).

As atividades enzimáticas da SOD e da CAT hepáticas em matrinxã não apresentaram alterações, porém em caso de estresse oxidativo era esperado que as atividades destas enzimas aumentassem (VALAVADINIS et al., 2006). Sabe-se que a SOD é uma enzima com múltiplas formas (McINTYRE et al., 1999; ZELKO et al., 2002) e que, em alguns casos, o estudo das frações enzimáticas pode indicar melhor os efeitos tóxicos, porém normalmente é determinada a atividade total. O aumento da atividade da CAT e da SOD foi observado no fígado de tilápia exposta à água poluída do reservatório da represa Billings (BAINY et al., 1996), em *C. punctatus* exposto ao deltametrin (SAYEED et al., 2003), em *C. auratus* durante uma exposição crônica ao 2,4 diclorofenol (ZHANG et al., 2004), e em diferentes espécies de carpas expostas à água do lago Seyhan Dan, na Turquia (GÜLL et al., 2004). Também se observou aumento no caso de redução de tensão de oxigênio em piapara, *L. elongatus*, (WILHELM-FILHO et al., 2005) e de longos períodos de ausência de alimento em "rockbream", *Oplegnathus fasciatus* (NAM et al., 2005). Entretanto não houve mudança da atividade SOD em fígado de *Mullus barbatus* submetido a diferentes tipos de água do mar Mediterrâneo (REGOLI et al., 2002). Baixas atividades de SOD foram observadas em peixes quando comparadas com o porco da índia e primatas. Este fato deve-se provavelmente à alta demanda dos peixes pelo ascorbato em condições de geração de ERO (NANDI et al., 1997). Em matrinxã observamos que a atividade da SOD no fígado exposto ao fenol por 96 horas não foi alterada em relação ao controle, mas a concentração de ácido ascórbico diminuiu. A queda do ácido

ascórbico pode ter sido causada pelo seu papel antioxidante frente ao aumento de ERO, proveniente do metabolismo de fenol pelas monooxigenases hepáticas dependentes do citocromo P450, que levaria também ao aumento da atividade de algumas enzimas antioxidante no fígado, durante a recuperação.

O ácido ascórbico é necessário aos organismos por ter a função de co-fator enzimático em reações da biossíntese do colágeno e da dopamina β hidroxilase, que converte a dopamina em adrenalina. Devido ao seu potencial redutor baixo o ascorbato reage como um antioxidante com a maior parte dos radicais oxidantes formados nos sistemas biológicos (ABDALLA, 1993). O ácido ascórbico foi determinado no fígado de matrinxã como um antioxidante não enzimático, tal como proposto por DABROWSKI (2001). A utilização do ácido ascórbico varia muito de espécie para espécie (BENITEZ & HALVER, 1982; TUCKER & HALVER, 1986). Diferentes respostas foram encontradas em *C. punctatus* exposto ao deltametrin (SAYEED et al., 2003).

A concentração de ácido ascórbico decresceu substancialmente durante a exposição ao fenol e também durante a recuperação, o que também teria sido causado pela suspensão da alimentação durante o período experimental (SCOTT & SLOMAN, 2004). Entretanto, ao mesmo tempo em que o ácido ascórbico diminuiu no fígado aumentou no cérebro, mostrando uma provável mobilização do ácido ascórbico hepático para o cérebro, como forma de proteção deste tecido. O cérebro é alvo de estresse oxidativo (HAI et al., 1997) e muitos fatores contribuem para a sua vulnerabilidade, tais como o alto índice de ácidos graxos poliinsaturados de suas membranas e os altos níveis de GPX (PÉREZ-CAMPOS et al., 1993).

A mobilização e a produção do ácido ascórbico vêm sendo observadas em algumas espécies. Alguns peixes parecem sintetizá-lo no rim posterior, como verificado em *Potamotrygon* sp (FRACALOSSO et al., 2001). O *L. paradoxa* apresenta atividade da enzima L-gulonolactona oxidase, que é o passo final para transformação da L-gulonolactona em ácido ascórbico, porém os caracídeos, família do matrinxã estudado neste trabalho, não apresentaram atividade desta enzima (FRACALOSSO et al., 2001). Em peixes, é possível o acúmulo de ácido ascórbico nos tecidos quando da transformação em L-ascorbato 2-sulfato pela enzima L-ascorbato 2 sulfato

sulfohidrolase (C_2 sulfatase). Desta forma, o ácido ascórbico pode ser utilizado na medida da sua necessidade, e também transportado para os órgãos que dele mais necessitem (BENITEZ e HALVER 1982; TUCKER e HALVER 1986; LIN e SHIAU 2005). Entretanto, algumas espécies, como a carpa comum (*C. carpio*), não são capazes de fazer esta transformação (LIN & SHIAU, 2005). Aumento do ácido ascórbico é observado no fígado, e o decréscimo nas brânquias de *C. punctatus* exposto a deltametrin (SAYEED et al., 2003). Os tecidos que apresentam as maiores concentrações de ácido ascórbico em peixes são o rim, o fígado, o cérebro e as brânquias (CARR et al., 1983).

A análise dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado do matrinxã exposto ao fenol, indica que não houve, em princípio, estresse oxidativo, porém a biotransformação do fenol pode ter produzido derivados de fenol, e também um aumento de ERO, capazes de causarem respostas somente observadas após uma ou duas semanas de recuperação. PORTER e COON (1991), GOEPTAR e colaboradores (1995) e ORELLANA e colaboradores (2004) verificaram que durante a fase I da biotransformação existe a formação de ERO, e esta formação está relacionada com a redução do Fe^{3+} para o Fe^{2+} . O aumento de ERO pode causar alterações na atividade das enzimas, nos receptores e transportadores de membrana (SALVI et al., 2001).

6.3.3 Efeitos do fenol na acetilcolinesterase cerebral

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima chave no processo de transmissão do impulso nervoso, sendo responsável pela hidrólise da acetilcolina em acetato e colina nas junções neuromusculares, nas sinapses das fibras ganglionares simpáticas e parassimpáticas, nos terminais das fibras nervosas pós ganglionares parassimpáticas e em sinapses do sistema nervoso central. Durante a transmissão normal do impulso nervoso, a acetilcolina é liberada na sinapse para excitar um receptor. Se ela não for rapidamente hidrolisada, a célula pós-sináptica será constantemente excitado, resultando em uma estimulação contínua. Esta enzima tem sido muito avaliada em estudos de intoxicação com organofosforados e carbamatos. Estes xenobióticos causam sua inibição tanto em mamíferos quanto em peixes

(CUNHA-BASTOS et al., 1999; AGUIAR, 2002; AGUIAR et al., 2004; SILVA FILHO et al., 2004; SCOTT & SLOMAN, 2004). Esta enzima tem sido estudada ainda por ser importante na preservação do comportamento de animais expostos a diferentes xenobióticos, diminuindo assim sua capacidade de fugir de predadores (SCOTT & SLOMAN, 2004). É bem conhecida a ação de organofosforados sobre a atividade da AChE. Sabe-se que a matrinxã apresenta uma drástica inibição da AChE cerebral quando exposta ao metilparation (organofosforado), e que tal inibição não é capaz de ser recuperada oito dias após a exposição (AGUIAR et al., 2004). A inibição da AChE também foi detectada por ALMEIDA e colaboradores (2005) em cérebro e músculo branco de matrinxã exposto a 2 mg/L de metilparation, e estes autores também não observaram recuperação desta enzima após oito dias de exposição.

A atividade da acetilcolinesterase do sistema nervoso central de matrinxã diminuiu na exposição e permaneceu reduzida após a primeira semana de recuperação ao fenol, entretanto, após a segunda semana, voltou aos valores próximos do inicial. Isto sugere uma inibição pela exposição ao fenol, que foi recuperável. Peixes após 48 horas de exposição ao fenol podem apresentar diminuição do equilíbrio, irregularidade de movimentos respiratórios, diminuição da coordenação dos movimentos e até paralisia neuromuscular (LAYIWOLA & LINNECAR, 1981). *C. punctatus* exposto a 1/3 da CL₅₀ de fenol também apresenta queda da atividade AChE. HAI e colaboradores (1997) verificaram que o aumento de ERO pode levar a uma inibição da atividade da AChE. O aumento de ácido ascórbico de matrinxã pode sugerir uma proteção contra a ação de ERO, que mesmo assim não foi suficiente para impedir a inibição da AChE.

6.3.4 Biotransformação do fenol

O metabolismo de drogas ocorre principalmente no fígado (PERSONEN & ANDERSSON, 1991; TAYSSE et al., 1998), tem como objetivo transformar um xenobiótico ou produtos endógenos como vitaminas, esteróides e ácidos graxos, em compostos mais hidrofílicos, ou seja, solúveis, e assim facilitar sua eliminação pelos

rins ou, no caso de peixes, pelas brânquias e rins (PORTER & COON, 1991; STEGEMAN et al., 1997; NIYOGI et al., 2001).

Os peixes podem ser diretamente contaminados por fenol, quando ele está no meio como produto resultante de diversos processos industriais (KUMARAN & PARUCHURI, 1997), ou como resultado da biotransformação do benzeno (GUT et al., 1996; SNYDER & CHATTERJEE, 1991) pela enzima benzeno oxidase.

Muitos estudos têm demonstrado que as atividades das enzimas hepáticas ECOD, EROD, GST e UDPGT em peixes podem ser marcadores sensíveis para estudos de exposição a diversos tóxicos (BRUMLEY et al., 1998). O metabolismo de xenobióticos de organismos aquáticos é bem similar ao dos mamíferos, que foi mais estudado até o presente (WINSTON, 1991). As enzimas ensaiadas em matrinxã como indicadores de biotransformação durante a exposição e a recuperação do fenol apresentaram alterações importantes.

Muitas reações de biotransformação hepática da fase I que foram ensaiadas, cuja função é oxidação, redução ou hidroxilação do xenobiótico, dependem do citocromo P450. Entre essas enzimas a ECOD apresentou um aumento significativo após a recuperação de uma e de duas semanas. A atividade da EROD aumentou somente na segunda semana de recuperação. Em peixes, normalmente, a atividade da EROD é catalisada pelo CYP1A, e da ECOD é, provavelmente, catalisada por vários CYP (STEGEMAN et al., 1997; TAYSSE et al., 1998), por isso a atividade da EROD tem sido mais utilizada como biomarcador que a ECOD, pois o CYP1A tem apresentado maior indução (STEGEMAN et al., 1997).

A atividade de EROD relatada em truta arco-íris exposta ao PCB aumentou, assim como a benzo[a]pireno hidroxilase (AAH). Essas enzimas, particularmente a EROD, normalmente apresentam um grande aumento de atividade ou de expressão, quando animais são expostos à moléculas de hidrocarbonetos aromáticos halogenados (HAH) (CELLANDER et al., 1993; HUUSKONEN et al., 1996), a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) (STEGEMAN et al., 1997; BAINY et al., 1999; KIRBY et al., 1999; ANDERSON et al., 2003; MALMSTRÖM et al., 2004) e a outros xenobióticos. Entretanto, não houve alteração da atividade de EROD nem ocorreu expressão de CPY1A em *Micropterus dolomieu*, coletado em vários pontos do

rio Kalamazoo, Michigan, EUA, contaminado com PCB (ANDERSON et al., 2003). Segundo estes autores, o aumento da atividade de EROD, e ou sua expressão, pode ser estimulado pelo xenobiótico, mas este, em elevadas concentrações, também pode diminuir ou não induzir a atividade da citocromo P450. Além destes fatores, a idade, o tamanho, o gênero, e os estados nutricional e reprodutivo também podem interferir na expressão e/ou atividade das monooxigenases hepáticas. MALMSTRÖM e colaboradores (2004) admitem que estes efeitos sejam mínimos para a atividade da EROD, e não afetam a sua indução, ainda que o peixe permaneça até oito semanas em jejum. Ora, os matrinxãs expostos ao fenol ficaram em jejum durante o experimento e, mesmo assim, as atividades da EROD e da ECOD subiram durante a recuperação, reforçando a hipótese de que o fenol pode ter inibido essas atividades durante a exposição e esta inibição provavelmente é prejudicial aos peixes.

A atividade das enzimas da fase I durante a exposição pode ter sido constante devido a algum tipo de inibição pelo fenol. Segundo GUT e colaboradores (1996), o fenol “in vivo” pode causar a inibição da atividade das CYP, entretanto este autor não verificou esta inibição “in vitro”.

Na fase II da biotransformação tem-se a conjugação do xenobiótico, ou dos produtos da fase I, com moléculas endógenas, formando o conjugado ainda mais hidrossolúvel, que facilmente pode ser excretado. O processo de conjugação com ácido glicurônico é considerado a principal via de excreção de compostos endógenos e exógenos (xenobióticos) nos vertebrados (LILIENBLUM et al., 1982; CLARKE et al., 1992a; CLARKE et al., 1992b). Neste caso existe a transferência de um grupo funcional de um ácido glicurônico para o composto a ser conjugado, com a participação da enzima UDPGT. Existem pelo menos seis isoformas desta enzima em *Pleuronectes platessa* que são funcionalmente e estruturalmente muito similares às encontradas em mamíferos, mostrando seu grau de conservação (CLARKE et al., 1992a).

Em matrinxã a atividade da UDPGT diminuiu após a exposição e aumentou após a segunda semana de recuperação. A redução de sua atividade pode ter sido ocasionada principalmente por uma inibição pelo fenol, fato confirmado pelo teste de inibição “in vitro” do fenol sobre a UDPGT. Segundo KUMARAM e PARUCHURI

(1997) o fenol pode agir como um inibidor ligando-se no sítio ativo das enzimas da biotransformação. A inibição desta enzima durante a exposição ao fenol pode ser prejudicial ao matrinxã já que ela é considerada a responsável pela conjugação do fenol para sua excreção (LILIENBLUM et al., 1982; CLARKE et al., 1992a; CLARKE et al., 1992b). Segundo LILIENBLUM e colaboradores (1982), a indução de enzimas da fase I e da fase II, ou seja, dos processos que regulam o balanço entre a ativação e inativação destas moléculas, é decisivo para a não acumulação dos xenobióticos nas células.

O fenol pode também se acumular nas células por ser um composto lipofílico. O tempo de eliminação total do fenol é, portanto, muito importante. Segundo SANNADURGAPPA e colaboradores (2007) o fenol é lentamente eliminado, podendo ser necessário mais de 30 dias para sua eliminação. Este fato pode explicar porque somente após a segunda semana de recuperação houve aumento da atividade da UDPGT. CLARKE e colaboradores (1992b) verificaram que pode ser necessária a utilização de detergentes para a medida da atividade UDPGT, pois esta enzima está localizada na membrana do retículo endoplasmático liso. Por outro lado, alguns detergentes podem, em alguns casos, diminuir a atividade da enzima. Todavia, já que não foi necessário usar detergentes para elevar os níveis de atividade de nossos ensaios, descartamos qualquer inibição da enzima por detergentes “in vitro”.

Outra enzima de conjugação ensaiada nesse trabalho, a GST, também foi inibida após as 96 horas de exposição e aumentou de atividade após a recuperação. Entretanto, o teste realizado “in vitro” sobre o efeito do fenol na atividade da GST não mostrou inibição, diferentemente do que ocorreu com o ensaio da UDPGT. A GST é uma enzima importante em peixes e mamíferos na conjugação de glutathione reduzida aos xenobióticos (WANG & BALLATORI, 1998; REGOLI et al., 2002; ORUC et al., 2004). A indução desta enzima sugere que o papel de proteção contra a peroxidação lipídica também está em parte mantido, já que esta enzima assim como a GPX estão envolvidas neste tipo de proteção (ORUC et al., 2004), além da proteção aos ácidos nucléicos (GALLI et al., 1999). Entretanto, a redução de sua atividade durante a exposição corrobora os resultados obtidos com as enzimas antioxidantes

durante a exposição, que mostraram não ocorrer estresse oxidativo a não ser durante a recuperação. A GST e a GPX apresentaram aumento de atividade após a primeira semana de recuperação, todavia, na segunda semana a GST manteve-se aumentada e a GPX apresentou uma redução.

Em truta arco-íris a atividade da GST hepática é induzida pelo nonilfenol em baixas concentrações (66 µg/L) por duas semanas (UGUZ et al., 2003). A atividade desta enzima aumenta após primeira semana de exposição a 220 µg/L de nonilfenol e reduz-se na terceira semana, mostrando que altos níveis de estresse químico podem levar a um aumento dessa atividade, porém, por um longo tempo, ela pode ser inibida (UGUZ et al., 2003). Truta arco-íris exposta a PCB apresenta aumento da atividade da UDPGT, da GST, da EROD e do conteúdo de citocromo P450 ((HUUSKONEN et al., 1996). A exposição de *Platycephalus bassensis* a 2-cloroseríngaldeído (2CSA), um derivado clorado de fenol, encontrado em grande quantidade nos efluentes de polpa de celulose de eucalipto, não causou variação nas atividades de EROD, ECOD e UDPGT hepática. Entretanto, marcadores de lesões hepáticas como a sorbitol desidrogenase do soro (SSDH) indicaram que ocorreu lesão hepática nesta espécie após 17 horas de recuperação (BRUMLEY et al., 1998). GUDERLEY e colaboradores (2003) observaram que a atividade da GST hepática no bacalhau do atlântico, *Gadus morhua*, submetido ao jejum, não se altera. Porém, ocorre um aumento da atividade da CAT. A UDPGT e a GST são induzidas pela β-naftoflavona em truta arco-íris, mas não são induzidas pela isosafrol (CELANDER et al., 1993). As atividades de EROD, GST e UDPGT em cultura de células de truta arco-íris não são induzidas por PAH (PESONEN & ANDERSON, 1991). A expressão do RNAm da UDPGT de salmão é aumentada pelo tributiltin (biocida utilizado em embarcações, considerado extremamente tóxico e causador de disfunção endócrina), porém o mesmo não ocorre com a expressão da GST e CYP1A (MORTENSEN & ARUKWE, 2007). Esses dados mostram como as atividade destas enzimas variam de espécie para espécie.

A enzima glutathiona S-transferase, ensaiada no plasma de matrinxã, não foi detectada durante a exposição ao fenol. As enzimas ALAT e ASAT plasmáticas, também indicadoras de lesão hepática, não apresentaram aumento plasmático em

matrinxã submetido às mesmas condições dos experimentos aqui relatados, aumentando somente após a primeira e segunda semana de recuperação (HORI et al., 2006). Este resultado sugere algum tipo de lesão hepática ocasionado por algum produto da biotransformação do fenol, talvez até mais tóxico que ele. Observou-se aumento da GST plasmática com concomitante aumento da GST hepática após a recuperação. MULDER e colaboradores (1997) verificaram em humanos que a GST plasmática pode ser um melhor índice de lesão hepática que a ALAT, principalmente em casos de lesões agudas, mas não é considerada um bom marcador para lesões crônicas.

Segundo ANDERSON e colaboradores (1985), GST e UDPGT de fígado de truta arco-íris exposta à β -naftoflavona só foram induzidas após duas a três semanas, permanecendo elevadas até quatro ou cinco semanas após a exposição. Essas enzimas aumentaram sua atividade em 1,3 e 1,4 vezes, enquanto a EROD aumentou até 170 vezes. Estes dados mostraram que o mecanismo de regulação gênica da UDPGT é, provavelmente, diferente e independente da EROD e/ou que elas apresentam diferentes “turnover”. Estes dados também mostraram que a indução da UDPGT também pode ser lenta, como ocorreu também com o matrinxã que apresentou uma indução somente após duas semanas de recuperação, como também este resultado pode estar associado à inibição no período de exposição. HUUSKONEN e colaboradores (1996) admitem que esta lentidão também pode ser ocasionada pela temperatura ambiental.

A indução enzimática varia de espécie para espécie, como observado por GAWOREEKI e colaboradores (2004), que entendiam que tanto a UDPGT quanto a SULT são importantes enzimas da biotransformação hepática da fase II. Entretanto, a SULT é considerada menos indutível que a UDPGT para ser utilizada como biomarcadora. Porém, quando duas espécies, *Ictalurus punctatus* e *Fundulus heteroclitus*, foram expostas a 3-MC (3-metilcolantreno), houve indução hepática da EROD, da UDPGT e da SULT no *I. punctatus*, mas somente a UDPGT foi induzida em *F. heteroclitus*, mostrando a variação entre as espécies.

Além da inibição da UDPGT, os produtos da biotransformação podem ter um papel importante nos efeitos sobre o organismo alvo. Durante a biotransformação

hepática do fenol em ratos “in vitro” é observada a produção de hidroquinona e catecol (20:1), sendo que a concentração deste último é muito maior. A formação de hidroquinona nos hepatócitos de ratos só ocorre na presença de NADPH. Além do mais, esta biotransformação requer oxigênio molecular e é inibida pelo monóxido de carbono (SAWAHATA & NEAL, 1983). O fenol é também um intermediário do catabolismo do benzeno, via benzeno oxidase, sendo posteriormente metabolizado em hidroquinona e catecol (SAWAHATA & NEAL, 1983; GUT et al., 1996).

Em peixes, a biotransformação hepática do fenol forma os mesmos produtos. Os primeiros estudos sobre a biotransformação do fenol mostraram que em várias espécies, os produtos fenil sulfato e fenil glicuronídeo foram os mais encontrados (LAYIWOLA & LINNECAR, 1981). Posteriormente, NAGEL & URICH (1983) verificaram também a presença de hidroquinona como produto da biotransformação do fenol em peixes. Os fenóis derivados também formam produtos de conjugação com o ácido glicurônico e com o sulfato (CRAVEDI et al., 1999). Esses autores observaram a formação de altas concentrações de PCB-glicuronídeo e PCB-sulfato em suspensão de hepatócitos de trutas arco-íris.

MCKIM e colaboradores (1999) fizeram um elegante experimento mostrando que os principais metabólitos de fenol excretado pela truta arco-íris exposta à 5 mg/L de fenol por 144 horas eram o próprio fenol, o fenil-glicuronídeo, fenil sulfato e a hidroquinona. Neste experimento o fenol era colocado na água e a truta dentro de um respirômetro, sendo a saída da cloaca canulada para retirada da urina. Outra cânula foi colocada em uma artéria para coleta do plasma, e ambos passavam por um processo de microdiálise. Os produtos foram identificados por HPLC e os dados mostraram que no plasma e na urina havia maior concentração de fenol que de hidroquinona. As maiores concentrações encontradas por esses autores foram de fenil glicuronídeo na urina e no plasma, seguidos de fenil sulfato. A enzima de sulfatação apresenta alta afinidade, mas baixa capacidade de conjugação, em contraste com a glicuronidação, que apresenta uma baixa afinidade, mas alta capacidade de conjugação. Estes dados indicam que a hidroquinona é um metabólito formado na fase I da biotransformação, como também verificado por KOLANCZYK & SCHMIEDER (2002) e por SOLEM e colaboradores (2003), por microdiálise “in

vivo” de trutas arco-íris. Este último autor também detectou o catecol, em concentração muito menor, na relação hidroquinona: catecol (5:1), tal como verificado também em ratos (SAWAHATA & NEAL, 1983). Estes dados sugerem que durante a biotransformação do fenol, inibindo ou não as enzimas durante a exposição, como ocorreu em matrinxã, o produto da fase I é muito mais tóxico que o próprio fenol, o que pode explicar também as possíveis lesões hepáticas encontradas fase de recuperação, assim como, o aumento de ERO, ocasionando o estresse oxidativo.

6.4 Considerações finais

A maioria dos estudos sobre a toxicidade do fenol em peixes está relacionada aos seus efeitos e dos seus derivados. Poucos estudos avaliaram as adaptações bioquímicas em peixes expostos ao fenol e muito menos a recuperação; menor ainda é o número de estudos com fenol em peixes neotropicais. Iniciamos este estudo há pouco mais de três anos e verificamos que o matrinxã exposto ao fenol apresentava um aumento no catabolismo protéico e glicídico (HORI et al., 2006). Porém, os trabalhos de estresse oxidativo causado pela exposição ao fenol, restringem-se à injeções intra-abdominais de uma concentração em dose única ou fracionada, sem expor os peixes ao fenol dissolvido na água. Trabalhos mostram que doses únicas causam mais estresse oxidativo que a dose fracionada (ROCHE & BOGÉ, 2000). Há ainda trabalhos sobre o efeito causado em células sob cultivo (BOGÉ & ROCHE, 1996; BUKOWASHA & KWASHA, 2004). Entretanto, entendemos que estas formas são mais artificiais para abordar os efeitos do fenol, pois excluem os processos de absorção e distribuição do xenobiótico, que a nosso ver é uma etapa muito importante.

Nossos resultados indicam que o matrinxã exposto ao fenol dissolvido na água não produziu ERO, mas durante a recuperação o aumento desses radicais pode ter sido resultante do seu metabolismo hepático. O fenol provavelmente causou inibição da UDPGT hepática, além deste também ter uma indução lenta (aproximadamente 15 dias) em algumas espécies, podendo também ter causado

inibição do citocromo P450. A biotransformação do fenol durante a recuperação pode também ter causado lesão hepática, visualizada pelo aumento de GST no plasma. É mais provável que o fenol tenha sido metabolizado pela UDPGT do que pela GST, considerando que esta atividade apresentou-se elevada pelo aumento de ERO no fígado. No cérebro o efeito do fenol foi observado somente durante a exposição, quando ocorreu inibição da atividade da AChE, porém após a recuperação observou-se o retorno dessa atividade aos níveis normais.

7 CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho foram:

- O teste de toxicidade aguda ($CL_{50}/96h$) para o fenol revelou o matrinxã é sensível ao fenol.

- Os dados histológicos encontrados indicam que concentrações subletais de fenol causam mais danos às brânquias que ao fígado e ao rim de matrinxã. As principais alterações nas brânquias foram: fusão apical e total da lamela secundária, congestão sangüínea, edema subepitelial e aneurisma, que pode ter levar a hipóxia e até a morte. Apesar de não serem detectadas lesões hepáticas e renais, no fígado há congestão sangüínea, aumento dos capilares sinusóides e estase biliar e no rim há aumento no espaço entre o glomérulo e a cápsula renal, sugerindo um estratégia de eliminação dos resíduos.

O aumento do hematócrito observado esta relacionado principalmente ao aumento da utilização de oxigênio para gerar energia provavelmente a partir do catabolismo carboidratos, principalmente de glicogênio hepático, após a exposição ao fenol, e também como resultado das alterações branquiais ocorridas, principalmente a fusão apical e total da lamela secundária, como resposta para melhorar a captação de oxigênio.

- A análise dos bons biomarcadores de estresse oxidativo indica que o fenol, na concentração em que foi testado, não causou estresse oxidativo e nem funcionou como um antioxidante nos eritrócitos de matrinxã, quer após a exposição, quer após a recuperação de uma e de duas semanas.

- A análise dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado do matrinxã exposto ao fenol, em concentração subletal, indica que não há, em princípio, estresse oxidativo, porém o estresse oxidativo é evidente após a recuperação.

- A atividade da acetilcolinesterase do sistema nervoso central de matrinxã é inibida após a exposição ao fenol, e após a recuperação ela retorna aos valores originais.

- Após a recuperação ao fenol ocorreu um aumento de GST plasmática que sugere algum tipo de lesão hepática, ocasionado pelo fenol ou por algum produto da biotransformação do fenol.

- O fenol causou inibição da UDPGT hepática podendo também ter causado inibição no citocromo P450 após e exposição ao fenol.

- O fenol é um produto tóxico ao matrinxã que causa varias alterações, tanto histológicas como no metabolismo de xenobióticos e no sistema de defesa antioxidante.

8 REFERÊNCIAS

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes: conceitos e perspectivas terapêuticas. **ARS CVRANDI (Manual da Conduta da Clínica Médica) - A revista da clínica médica**, p. 141-164, Nov/Dez, 1993.

AGUIAR, L.H. **Efeitos do inseticida organofosforado Methyl Parathion (Folidol 600®) sobre o teleósteo de água doce Matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869): aspectos do metabolismo intermediário.** 2002. 102f. Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Ecologia e recursos naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.

AGUIAR, L.H. et al., Metabolical effects of Folidol 600 on the Neotropical freshwater fish matrinxã *Brycon cephalus*. **Environ. Res.** v. 95, p. 221-230, 2004.

AHMAD, I. et al., Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1519, p. 37-48, 2000.

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**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1412-1416, 2005.

ANDERSON, M.J. et al., Biochemical and toxicopathic biomarkers assessed in smallmouth bass recovered from a polychlorinated biphenyl-contaminated river. **Biomarkers**, v. 8, n. 5, p. 371-393, 2003.

ANDERSON, T.; PERSONEN, M.; JOHANSSON, C. Differential induction of cytochrome p-450 dependent monooxygenase, epoxide, hydrolase, glutathione transferase and UDP glucuronosyl transferase activities in the liver of the rainbow trout by β - naphthoflavone or clophen A50. **Biochemical Pharmacology**, v. 3, n. 18, p. 3309-3314, 1985.

APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). **Standard methods for examination of water and wastes**. 12. ed., Washington, DC: Join Editorial board, 1980.

AVILEZ, I.M. et al., Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 139, p. 135-139, 2004.

BAINY, A. C.D. et al., Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aq. Toxic.**, v. 34, p. 151-162, 1996.

BAINY, A.C.D.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Bilings Reservoir - São Paulo, Brasil. **Aq. Toxic.**, v. 44, p. 289-305, 1999.

BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of fresh water *Clarias batrachus* L. during dimethoate exposure. **Fd. Chem Toxic.**, v. 33, n. 5, p. 423-426, 1995.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FERITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**, São Paulo: EDUSP, 1976. 239 p.

BENEDECZKY, I.; NEMCSÓK, J. Detection of phenol-induced subcellular alteration by electron microscopy in the liver and pancreas of carp. **Environ. Monit. Asses.**, v. 14, n. 2-3, p. 385-394, 1990.

BENITEZ, L.V.; HALVER, J.E. Ascorbic acid sulfate sulfohydrolase (C₂ sulfatase): the modulator of cellular levels of L-ascorbic acid rainbow trout. **Proc. Nac. Acad. Sci.** v. 79, p. 5445-5449, 1982.

BERMINGHAM, M.L.; MULCAHY, M.F. Environmental risk factors associated with amoebic gill disease in cultured salmon, *Salmo salar* L., smolts in Ireland. **J. Fish Dis.**, v. 27, p. 555-571, 2004.

BERNET, D. et al., Effects of wastewater on fish health: an integrated approach to biomarker to responses in brown trout (*Salmo trout*). **J. Aq. Ecosys. Stress Recov.**, v. 8, p. 143-151, 2000.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism**: manual of biochemical methods. 3rd ed. Grune & Stratton, INC, 1984. 187 p.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOGÉ, G.; ROCHE, H. Cytotoxicity of phenolic compounds on *Dicentrarchus labrax* erythrocytes. **Bull. Environ. Cotam. Toxicol.**, v.57, p. 171-178, 1996.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Portaria n. 20, de 18 de junho de 1986. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de julho de 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Estatísticas**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: abril de 1997.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Estatísticas da Pesca 2004**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2005a 136 p.

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**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2005b.

BRASIL. Secretaria Especial de Pesca e Aqüicultura. **Aqüicultura**. Disponível em <http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/aqui/> Acesso em abr. 2007.

BRUCE, R.M.; SANTODONATO J.; NEAL M.W. Summary review of the health effects associated with phenol. **Toxicol Health**, v. 3, p. 535-568, 1987.

BRUMLEY, C.M. et al., The effects of exposure duration and feeding status on bile metabolites: implications for biomonitoring. **Ecotox. Environ. Safety**, v. 39, p. 147-153, 1998.

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

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicol. Lett.**, v.152, p. 73-84, 2004.

CANADA, A.T.; CALABRESE, E.J. Superoxide dismutase: its a role in xenobiotic detoxification. **Pharmac. Ther.**, v. 44, p. 285-295, 1989.

CARNEIRO, P.C.F.; CIRIO, S.M.; SCHORER, M. Estudo anatopatológico de alevinos de jundiá infectados experimentalmente por *Ichthyophthirius multifiliis* e submetido a tratamentos convencionais. **Arch. Vet. Sci.**, v. 11, n. 1, p. 33-38, 2006.

CARR, R.S. et al. Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. **Anal. Chem.**, v. 55, p. 1229-1236, 1983.

CASILLAS, E.; MYERS, M.; AMES, W.E. Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride. **Aquatic Toxicology**, v. 3, p. 61-78, 1983.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: Ed. UNESP, 1992. 189 p.

CELANDER, M. et al. Induction of cytochrome P450 1A1 and conjugation enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: a time course study. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 106, n. 2, p. 343-349, 1993.

CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO DE ÁGUA. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2001**. Publicado em 2002. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua_geral.html. Acesso em Fev. 2003.

CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO DE ÁGUA. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2004**. Publicado em 2005. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua_geral.html. Acesso em abr.2005.

CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO DE ÁGUA. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2006**. Publicado em 2007. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua_geral.html. Acesso em 2007.

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

CLARKE, D. J.; GEORGE, S.G.; BURCHELL, B. Mutiplicity of UDP-glucuronosyltransferases in fish, purification and characterization of phenol UDP-GLUCURONOSYLTRASFERASES FROM THE LIVER OF A MARINE TELEOST, *Pleuronectes platessa*. **Biochem. J.**, v. 284, p. 417-423, 1992a.

CLARKE, D.J.; BURCHELL, B.; GEORGE, S.G. Diffetential expression and induction of UDP-glucuronosyltransferase isoforms in hetatic and extrahepatic tissues of a fish, *Pleuronectes platessa*: immunochemical and functional characterization. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 115, p. 130-136, 1992b.

CRAVEDI, J.P. et al. Biotransformation of pentachlorophenol, aniline and biphenyl in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) e hepatocytes: comparison with *in vivo* metabolism. **Xenobiotica**, v. 29, n. 5, p. 499-509, 1999.

CUNHA-BASTOS, V.L.F. **Enzimas do metabolismo de xenobióticos em *Piaractus mesopotamicus***. 2001. 164f. Tese (Doutorado defendida pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia) Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2001.

DABROWSKI, K. Absorption of ascorbic acid sulfate and ascorbato metabolism in common carp (*Cyprinus carpio* L). **J. Comp. Physiol. B**, v. 160, p. 549-561, 1990.

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

DRABKIN, D. L. The standardization of hemoglobin measurement. **Am. J. Med. Sci.**,v. 215, n. 1, p. 110-111, 1948.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetilcolinesterase activity. **Bichem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EPA-US. AGÊNCIA NACIONAL PARA PROTEÇÃO DO MEIO AMBIENTE AMERICANA. **Current National Recommended Water Quality Criteria** Disponível em < <http://www.epa.gov/>> Acesso em abr. 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRACALOSSI, D. M. et al. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. **Aquaculture**, v. 192, p. 321-332, 2001.

FYTIZAS, R. Toxicity of paraquat to three marine organisms. **Bull. Environ. Contaminat. Toxic.**, v. 25, n. 1, p. 283-288, 1980.

GALLI, F. et al. Overexpression of erythrocyte glutathione S transferase in uremia and dialysis. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 1781-1788, 1999.

GAWORECKI, K.M., RICE, C.D. HURK, P. van der. 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.

GILMAN, A. G. Farmacocinética ; a dinâmica da absorção , distribuição e eliminação dos fármacos In: _____ **GOODMAN & GILMAN: as bases farmacológicas da terapêutica** 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamerica editora, 1996. seção 1, cap. 1 p. 3-21.

GOEPTAR, A.R., SCHEERENS, H., VERMEULEN, N.P. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 25, n. 1, p. 25-65, 1995.

GOLDENFARB, H.L. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Am. J. Clin. Path.**, v. 56, p. 35-39, 1971

GOLDSTEIN, E. G., CLYMO, R. S. **Methods for chemical analysis of freshwater.** Oxford: Blackwell Scientific publications.1969. 171 p. (IBP Handbook n.8)

GUDERLEY, H. et al. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 135, p. 347-356, 2003.

GÜL, S. et al. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam lake, Turkey. **Environmental International**, v. 30, p. 605-609, 2004.

GUPTA, P.K. et al. Toxicity of phenol, pentachlorophenol and sodium pentachlorophenolate to a fresh water teleosts *Lebistes reticulatus* (Peters). **Acta Hydrochim. Hydrobiol.** v. 10, n. 2, p. 177-181, 1982.

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.

GUPTA, S.; DALELA, R.C.; MANE, U.H. Effect of phenolic compounds on alkaline phosphatase in certain tissues of the fish, *Notopterus notopterus*, **Assessment of environmental pollution.**, p. 151-157, 1984.

GUT, I. et al. Cytochromes P450 in benzene metabolism and involvement of their metabolites and reactive oxygen species in toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 6, p. 1211-1218, 1996.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S transferases: the first step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HACKBARTH, A.; MORAES, G. Biochemical responses of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) after sustained swimming. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 11, p. 1070-1078, 2006.

HAI, D. Q.; VARGA, S.Z.I.; MATKOVICS, B. Organophosphate effects on antioxidant system on carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 117, p. 83-88, 1997.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.U. Trimmed spearman-kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Env. Sci. Technol.**, v. 12, n. 4, p.417, 1978.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton, Florida: CRC. Press. 1995, 245 p.

HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. **Cancer Research**, v. 56, p. 5172-5178, 1996.

HODGSON, P.A.; GEORGE, S.G. Xenobiotic biotransformation enzyme gene expression in early larval stages of plaice. **Mar. Environ. Res**, v. 46, n. 1-5, p. 465-468, 1997.

HODGSON, E. **Textbook of modern toxicology**. 3rd ed. USA: John Wiley & Sons Publication. 2004. 557 p.

HOLMBERG, B. et al. Metabolic effects of technical pentachlorophenol (PCP) on the eel *Anguilla anguilla* L. **Comp. Biochem. Physiol. B**. v. 43, p. 171-183, 1972.

HORI, T.S.F. **Impacto da exposição crônica ao fenol no metabolismo, fisiologia e resposta ao estresse de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*: Teleostei; Characidae)**. 2005. 119f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) Universidade Federal de São Carlos, 2005.

HORI, T.S.F. et al. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei; characidae) juveniles. **Comp. Biochem. Physiol., C.**, v. 143, p. 67-72, 2006.

HUUSKONEN, S. et al. Effects of non-ortho-substituted biphenyls (Congeners 77 and 126) on cytochrome p4501A and conjugation activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 113, n. 2, p. 205-213, 1996.

JAGETIA, G.C.; ARUNA, R. Hydroquinone increases the frequency of micronuclei in a dose-dependent manner in mouse bone marrow. **Toxicol. Lett.** v.93, p. 205-213, 1997.

JENNINGS, J.G. et al. Phenolic compounds in the nearshore waters of Sydney, Australia. **Mar. Freshwater Res.**, v. 47, p. 951-959, 1996.

JOY, J. E.; MADAN, E. Pathology of black bass hepatic tissue infected with larvae of the tapeworm *Proteocephalum ambloplitis* **Journal of Fish Biology**, v. 35, n.1, p 111, 1989.

JUNG, D.K.; KLAUS, T.; FENT, K. Cytochrome P450 induction by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and binary mixtures in fish hepatoma cell line PLHC-1. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 20, n. 1, p. 149-159, 2001.

KAILA, K. Cellular neurophysiological effects of phenol derivates. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 73, p. 231-241, 1982.

KHAN, K.A. et al. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 26, p. 95-102, 1994.

KIBRET, M.; SOMITSCH, W.; ROBRA, K.H. Characterization of a phenol degrading mixed populations by enzyme assay. **Wat. Res.**, v. 34, p. 1127-1134, 2000.

KIRBY, M.F. et al. Hepatic EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) as an indicator of contaminant exposure in English estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 8, p. 676-686, 1999.

KIRKMAN, H.N.; GAETANI, G.F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NNADPH. **PNAS**, v. 81, p. 4343-4347, 1984.

KISHINO, T.; KOBAYASHI, K. Relation between toxicity and accumulation of chlorophenols at various pH, and their absorption mechanism in fish. **Wat. Res.**, v. 29, n. 2, pg 431-442, 1996.

KOLANCZYK, R.C.; SCHMIEDER, P.K. Rate and capacity oh hepatic microsomal ring-hydroxylation of phenol to hydroquinone and catechol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology**, v. 176, p. 77-90, 2002.

KOPENEN, K. et al. Histopathology of feral fish from a PCB-contaminated freshwater lake. **Ambio: A Journal of the Human Environment**, v. 30, n. 3, p. 122-126, 2001.

KOTKAT, H.M.; RADY, A.A.; JANOS, N. Sublethal effects of phenol on the phospholipids fatty acid composition of carp erythrocyte plasma membrane. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.42, p. 35-39, 1999.

KUMAR, V.; MUKERJEE, D. Phenol and sulfide induced changes in the ovary and liver of sexually maturing common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquatic Toxicology**, v. 13, n. 1, p 53-59, 1988.

KUMARAN, P.; PARUCHURI, Y.L. Kinetics of phenol biotransformation. **Wat. Res.**, v. 31, n. 1, p. 11-22, 1997.

LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Mutation Research**, v. 463, p. 247-283, 2000.

LAWRENCE, A. J.; HEMINGWAY, K. L. **Effects of pollution on fish: molecular effects and population responses**. Oxford: Blackwell Publishing, 2003. 342 p.

LAYIWOLA, P.J.; LINNECAR, D.F. The biotransformation of [¹⁴C]phenol in some freshwater fish. **Xenobiotica**, v.11, p. 161-171, 1981.

LEITÃO, M.A.S. et al. The liver monooxygenases system of Brazilian freshwater fish. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 126, p. 299-38, 2000.

LILIENBLUM, W.; WALLI, A.K.; BOCK, K.W. Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 31, n. 6, p. 907-913, 1982.

LIMA, A.O. et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1969, 653 p.

LIMA, F.L. Brycon. In: Backup, P.A.; Menezes, N.A. (Ed.) **Catálogo dos Peixes Marinhos e de Água Doce do Brasil**. 2.ed. 2003. Disponível em: <<http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo/>> acessoem: abr. 2007.

LIN, M.F.; SHIAU, S.Y. Requirements of vitamin C (L- ascorbyl-2-sulphate and L- ascorbyl-2-poluphosphate) and its effects on non-sepecific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v. 11, p. 183-189, 2005.

LINDSTRÖM-SEPPÄ, P. et al. Biotransformation and glutathione homeostasis in rainbow trout exposed to chemical and physical stress. **Marine Environmental Research**, v. 42, n. 1-4, p.323-327, 1996.

LUSHCHAK, V.I. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 280, p. 100-107, 2001.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Cient., Ciênc. Biol. Saúde**, UNOPAR, v. 1, n1, p. 63-76, 1999.

MALMSTRÖM, C.M. et al. Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, p. 365-372, 2004.

McCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, p. 652-659, 2000.

McINTYRE, M.; BOHR, D.F.; DOMINIZAK, A.F. Endothelial function in hypertension, the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, p. 539-545, 1999.

McKIM, J.M. et al. Dynamics of renal excretion of phenol and major metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, v.45, p. 265-277, 1999.

MEDEIROS, S.H.L. et al. Avaliação da lesão isquêmica normotérmica do fígado: papel da oclusão do ducto biliar principal e da n-acetilcisteína. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 32, n. 4, p. 168-172, 2005

MELO, M.M.; NASCIMENTO, E.F; OLIVEIRA, N.J.F. Intoxicação de bovinos por aflatoxina B1 presente em polpa cítrica: relato de um surto. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, n.6, p. 555-558, 1999.

MENDONÇA, J.O.J. O gênero Brycon. **Panorama da aquicultura**, p. 14-16, jan/fev., 1996.

MILTERSTEINER, A. et al. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 232-237, 2003.

MITROVIC, V.V. et al. Some pathological effects of sub-acute and acute poisoning of rainbow trout by phenol in hard water. **Water Research**, v. 2, p. 249-254, 1968.

MONTEIRO, D.A. et al. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 143, p. 141-149, 2006.

MOORE, M. J. et al. Cytochrome P4501A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments

from the Caspian Sea, Lake Balkhash and the Ily River Delta, Kazakhstan. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 107-119, 2003.

MORTENSEN, A.; ARUKWE, A. Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT). **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 145, p. 431-441, 2007.

MUKHERJEE, D. et al. Biological significance of [¹⁴C]phenol accumulation in different organs of a murrel, *Channa punctatus*, and the common carp, *Cyprinus carpio*. **Biomed. Environ. Sci.**, n. 3, p. 337-342, 1990.

MULDER, T.P.J. et al. Plasma glutathione S transferase alpha-1 levels in patients with chronic liver disorder. **Clinica Chimica Acta**, v. 258, p. 69-77, 1997.

MURPHY, D.L.; GOOCH, J.W. EROD and CYP1A protein in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) from an urban estuary relative to that in benzo[a]pyrene-exposed hatchery specimens. **Environmental Pollution**, v. 95, n. 2, p. 235-239, 1997.

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

NAGEL, R.; ULRICH, K. Kinetic studies on the elimination of different substituted phenols by goldfish (*Carassius auratus*). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 24, p. 374-378, 1980.

NAM, Y.K. et al. Alteration of antioxidant enzymes at the mRNA level during short-term starvation of rockbream *Oplegnathus fasciatus*. **Fisheries Science**, v. 71, p. 1385-1387, 2005.

NANDI, A. et al. Evolutionary significance of vitamin C biosyntheses in terrestrial vertebrates. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, n. 6, p. 1047-1054, 1997

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

NIYOGI, S. et al. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v. 52, p. 13-26, 2001.

NOREÑA-BARROSO, E. et al. Persistent organic pollutants and histological lesions in mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the Bay of Chetumal, Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 263-269, 2004.

OLSEN, C.M. et al. Brominated phenols: characterization of estrogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7. **Toxicol. Lett.**, v.129, p. 55-63, 2002.

OLSSON, P.E. et al. Effects of Maternal Exposure to Estrogen and PCB on Different Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). **Ambio**, v. 28, n. 1, p. 100, 1999.

ORELLANA, M. B., GUAJARDO, V.T., Actividad del citocromo P450 y su alteración em diversas patlogías. **Rev. Méd. Chile**, v. 1323, p. 85-94, 2004.

ORUC, E.O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-sepecific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 137, p. 43-51, 2004.

PANGREKAR, J. et al. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene, chrysene and phenanthrene by brown bullhead liver microsomes. **Marine Environmental Research**, v. 39, p. 51-55, 1995.

PÉREZ-CAMPO, R. et al. Comparative study of free radicals in vertebrates--I. Antioxidant enzymes. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 105, n. 3-4, p. 749-755, 1993.

PESONEN, M.; ANDERSON, T. Characterization and induction of xenobiótico metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. **Xenobiotica**, v. 21, n. 4, p. 461-471, 1991.

PORTER, T.D.; COON, M.J. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 21, p. 13469-13472, 1991.

PRADHAM, D. et al. Peroxidation-induced perturbation of erythrocyte lipid organization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 123, p. 3404, 1990.

REDDY, M.M. et al. Phenol induced metabolic alterations in the brain and muscle of a fresh water fish *Channa punctatus* during sublethal toxicosis. **Ecotoxicol. Environ. Monit.**, v. 3, n. 1, p. 13-17, 1993.

REGOLI, F. et al. Application of biomarker for assessing the biological impact of dredged material in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 912-922, 2002.

RIBA, I. et al. Sediment quality in the Guadalquivir estuary: sublethal effects associated with the Aznalcóllar minig spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 153-163, 2004.

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.**, v. 41, n. 1, 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.

ROJAS, G.A.A. **Efeitos da natação sustentada no crescimento, na densidade de estocagem e na composição corporal em juvenis de Brycon amazonicus. Aspectos adaptativos e respostas metabólicas.** 2007 148 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos. 2007.

SAHA, N.C.; BHUNIA, F.; KAVIRAJ, A. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 63, p. 195-202, 1999.

SALLES, J.B. **Ativação da Glicuronosiltransferase Microsomal Hepática de Cascudo e de Pacu.** 2000. Dissertação (Mestrado em Biologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG)) Universidade Estadual do Rio de Janeiro. p. 28-30, 2000.

SALTMAN, P. Oxidative stress: a radical view. **Seminars in hematology**, v. 26, n. 4, p. 249-256, 1989.

SALVI, A. et al. Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants and influence of protein binding. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, p. 1237-1242, 2000.

SANCHO, E.; CERÓN, J.J.; FERRANDO, M.D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 81-16, 2000.

SANNADURGAPPA, D.; RAVINDRANATH, N.H.; ALADAKATTI, R.H. Toxicity, bioaccumulation and metabolism of phenol in the freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Basic & Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 65-77, 2007.

SASTRY, K.V.; SHARMA, S.K. The effect of endrin on the histopathological changes in the liver of *Channa punctatus* **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 674-677, 1978.

SAWAHATA, T., NEAL, R.A. Biotransformation of phenol to hydroquinone and catechol by rat liver microsomes. **Molecular Pharmacology**, v. 23, p. 453-460, 1983.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 295-301, 2003.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress; molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHMIEDER, P.K.; HENRY, T.R. Plasma binding of 1-butanol, phenol, nitrobenzene, and pentachlorophenol in rainbow trout and rat: a comparative study. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 91, p. 413-418, 1988.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.10, n.4, p.308-313, 2004.

SCHÜÜRMAN, G.; SEGNER, H.; JUNG, K. Multivariate mode of action analysis of acute toxicology of phenols. **Aquatic Toxicology**, v. 38, p. 277-296, 1997.

SCOTT, G.R.; SLOMAM, K.A. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic toxicology**, v. 68, p. 369-392, 2004.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 31-38, 1991.

SILVA FILHO, M.V. et al. Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterase from brain of neotropical fishes. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 247-254, 2004.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 48, n. 6, p. 812-816, 2004.

SNYDER, R.; CHATTERJEE, S.P. Benzene metabolism. In: ARINÇ, E.; SCHENKMAN, J.B.; HODGSON, E. **Molecular Aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds**. New York: Prentice Hall. 1991.

SOLEM, L.E.; KOLANCZYK, R.C.; McKIM, J.M. An in vivo microdialysis method for the qualitative analysis of hepatic phase I metabolites of phenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, v.62, p. 337-347, 2003.

SRI International. **Directory of chemical producers, USA**. SRI Int., Menlo Park, CA, p.839, 1988.

STEGEMAN, J.J.; MILLER, M.R.; HINTON, D.E. Cytochrome P450IA1 induction and localization in endothelium of vertebrate (teleost) heart. **Molecular Pharmacology**.v. 36,n. 5, p. 723-729, 1989.

STEGEMAN, J.J. Cytochromes P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multipl CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 116, n. 1, p. 61-75, 1997.

SWIFT, D.J. Changes in selected blood component concentratios of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, exposed to hypoxia or sulethal concentration of phenol or ammonia. **J. Fish Biol.**, v. 19, p. 45-61, 1981.

SWIFT, D.J. Changes in selected blood component values of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following the blocking of the cortisol stress responses with betamethasone and subsequent exposure to phenol or hypoxia. **J. Fish Biology**, v. 21, p. 269-277, 1982.

TAVARES, L. H. S. **Limnologia aplicada à aqüicultura**. Jaboticabal, SP: FUNEP,1994. 70 p.

TAYSSE, L. et al. Basal level and induction of cytochrome P450, EROD, UDPGT, and GST activities in carp (*cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). **Bull. Environ. Toxicol.**, v. 60, p. 300-305, 1998.

TAYSSE, L. et al. Structure activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicityof carp (*Cyprinus carpa*). **Toxicology**, v.98, p. 207-214, 1995.

TISLER, T.; ZAGORC-KOCAN, J.Z. Comparative assessment of toxicity of phenol, formaldehyde, and industrial wastewater to aquatic organisms. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 97, p. 315-322, 1997.

TONG, Z.; JAMES, M.O. Purification and characterization of hepatic and intestinal phenol sulfotranferase with high affinity for Benzo[a]pyrene phenols from channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Arch. Bichem. Biophys.**, v. 376, n. 2, p. 409-419, 2000.

TRIEBSKORN, R. et al. Biomarker as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. **Ecotoxicology**, v. 11, p. 451-465, 2002.

TSUTSUI, T. et al. Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell-transformation, gene mutation, chromosome, aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. **Mutat. Res.**, v. 373, p. 112-123, 1997.

TUCKER, B.W.; HALVER, J.E. Utilization of ascorbate -2- sulfate in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 2, n, 1-4, p, 151-160, 1986.

UGUZ, C. et al. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effects on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). **Environmental Research**, v. 92, p. 262-270, 2003.

VAL, A. L.; HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia**. Manaus, AM: INPA, 1995. 160 p.

VALAVADINIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178-189, 2006.

VERMA, S.R.; RANI, S.; DALELA, R.C. Effect of phenol on in vivo activity of tissue transaminases in the fish *Notopterus notopterus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 6, n. 2, p. 171-176, 1982.

VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION **Pesticide and Aquatic Animals**: a guide to reducing impacts on aquatic systems. <<http://www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.html>>. Acesso em: 15 oct. 1999.

WALLACE, W.J.; CAUGHEY, W.S. Mechanism for the autoxidation of hemoglobin by phenols, nitrite, and "oxidant drugs": peroxide formation by one electron donation to bound dioxygen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 62, n. 3, p. 561-567, 1975.

WALSH, L.P. et al. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environ. Health Perspect.**, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.

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. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 201, p. 194-201, 2004.

WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 335-355, 1998.

WEBER, L.P.; HILL, R.L.; JANZ, D.M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. **Aquatic toxicology**, v. 63, p. 431-446, 2003.

WESTER, P.W. et al. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 289-295, 2002.

WILHELM FILHO, D.; GIULIVI, C.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish -I teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.C.**, v. 106, n. 2, p. 409-413, 1993.

WILHELM-FILHO, D. Effects of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, p. 349-357, 2005.

WILHELM-FILHO, D. Fish antioxidant defenses - a comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1735-1742, 1996.

WILLIAMS, D.E.; LECH, J.J.; BUHLER, D.R. Xenobiotics and xenoestrogen in fish: modulation of cytochrome p450 and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 399, n 2, p. 179-192, 1998.

WINSTON, G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 100, n.1-2, p. 173-176, 1991.

WOLF, J.C.; WOLFE, M.J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. **Toxicologic Pathology**, v. 33, p. 75-85, 2005.

YU, T.W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, p. 201-210, 1997.

ZANIBONI FILHO, E. et al. Caracterização morfológica do matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (TELEOSTEI: CHARACIDAE). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 48, n. 1, p. 41-50, 1988.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEING, M.A. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. **Rev. Col. Cienc. Pec.**, v. 19, p. 233-240, 2006.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD 2), and EC - SOD (SOD 3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

ZHANG, J. et al. 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.