

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

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO FENOL NO
METABOLISMO, FISIOLOGIA E RESPOSTA AO ESTRESSE
DE JUVENIS DE MATRINXÃ (*Brycon cephalus*: Teleostei;
Characidae)**

TIAGO SILVESTRE FERNANDES HORI

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Evolução do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Genética e Evolução, área de
concentração: Genética e Evolução.

-São Carlos-
2005

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

H811ie

Hori, Tiago Silvestre Fernandes.

Impacto da exposição crônica ao fenol no metabolismo, fisiologia e resposta ao estresse de juvenis de Matrinxã (*Brycon cephalus*: Teleostei; Characidae) / Tiago Silvestre Fernandes Hori. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

119 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Fisiologia – controle de processos. 2. Metabolismo. 3. Fenol. 4. *Brycon cephalus*. 5. Estresse. 6. Cortisol. I. Título.

CDD: 591.188 (20^a)

Prof. Dr. Gilberto Moraes
Orientador

“UM LANCE DE DADOS JAMAIS ABOLIRÁ O
ACASO”
MALLARMÉ.

À todos os animais que são sacrificados em nome da ciência, eu dedico esse trabalho. Que essa vida tenha aberto novos caminhos e existências para eles e que o conhecimento científico possa vir beneficiar muitos outros seres.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes, por tornar possível esse estudo. Por ter suportado a entropia que me cerca e por ter me ajudado a converter, contra as leis da termodinâmica, entropia em energia livre. Pelos seus ensinamentos sobre o que significa fazer ciência e por me permitir laços de amizade.

Ao Prof. Dr. Luis Afonso, por ter me recebido em seu laboratório e em sua casa. Por todo o suporte logístico e intelectual e por uma grande lição sobre comprometimento e dedicação.

Aos Profs. Drs. Vera e Jayme Cunha Bastos, pelas contribuições feitas durante a defesa e durante o processo de construção desse trabalho mas, além de tudo, por nos ajudar a não deixar que a ciência se torne um trabalho chato e burocrático.

A Prof. Dra. Lucia Helena Aguiar por ter participado de minha banca como ela sempre foi no convívio: precisa e inteligente.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido através de uma bolsa do programa de pós-graduação em genética e evolução. À FAPESP pelo apoio financeiro dado ao processo 03/07884-0.

Ao NRC-CNRC por ter me recebido e apoiado às diversas necessidades científicas ligadas a realização de parte desse trabalho.

À minha querida amiga Ive, por compartilhar comigo muitos sonhos e por ter aceitado o risco dessa viagem.

Aos colegas de laboratório: Ara, Lú, Luis, Fernando, Timba, Rodrigo, Aruak, Lucas, Fábio, Cassia, Gustavo, Gra, Alê, Lucia, Simone, Andressa, Lícia, Sho, sem os quais esse trabalho não teria sido realizado. Obrigado pela dedicação e por tornar meu trabalho imensamente mais fácil e prazeroso.

Aos amigos e Amigas que sempre estiveram comigo nessa longa estrada: Matias, Camila Mazzeto, Cã, Ivo, Fê, Pedrinho, Mari, Danny, Cris, Julia Weinstock, Ferreira, Marina, Rê, Lucas, Alê, Carol, Zé Pedro, Fábio, Sadao, Cris Cordeiro, Gabi, Pé, Nakama, Marina (bio), Erica, Alessandra, Fulvio, Anselmo, Braw, Katrina, Holly, Belzinha, Adriana, Paulo, Thais, Sara, Vanessa, Piu, Eglen, Jr, Daniel Leiva, Renata, Doug, Thais Bittar, Zé Alberto, Xú, Saulo, Baço, Carlinha, Thomaz, Lú, Jú, Má, Kika, Thaise, Patty, Rê, Andres, Patrícia. Obrigado pelas memórias e pelos sorrisos.

A Família Afonso, por ter me recebido como um hóspede e me tratado como um amigo.

Ao meu irmão e minhas irmãs, por essa busca infindável por laços afetivos mais fortes e pontes: de Nova Iorque a São Paulo, de São Paulo a Campinas, de Campinas a Miami, de Miami a São Carlos. Por esse amor que estreita fronteiras.

Ao meu pai e minha mãe, por serem um exemplo de dedicação e integridade. Por sua infinita paciência e afeto que sempre perdoam meus momentos de egocentrismo. Por me darem ferramentas para percorrer os caminhos com força e dignidade.

À Profa. Dra. Ana Luiza Perdigão, por ter me aberto a porta para um sonho de transformação.

À Profa. Dra. Roseli Melo, por me lembrar sempre que, o que quer você faça, é preciso manter os sonhos vivos.

À Todos/Todas participantes das tertúlias, por compartilharem comigo suas palavras e nelas, a vida.

Aos professores do PPGGEV-UFSCar, que me mostraram caminhos e portas. Por suas diversas contribuições em minha formação.

À secretária do PPGGEV por todo o apóio ao longo desse mestrado.

Ao Toninho, por todas as vezes que ele entrou em tanques, mudou peixes, comprou peixes, consertou bombas e puçás entre outras tarefas mirabolantes, para que nós pudéssemos realizar experimentos.

À Betina e Fernanda Afonso, por terem sempre uma gargalhada pronta para afastar o inverno Canadense.

À Graziela, por que meus dias têm mais sol do que chuva; mais caminhos e menos becos, mais sorrisos e menos lágrimas.

OBRIGADO

RESUMO

A poluição dos ambientes aquáticos é responsável por perdas consideráveis nas populações de diversos peixes, tanto no mar como em água doce. Dentre as muitas classes de substâncias despejadas nos sistemas aquáticos, os fenóis apresentam um grande potencial nocivo devido aos seus muitos mecanismos de ação. Esses incluem: genotoxicidade, hematotoxicidade, imunotoxicidade, citotoxicidade, estresse oxidativo e ação disruptora no sistema endócrino. Diversos trabalhos já demonstraram a capacidade dos fenóis de também alterar diversas vias metabólicas. Além disso, por ser um composto lipofílico, o fenol apresenta um potencial para bioacumulação ao longo da cadeia trófica e, por consequência, um risco para comunidades que se alimentam de peixes. O Matrinxã (*Brycon cephalus*) é um peixe que apresenta potencial para a aqüicultura devido a sua taxa de crescimento (1 kg/ano) e boa aceitação de ração comercial. Mais do que isso, o matrinxá representa 7% do total de peixes consumidos no Amazonas.

O objetivo do presente trabalho foi indentificar as respostas metabólicas, endócrinas e celulares de juvenis de Matrinxã (*Brycon cephalus*) expostos a concentrações subletais de fenol. Para tanto, três experimentos foram realizados. O primeiro foi um teste de toxicidade para determinar a CL-50/96h do fenol para o Matrinxã. Em seguida, os peixes foram expostos por 96h a 10% da CL-50, num experimento que visou identificar as alterações no metabolismo do *B. cephalus* exposto ao fenol. Por fim, os peixes foram expostos por 96 horas a 1% e 10 % da CL-50 e em seguida submetidos a um “handling stress”. Essa segunda exposição teve como objetivo verificar as respostas de indicadores de estresse (cortisol, glicose e HSP70) a exposição ao fenol e também os possíveis efeitos da intoxicação na habilidade do animal de responder a segundo estressor.

Diversas alterações foram observadas no metabolismo do matrinxã exposto ao fenol. Houve uma redução no metabolismo de carboidratos tanto em músculo como em fígado e um subsequente aumento no metabolismo de proteínas. Essas alterações são provavelmente resultado de uma maior demanda metabólica, que também se evidencia no aumento do metabolismo oxidativo encontrado no presente trabalho. Esse aumento contraria o dado presente na literatura para os pesticidas, indicando que não ocorreu anoxia celular.

A exposição ao fenol não causou a resposta clássica que é observada com outros estressores quando consideramos a glicose e o cortisol. Isso sugere que esses indicadores podem não ser ideais para estresse químico. A dose menor (0,2 ppm) claramente afetou a habilidade dos animais de responder a um segundo estressor, e esse resultado apareceu tanto no cortisol quanto na glicose. Os níveis constitutivos da HSP70 se mostraram reduzidos tanto em brânquia quanto no fígado, sendo que o efeito nas brânquias foi mais duradouro. O “handling stress” não afetou a expressão das HSP70, enquanto aparentemente o jejum apresentou a redução generalizada nos níveis dessa proteína no fígado. No caso dos indicadores celulares a dose maior (2,0 ppm) foi mais tóxica. A exposição ao fenol também inibiu a resposta característica do balanço iônico em resposta ao “handling”.

O exposição ao fenol produz diversas alterações no metabolismo do Matrinxã e essa possivelmente podem afetar o crescimento e as chances de sobrevivência. Além disso, a intoxicação compromete em diversos níveis a habilidade do animal de responder ao estresse.

ABSTRACT

The contamination of the aquatic environment has been responsible for considerable losses on natural stocks of several marine and freshwater fish. Among the many classes of chemicals dumped in aquatic system, the phenols present a great harmful potential due to its many modes of action. These include: genotoxicity, haematotoxicity, immunotoxicity, citotoxicity, oxidative stress and action as endocrine disruptors. Several authors have also demonstrated phenols capability of altering fish metabolism. Moreover because of its lipophilicity, phenol has a high bioaccumulation potential and can, therefore, present a high risk to fish consumers. Matrinxa (*Brycon cephalus*) presents a great aquaculture potential because of its growth rate (1 kg/year) and its good acceptance for commercial feed. This fish also represents 7% of the total of fish consumed in the Amazonas state.

The main objective of this work was to identify the metabolic, endocrine e cellular responses of Matrinxa (*Brycon cephalus*) exposed to sub lethal concentrations of phenol. In order to accomplish this, three experiments were conducted. The first one consisted in a toxicity test designed to establish the LC-50/96h of phenol to Matrinxa. After that the fish were exposed for 96 hours to 10% of Matrinxa's LC-50. The objective of this experiment was to look into the metabolic alterations induced by phenol. Finally, we exposed Matrinxa for 96 hours to 1% and 10% of the LC-50 and at the end of the exposure submitted the fish to a handling stress. The second exposure experiment was designed to verify the responses of stress indicators (cortisol, glucose and HSP70) to phenol intoxication and also the possible effects of exposure in the ability of fish to respond to a second stressor.

Phenol induced many alterations on Matrinxa's metabolism. We could observe a general reduction of carbohydrate metabolism followed by an increase in proteolysis.

Both of these effects are likely to be a response to a higher metabolic demand, which was confirmed by an increase in oxidative metabolism. This data is contrary to the one found in case of pesticide intoxication, indicating there was no cellular anoxia.

When considering cortisol and glucose phenol exposure did not elicit the classical stress response observed for other stressors. These results suggest that cortisol and glucose might not be the best indicators for chemical stress. A lower dose (0,2 ppm) clearly affected the fish ability to respond to a second stressor. The constitutive levels of HSP70 were reduced in gills and liver. In the gills a more lasting effect was observed. The handling stress did not affected HSP70 expression while starvation seemed to induce a generalized reduction on the levels this particular protein. When looking into the cellular stress response the higher dose (2,0 ppm) appears to be more toxic. The exposition to phenol also inhibited the characteristic ionic changes in response to stress.

Phenol intoxication affects animal metabolism and this is likely to have effects on growth and survival. Moreover, the ability of these fish to respond to a second stressor is reduced in both organismal and cellular levels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enzimas envolvidas na síntese do cortisol.....	5
Figura 2. Alterações no metabolismo de peixes induzidas pelo cortisol.....	7
Figura 3. Alvos potenciais onde os xenobióticos podem exercer seu efeito inibidor no sistema endócrino dos peixes.....	15
Figura 4. Exemplar de <i>Brycon cephalus</i>	22
Figura 5. Valores médios±EPM do hematócrito (%) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	45
Figura 6. Valores médios±EPM da concentração de metahemoglobina (%) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	46
Figura 7. Valores médios±EPM do número de células vermelhas (milhões de células/mm ³) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	47
Figura 8. Valores médios±EPM das concentrações de sódio plasmático (mEq/ml) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	48
Figura 9. Valores médios±EPM das concentrações de cloreto plasmático (mEq/ml) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	48
Figura 10. Valores médios±EPM das concentrações de glicose hepática (µmol/g de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	51
Figura 11. Valores médios±EPM das concentrações de piruvato hepática (µmol/g de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	51
Figura 12. Valores médios±EPM das concentrações de amônia hepática (µmol/g de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	52
Figura 13. Valores médios±EPM das concentrações de amino ácidos livres (µmol/g de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	53
Figura 14. Valores médios±EPM das concentrações de glicogênio hepático (µmol de glicosil-glicose/g de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	53
Figura 15. Valores médios±EPM das concentrações de proteína total hepática (mg de proteína/mg de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	54
Figura 16. Valores médios±EPM das concentrações de glicose muscular (µmol/g de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	56
Figura 17. Valores médios±EPM das concentrações de piruvato muscular (µmol/g de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	57
Figura 18. Valores médios±EPM das concentrações de lactato muscular (µmol/g de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	57
Figura 19. Valores médios±EPM das concentrações de proteína total muscular (mg de proteína/mg de tecido) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	58
Figura 20. Valores médios±EPM das concentrações de lactato plasmático (µmol/ml de plasma) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	60
Figura 21. Valores médios±EPM das concentrações de Amino ácidos livres plasmáticos (µmol/ml de plasma) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	61
Figura 22. Valores médios±EPM das concentrações de proteína total plasmática (mg de proteína/ml de plasma) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	62
Figura 23. Valores médios±EPM das atividades específicas da LDH de fígado (mU/mg de proteína) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	64
Figura 24. Valores médios±EPM das atividades específicas da MDH de fígado (mU/mg de proteína) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	65
Figura 25. Valores médios±EPM das atividades específicas da ALAT de fígado (mU/mg de proteína) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	65
Figura 26. Valores médios±EPM das atividades específicas da ASAT de fígado (mU/mg de proteína) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	66
Figura 27. Valores médios±EPM das atividades específicas da ALAT de músculo branco (mU/mg de proteína) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	68

Figura 28. Valores médios±EPM das atividades específicas da ASAT de músculo branco (mU/mg de proteína) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	68
Figura 29. Valores médios±EPM das atividades específicas da PK de músculo branco (mU/mg de proteína) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	69
Figura 30. Valores médios±EPM das atividades específicas da LDH plasmática (mU/mg de proteína) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	70
Figura 31. Valores médios±EPM das atividades específicas da ASAT plasmática (mU/mg de proteína) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.....	71
Figura 32. Valores médios±EPM das concentrações de glicose plasmática (mg/dl) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 0,2ppm e 2ppm de fenol.....	73
Figura 33. Valores médios±EPM das concentrações de glicose plasmática (ng/ml) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 0,2ppm e 2ppm de fenol.....	73
Figura 34. Valores médios±EPM das concentrações de sódio plasmático (mEq/ml) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 0,2ppm e 2ppm de fenol.....	74
Figura 35. Valores médios±EPM das concentrações de potássio plasmático (mEq/ml) de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 0,2ppm e 2ppm de fenol.....	75
Figura 36. Valores médios±EPM das concentrações de HSP70 (OD) no tecido hepático de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 0,2ppm e 2ppm de fenol.....	76
Figura 37. Valores médios±EPM das concentrações de HSP70 (OD) no tecido branquial de <i>B. cephalus</i> nos grupos controle e exposto à 0,2ppm e 2ppm de fenol.....	77
Figura 38. Bandas da HSP70 no fígado utilizadas para maximização da concentração dos anticorpos.....	78
Figura 39. Bandas da HSP70 no brânquia utilizadas para maximização da concentração dos anticorpos.....	78
Figura 40. Bandas da HSP70 no fígado de alguns exemplares de <i>B. cephalus</i> exposto ao fenol. CONT (Controle) e CP(Controle positivo).....	79
Figura 41. Bandas da HSP70 nas brânquias de alguns exemplares de <i>B. cephalus</i> exposto ao fenol. CONT (Controle) e CP(Controle positivo).....	79
Figura 42. Alterações Metabólicas Induzidas Pela Exposição Ao Fenol.....	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Dados de CL-50 do fenol para diversas espécies.....	19
TABELA 2.- Sobreviventes de <i>B. cephalus</i> submetidos ao teste de toxicidade.....	42
TABELA 3. Valores médios da qualidade da água durante o teste de toxicidade (CL ₅₀ -96h) para <i>B. cephalus</i>	44
TABELA 4. Valores médios \pm EPM dos parâmetros hematológicos de <i>B. cephalus</i> exposto ao fenol.....	45
TABELA 5. Atividade de enzimas e intermediários metabólicos do tecido hepático de <i>B. cephalus</i> exposto ao fenol.....	50
TABELA 6. Atividade de enzimas e intermediários metabólicos do tecido muscular de <i>B. cephalus</i> exposto ao fenol.....	46
TABELA 7. Atividade de enzimas e intermediários metabólicos do plasma de <i>B. cephalus</i> exposto ao fenol.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓFICO
ALAT	ALANINA AMINOTRANSFERASE
ASAT	ASPARTATO AMINOTRANSFERASE
ATP	ADENOSINA TRIFOSFATO
CAT	CATECOL
CBG	GLOBULINAS QUE SE LIGAM AO CORTISOL (CORTISOL BINDING GLOBULINS)
CHCM	CONCENTRAÇÃO DE HEMOBLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA
CL-50	DOSE LETAL PARA 50% DA POPULAÇÃO
CNE	COLESTEROL NÃO ESTERIFICADO
CR	RECEPTOR DE CORTICOESTEROIDES
DNA	ÁCIDO DEOXIRIBONUCLEÍCO
DNB	DOMÍNIO QUE SE LIGA AO DNA (DNA BINDING DOMAIN)
DNP	DINITROFENOL
EPM	ERRO PADRÃO DA MÉDIA
EROD	ATIVIDADE 7-ETOXIRESUFURINA-O-DEETILASE
FAC	FOSFATASE ÁCIDA
FALC	FOSFATASE ALCALINA
G6PDH	GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE
GAS	SÍNDROME GERAL DE ADAPTAÇÃO
GDH	GLUTAMATO DESIDROGENASE
GRE	ELEMENTOS RESPONSIVOS AOS GLUCOCORTICOIDES
GSH	GLUTATIONA REDUZIDA
GSH-Px	GLUTATIONA PEROXIDADE
GSI	ÍNDICE GONADOSOMÁTICO
Hb	HEMOGLOBINA
HCM	HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA
HK	HEXOQUINASE
HQ	HIDROQUINONA
HSE	HEAT SHOCK ELEMENTS
HSF	HEAT SHOCK FACTOR (FATOR DE TRANSCRIÇÃO DA HSP70)
HSP	HEAT SHOCK PROTEIN
HSP70	HEAT SHOCK PROTEIN, FAMÍLIA DE 70 kD
HSP90	HEAT SHOCK PROTEIN, FAMÍLIA DE 90 kD
LDH	LACTATO DESIDROGENASE
MDH	MALATO DESIDROGENASE
MnSOD	SUPER ÓXIDO DISMUTASE DEPENDENTE DE MANGANÊS
mRNA	RNA MENSAGEIRO
NADH	NICOTIDIAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO FORMA REDUZIDA
PAH	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
PAPS	3'-FOSFOADENOSINA 5'FOSFOSULFATO

PCP	PENTACLOROFENOL
PG	FENIL GLUCORONIDEO
PK	PIRUVATO QUINASE
PMSF	FENILMETILSULFONILFLUORETO
PPM	PARTES POR MILHÃO
PS	FENIL SULFATO
RBC	CONTAGEM DE CÉLULAS VERMELHAS
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEÍCO
ROS	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
SDH	SUCCINATO DESIDROGENASE
SDS	DODECIL SULFATO DE SÓDIO
StAR	PROTEÍNA DE ESTEROIDOGÊNESE AGUDA
TBS	TAMPÃO TRIS SÓDIO
TCA	ÁCIDO TRICLOROACÉTICO
VCM	VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO
β-NF	BETA NAFTOFLAVONA

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações Gerais.....	1
1.2 Conceito De Estresse.....	2
1.3 Indicadores De Estresse.....	4
1.4 Toxicidade Dos Fenóis.....	9
1.5 Mecanismos De Desintoxicação.....	16
1.6 Testes De Toxicidade.....	17
1.7 <i>Brycon Cephalus</i>	19
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Desenho Experimental.....	24
3.1.1 Teste de toxicidade – CL ₅₀ /96h.....	24
3.1.2 Primeiro Experimento de Exposição Ao Fenol.....	25
3.1.3 Segundo Experimento de Exposição Ao Fenol.....	25
3.2 Parâmetros De Qualidade De Água.....	26
3.2.1 Temperatura, pH, Condutividade e Oxigênio.....	26
3.2.2 Dureza.....	26
3.2.3 Alcalinidade.....	26
3.2.4 Amônia.....	27
3.2.5 Nítrito.....	27
3.2.6 Fenol.....	27
3.3 Parâmetros Hematológicos e íons plasmáticos.....	28
3.3.1 Hematócrito.....	28
3.3.2 Hemoglobina total.....	28
3.3.3 Metahemoglobina.....	28
3.3.4 Contagem de eritrócitos (RBC)	29
3.3.5 Volume corpuscular médio (VCM)	30
3.3.6 Hemoglobina corpuscular média (HCM)	30
3.3.7 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).....	30
3.3.8 Sódio e Potássio.....	30
3.3.9 Cloreto.....	30
3.4 Intermediários metabólicos em tecidos e plasma.....	31
3.4.1 Glicose, lactato, piruvato, amônia e amino ácidos livres.....	31
3.4.2 Glicogênio.....	33
3.4.3 Proteínas Solúveis nos tecidos.....	34
3.5 Determinações enzimáticas no fígado, músculo branco e plasma.....	34
3.5.1 Preparação dos estratos para os ensaios enzimáticos.....	34
3.5.2 Fosfatase ácida (FAC).....	35
3.5.3 Fosfatase alcalina (FALC).....	35
3.5.4 Desidrogenases.....	36
3.5.4.1 Lactato desidrogenase (LDH).....	36
3.5.4.2 Malato desidrogenase (MDH).....	36
3.5.4.3 Glutamato desidrogenase (GDH).....	36
3.5.5 Alanina amino transferase (ALAT).....	37
3.5.6 Aspartato amino transferase (ASAT).....	37
3.5.7 Piruvato Quinase (PK).....	38
3.6 Proteína no homogeneizado dos tecidos.....	38
3.7 Indicadores de estresse.....	38
3.7.1 Cortisol Plasmático.....	38
3.7.2 Glicose Plasmática.....	39
3.7.3 HSPs.....	39
3.8 Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Teste de Toxicidade – CL ₅₀ /96h.....	42
4.2 Primeiro experimento de exposição ao fenol.....	42

4.2.1 Parâmetros Hematológicos.....	42
4.2.1.1 Hematócrito.....	42
4.2.1.2 Hemoglobina Total.....	43
4.2.1.3 Metahemoglobina.....	43
4.2.1.4 Contagem de Eritrócitos (RBC).....	43
4.2.1.5 Volume Corpuscular médio (VCM)	43
4.2.1.6 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	46
4.2.1.7 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	46
4.2.1.8 Sódio.....	46
4.2.1.9 Cloretos.....	47
4.2.2 Intermediários metabólicos.....	48
4.2.2.1 Fígado.....	48
4.2.2.1.1 Glicose.....	48
4.2.2.1.2 Lactato.....	49
4.2.2.1.3 Piruvato.....	49
4.2.2.1.4 Amônia.....	49
4.2.2.1.5 Amino Ácidos Livres.....	52
4.2.2.1.6 Glicogênio.....	52
4.2.2.1.7 Proteína Total.....	54
4.2.2.2 Músculo Branco.....	54
4.2.2.2.1 Glicose.....	54
4.2.2.2.2 Lactato.....	55
4.2.2.2.3 Piruvato.....	56
4.2.2.2.4 Amônia.....	56
4.2.2.2.5 Amino Ácidos livres.....	56
4.2.2.2.6 Glicogênio.....	58
4.2.2.2.7 Proteína Total.....	58
4.2.2.3 Plasma.....	59
4.2.2.3.1 Glicose.....	59
4.2.2.3.2 Lactato.....	60
4.2.2.3.3 Piruvato.....	60
4.2.2.3.4 Amônia.....	60
4.2.2.3.4 Amino ácidos livres.....	61
4.2.2.3.4 Proteína Total.....	61
4.2.3 Enzimas.....	62
4.2.3.1 Fígado.....	62
4.2.3.1.1 FAC.....	62
4.2.3.1.2 FALC.....	62
4.2.3.1.3 LDH.....	63
4.2.3.1.4 MDH.....	63
4.2.3.1.5 GDH.....	63
4.2.3.1.6 ALAT.....	63
4.2.3.1.7 ASAT.....	64
4.2.3.1.8 PK.....	65
4.2.3.2 Músculo Branco.....	65
4.2.3.2.1 LDH.....	65
4.2.3.2.2 MDH.....	67
4.2.3.2.4 ALAT.....	67
4.2.3.2.5 ASAT.....	67
4.2.3.2.6 PK.....	67
4.2.3.3 Plasma.....	69
4.2.3.3.1 FAC.....	69
4.2.3.3.2 FALC.....	69
4.2.3.3.3 LDH.....	70
4.2.3.3.4 ALAT.....	70
4.2.3.3.5 ASAT.....	71
4.3 Segundo experimento de exposição ao fenol.....	71

4.3.1 Indicadores de estresse.....	71
4.3.1.1 Glicose plasmática.....	71
4.3.1.2 Cortisol.....	72
4.3.1.3 Potássio Plasmático.....	72
4.3.1.4 Sódio Plasmático.....	74
4.3.1.5 HSP70.....	75
5. DISCUSSÃO.....	80
5.1 Teste de Toxicidade CL ₅₀ /96h.....	80
5.2 Primeiro experimento de exposição ao fenol.....	81
5.2.1 Parâmetros hematológicos.....	81
5.2.2 Metabolismo intermediário.....	84
5.3 Segundo experimento de exposição ao fenol.....	89
5.3.1 Indicadores de estresse.....	89
5.3.1.1 Glicose e Cortisol.....	89
5.3.1.2 HSP70.....	94
5.3.1.3 Balanço iônico.....	96
6. CONCLUSÕES.....	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
8. ANEXOS.....	119

“Todo pensamento emite um lance de dados.”
Mallarmé

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Devido às constantes variações do ambiente os animais podem ser submetidos a diversos fatores ambientais adversos. Muitos desses fatores podem ameaçar a manutenção da homeostase e, portanto, levar os peixes a um estado de “estresse” (BARTON, 1997).

Fatores como manuseio, estocagem, transporte, temperatura, pH, qualidade de água e a presença de tóxicos são conhecidos na literatura como capazes de levar os peixes a uma situação de “estresse” (URBINATI, 2004; IWAMA et al., 2004; BARTON, 2002; VIJAYAN et al., 1997; ROCHE & BOGÉ, 1996). Sendo assim, quando consideramos os peixes tanto em seu habitat natural como nas pisciculturas, esses fatores podem certamente causar mortalidade. Isso torna importante não só o controle desses fatores, mas também o conhecimento aprofundado sobre como eles são capazes de afetar a fisiologia e, por conseqüência, a saúde dos peixes.

Diversos tipos de poluentes podem atuar como tóxicos que causam “estresse” (HONTELA, 1997) e o homem despeja muitas destas substâncias no meio ambiente, sendo várias delas nocivas a todos os seres vivos. Essas substâncias podem ser de natureza química diversa e provocar muitos efeitos no metabolismo dos animais expostos a elas. Essas substâncias tóxicas, que têm sua origem fora do organismo, são os denominados xenobióticos.

Dentre os vários xenobióticos os compostos aromáticos podem apresentar variados efeitos tóxicos para os peixes. Uma classe de compostos aromáticos importantes, em termos de poluição, são os fenóis. Esses compostos estão presentes em efluentes industriais de diversos tipos, como: refinarias de carvão, indústrias de

beneficiamento de madeira, indústrias farmacêuticas, produtoras de papel, refinarias de petróleo; além de outras (KUMARAN & PARUCHURI, 1997). Além disso, o fenol é um produto intermediário do metabolismo do benzeno, outro composto aromático freqüentemente encontrado em efluentes industriais, encontrado principalmente em processos ligados aos combustíveis fósseis (ROCHE & BOGÉ, 2000).

A resolução CONAMA número 20 (BRASIL, 1986) regulamenta uma série de substâncias, determinando a concentração máxima das mesmas de acordo com as diferentes classes de água. Para o fenol a concentração máxima permitida em águas da classe I, que são as destinadas à conservação da vida aquática, é de 0,001 mg/L. O relatório sobre a qualidade dos corpos de água do Estado de São Paulo, realizado pela CETESB (2003), referente ao ano de 2001, mostra que o fenol está presente em concentrações acima desta permitida por lei. Já nos Estados Unidos da América, mais de três bilhões de libras de fenol são produzidos por ano (SRI, 1988).

1.2 Conceito de estresse

O conceito de “estresse” citado no primeiro parágrafo é apenas um dos existentes, uma outra abordagem para esse conceito é: “um estado produzido por um ou outro fator ambiental que leva a resposta adaptativa para além de sua amplitude normal e/ou atrapalha o funcionamento normal de uma forma em que, em ambos os casos, as chances de sobrevivência são significativamente reduzidas” (BRETT, 1958). Entretanto, a idéia de que o estresse é sempre danoso para o animal é controversa (BARTON, 1997). Essas são apenas duas das possíveis definições de estresse. Muitas vezes, o estado de estresse acaba sendo definido por seus indicadores (cortisolemia, glicemia) e enquanto alguns autores consideram a resposta a um estímulo como o estado de estresse outros o definem como o estímulo em si. Não há um conceito

formalizado que seja universalmente aceito. Em 1936, SELYE observou que as respostas a certos estímulos não eram específicas, mas similares. Anos depois ele propôs o conceito da Síndrome Geral de Adaptação (GAS)(SELYE, 1950), que tem três estágios: um primeiro momento de alarme seguido de um período de resistência, enquanto o animal se ajusta a nova situação e batalha para readquirir a homeostase. Por fim, se o animal não consegue suportar o estresse ele entra numa terceira fase, geralmente caracterizada pela exaustão, que pode levar a estados patológicos ou a morte (SELYE, 1973). A GAS já foi defendida e rejeitada várias vezes por aqueles que estudam a fisiologia relacionada ao estresse. Muitos autores já demonstraram que as respostas ao nível neuro-endócrino e celular podem variar de acordo com o estressor (MASON, 1971; MAZEAUD & MAZEAUD, 1981), além da variedade de respostas encontradas recentemente para as proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins - HSP's) (IWAMA et al., 1998). De qualquer forma, o conceito da GAS é muito importante por considerar o estado de estresse como um desvio de um estado metabólico normal ou da homeostase (PICKERING, 1981).

DARWIN (1859) ao elaborar o conceito de seleção natural disse que o ambiente muda constantemente e, por isso, apresenta um desafio e “estressa” os seres vivos. Assim, somente os animais que têm a habilidade de lidar com esses desvios seriam capazes de sobreviver e, portanto, as experiências de “estresse” atuariam como pressões seletivas. Nesse sentido vale a pena ressaltar que, independentemente do conceito utilizado, as respostas relacionadas ao estresse são, em geral, respostas adaptativas que auxiliam os animais a lidar com situações adversas. Por outro lado, a contínua exposição à estressores pode comprometer o funcionamento do organismo a longo prazo e, eventualmente, levar a mortalidade.

1.3 Indicadores de estresse

Historicamente, um dos primeiros marcadores utilizado para determinar o estado de estresse foi o lactato plasmático. Entre 1970 e 1980 as alterações nos eletrólitos e na glicemia passaram a ser utilizados como indicadores na aqüicultura (CHAVIN & YOUNG, 1970; MILES et al., 1974; NIKINMAA et al., 1983). Com o aumento do conhecimento sobre hormônios esteróides, o cortisol se tornou um dos principais indicadores do estado de estresse (BARTON & IWAMA, 1991). Além desses, alguns trabalhos recentes tentam validar a utilização das Heat Shock Proteins (HSP's) como indicadores de estresse (IWAMA et al., 1998 e 2004; BOONE & VIJAYAN, 2002).

O cortisol é o corticoesteróide primário liberado pelo córtex adrenal. Esse hormônio é sintetizado à partir do colesterol. Sua síntese ocorre nas células esteroidogênicas, que, nos peixes, diferentemente dos mamíferos, não formam uma glândula adrenal discreta, mas sim, estão espalhadas na região do rim cefálico; principalmente ao longo da veia cardinal posterior e suas ramificações (MOMMSEN et al., 1999). Sua síntese envolve uma série de reações que estão sumarizadas na figura 1.

A secreção do cortisol é controlada principalmente pela ação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é liberado pela glândula pituitária anterior. Dentre os fatores que controlam a liberação de ACTH estão: outros hormônios, estresse (SUMPTER et al., 1986) e o próprio cortisol exercendo uma retroação negativa no hipotálamo e na pituitária (MOMMSEN et al., 1999). Hormônios esteróides gonadais como a 11-cetotestosterona podem inibir a produção de cortisol induzida por ACTH no tecido inter-renal (YOUNG et al., 1996).

Uma vez atingida a corrente sanguínea, o cortisol pode ser levado a órgãos alvo, como fígado, músculo e cérebro; onde é capaz de se ligar a seus receptores específicos. Entretanto, no plasma existem globulinas que se ligam ao cortisol (Cortisol Binding Globulins - CBG) e, somente o cortisol livre (não ligado a globulinas), é biologicamente ativo. Em mamíferos 90 a 95% do cortisol plasmático está ligado às globulinas (FLESHER et al., 1995). Nesses animais essas proteínas certamente exercem um papel importante na regulação da ação do cortisol. Nos peixes, essas globulinas também estão presentes, mas sua importância em termos da regulação da ação do cortisol ainda não foi esclarecida (MOMMSEN et al., 1999).

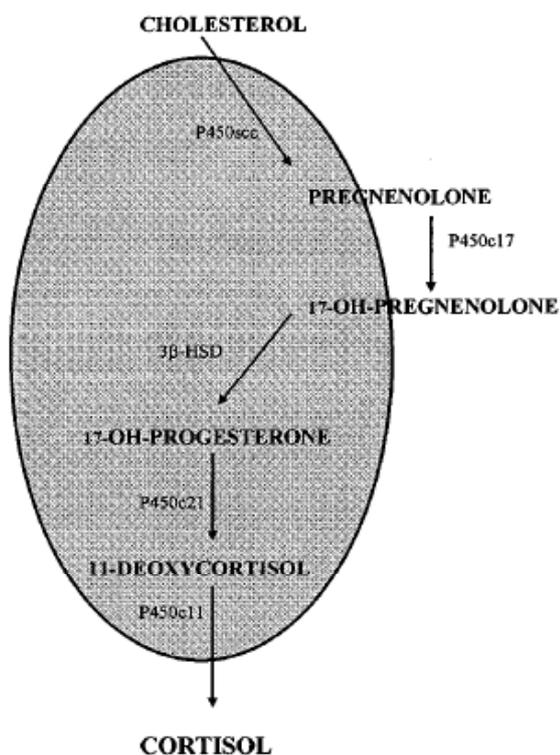


FIGURA 1 Enzimas envolvidas na síntese do cortisol (MOMMSEN et al., 1999).

Os receptores de corticoesteróides (CR) agem como fatores de transcrição quando ligados ao cortisol. Os CR possuem um domínio que se liga ao DNA (Ácido dioxirribonucléico) (DNA Binding Domain - DBD) e esse interage com os elementos

responsivos aos glucocorticóides (GREs), localizados na região 5' dos promotores de genes que são sensitivos a essa classe de hormônios. Existem também algumas evidências de ações não gênicas do cortisol, mas essas ainda não foram bem determinadas. A expressão desses receptores nos variados tecidos é o que os torna alvo de ação dos glucocorticóides (MOMMSEN et al., 1999). O cortisol induz diversas alterações no metabolismo dos peixes. Entre elas estão a produção de glicose através de neoglicogênese e a indução de proteólise. MOMMSEN e colaboradores (1999) fizeram uma extensa revisão sobre os efeitos do cortisol no metabolismo e esta está sumarizada na FIGURA 2.

ROCHE & BOGÉ (1996; 2000) mostraram que a injeção intra-abdominal de fenóis causa uma elevação nos níveis de cortisol de *Dicentrarchus labrax*. Entretanto, esses autores não observaram variações na glicemia. A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta ao fenol também apresenta um aumento na cortisolemia quando exposta a 80% da CL-50/48h. Os níveis de cortisol dessa espécie permaneceram elevados mesmo após 24 horas de exposição (SWIFT, 1981). Nesse trabalho, a glicemia dos peixes também aumentou com 2 e 4 horas de exposição, mas deixou de ser diferente do controle após 7 horas de exposição. Em *Anguilla anguilla* a exposição ao PCP (pentaclorofenol) também causou uma elevação na glicose plasmática (HOLMBERG et al., 1972).

As HSP's foram inicialmente descritas em cromossomos politênicos de moscas da fruta *Drosophila busckii* expostas ao choque térmico (RITOSSA, 1962). Essas proteínas apresentam um alto grau de similaridade em sua seqüência de aminoácidos e foram encontradas em quase todos os seres vivos examinados, das bactérias aos vertebrados (IWAMA et al., 1998). Entre organismos tão evolutivamente distintos como *Escherichia Coli* e seres humanos (*Homo sapiens*) a identidade entre as seqüências de aminoácidos varia entre 42% e mais que 57%, enquanto, por exemplo, para a RNA

polimerase, a semelhança varia entre 22% e 30% (GUPTA & GOLDING, 1993). Como a expressão dessa família de proteínas pode ser induzida pela exposição a outros fatores além do calor, elas são também conhecidas como proteínas do estresse (stress proteins).

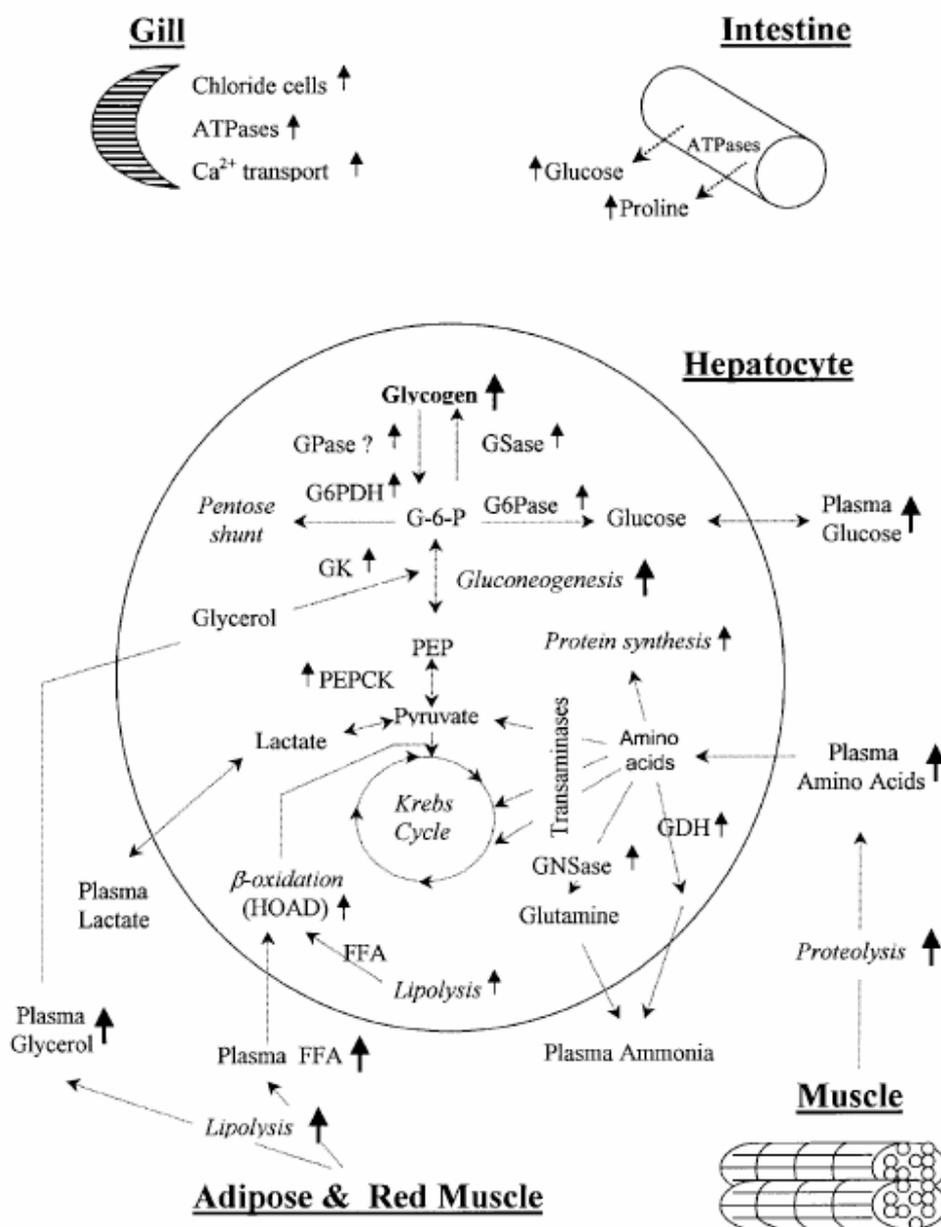


FIGURA 2 Alterações no metabolismo de peixes induzidas pelo cortisol (MOMMSEN et al., 1999). abreviaturas FFA, ácidos graxos livres; HOAD, 3-hydroxiacil-coenzima A desidrogenase; GDH, glutamato desidrogenase; GK, glicerol Quinase; GNSase, glutamina sintetase; GPase, glicogênio fosforilase; GSase, glicogênio sintase; G6Pase, glicose 6-fosfatase; G6PDH, glicose 6-fosfato desidrogenase; PEP fosfoenolpiruvato; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

As HSPs são classificadas de acordo com seu peso molecular. Algumas das famílias conhecidas de HSPs são as de 90 KDa (Kilo Daltons), 70 KDa e 60 KDa sendo respectivamente denominadas como HSP90, HSP70 e HSP60 e de baixo peso molecular (MORIMOTO et al., 1994). Algumas das funções das HSPs incluem o auxílio na formação de conjuntos protéicos, enovelamento adequado, traslocação e a interação entre hormônios e seus receptores específicos (WELCH, 1993). Um exemplo dessa interação é o receptor de cortisol de mamíferos que depende de duas moléculas de HSP90 para funcionar corretamente (MOMMSEN, 1999). As HSP's de baixo peso molecular podem ter funções diversas e já foi proposto que elas atuem como chaperoninas e evitem a formação de corpos de inclusão (DERHAM & HARDING, 1999).

A expressão das HSP70 é regulada por um fator de transcrição específico dessa HSP (Heat Shock Transcription Factor - HSF). Esse se liga a regiões promotoras denominadas "heat shock elements" (HSE). A interação entre o HSF e o HSE leva ao aumento dos níveis intracelulares de HSP70, que numa certa concentração se liga ao HSF e este se desliga do DNA. Assim, a própria proteína atua como reguladora de sua expressão (IWAMA et al., 1998). Como a maioria dos genes de HSP não têm introns, não requer "splicing" e a resposta das HSPs pode ser rápida.

Diversos trabalhos tentaram validar as HSPs como marcadores para a resposta celular ao estresse. Muitos estressores diferentes foram utilizados para tentar verificar se existe expressão das HSP. Dentre eles estão o manuseio (handling) (VIJAYAN, 1997) hipóxia, hiperoxia, estresse de captura, estresse ao frio (cold stress) (ZARATE & BRADLEY, 2003), infecção com bactérias (ACKERMAN & IWAMA, 2001) e o cobre (FENG et al., 2003). Infelizmente, não existe uma resposta consistente

para todos esses estressores. Os trabalhos citados acima mostram que o manuseio (handling), hiperoxia, o estresse de captura e o “cold stress” não induziram a expressão das HSP. Por outro lado, a infecção com bactérias, o cobre e outros contaminantes, além do heat shock, induziram a expressão das Heat Shock Protein. No caso de hipóxia existem dados incongruentes (ZARATE & BRADLEY, 2003; ARAKSINEN, 1998). ALI e colaboradores (1996) mostraram que o choque térmico e a intoxicação com arsenato, mas não com metais pesados induziram a expressão do mRNA [RNA (Ácido ribonucléico) mensageiro] das HSP90s em *Xenopus laevis*. Nesse mesmo estudo os mRNA para HSP70s responderam a todos os estressores, além de demonstrarem uma forte ação sinérgica entre o choque térmico e a intoxicação. Em células da linhagem C6 de ratos a exposição ao fenol levou a expressão da HSP70 40% acima do nível do controle, já o dinitrofenol induziu expressão aproximadamente 100% acima do nível do controle (NEUHAUS-STEINMETZ & RENSING, 1997).

1.4 Toxicidade dos Fenóis

Os fenóis são compostos lipofílicos. A absorção dos clorofenóis se dá principalmente por difusão passiva de formas não dissociadas (KISHINO & KOBAYASHI 1995). Esses autores sugeriram que ocorre a formação de uma ponte de hidrogênio entre o grupo OH dos fenóis e elementos na membrana da brânquia, e que essa interação química desempenha papel relevante no processo de absorção dos clorofenóis. O fato de esses compostos serem lipofílicos permite aos fenóis uma grande capacidade de acumulação em sistemas vivos e, conseqüentemente, potencial para toxicidade crônica e altos níveis de mortalidade. Outro lado importante dessa propriedade é que, uma vez acumulado em um ser vivo, esse xenobiótico pode ir se acumulando cada vez mais ao longo da cadeia trófica. Se considerarmos que os peixes

são o principal alimento de diversas comunidades então esse poluente apresenta um perigo inclusive para as populações humanas (BRADBURY et al., 1989), uma vez que, além de ser comumente encontrado no ambiente marinho, é muitas vezes encontrado nos tecidos de peixes (MUKHERJEE et al., 1990). Após 2 horas da exposição de “goldfish” (*Carassius auratus*) a um meio com 15 ppm de fenol, a concentração encontrada na bexiga era de 214,7 mg/g (KOBAYASHI et al., 1976 apud. NAGEL 1983). Um outro estudo realizado com pentaclorofenol (PCP) mostrou que após uma exposição de 96 horas, a uma concentração de 0,1 ppm, o fígado da enguia européia (*Anguilla anguilla*) apresentou uma concentração de PCP 300 vezes maior do que a ambiental. Nesse mesmo trabalho, traços de PCP ainda foram encontrados no fígado, mesmo após 69 dias de recuperação (HOLMBERG et al., 1972).

Os mecanismos de ação dos compostos fenólicos são múltiplos e muitas vezes antagônicos (ROCHE & BOGÉ, 2000). Esses são freqüentemente considerados espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo capazes de gerar grandes danos celulares, como por exemplo, a oxidação de membranas celulares (PRADHAM et al., 1990) e danos a proteínas (SALVI et al., 2001). Por outro lado, certos fenóis atuam como anti-oxidantes (ROS scavengers) (STICH, 1991). Outros efeitos danosos conhecidos são: genotóxico (JAGETIA & ARUNA, 1997), carcinogênico (TSUTSUI et al., 1997), imunotóxico (TAYSEE et al., 1995), imunossupressão (DUNIER & SIWICKI, 1993), alterações na composição de fosfolipídios da membrana plasmática (KOTKAT, 1999) e ação estrogênica nas células mamárias cancerígenas da linhagem MCF-7 em humanos (*Homo sapiens*) (OLSEN et al., 2002). Alguns fenóis são os principais responsáveis pelos efeitos fisiológicos do benzeno, principalmente, considerando sua hematotoxicidade (BRIVIBA et al., 1993). Os mecanismos metabólicos dessa toxicidade incluem a oxidação e conjugação, somada a uma competição potencial por diversas enzimas.

Além disso, existe a interação dos diversos intermediários metabólicos resultantes dos processos de desintoxicação, que podem incluir outras espécies reativas de oxigênio (WITZ et al., 1996).

A exposição aos fenóis causa várias alterações no metabolismo dos peixes (HOLMBERG et al., 1972; DALELA et al., 1980; GUPTA et al., 1983; REDDY et al., 1993). Em *Notopterus notopterus* a intoxicação por fenol provoca um aumento de 155,58% na atividade da alanina amino transferase (ALAT) de fígado e de 119,98% da aspartato amino transferase (ASAT) de coração (VERMA et al., 1982). GUPTA e colaboradores (1983) também verificaram efeitos do fenol na atividade das transaminases em *N. notopterus*. Nesse peixe a exposição de 15 e 30 dias ao fenol, dinitrofenol (DNP), PCP e misturas desses compostos provocou aumento na atividade da ALAT e ASAT em fígado, rim e brânquia. Esses resultados são um forte indicativo de que esses compostos são capazes de afetar o metabolismo protéico do animal. REDDY e colaboradores (1993) verificaram uma redução de 59,01% nos níveis de proteínas totais em cérebro e músculo de *Channa punctatus* exposto ao fenol. Em *Oreochromis mossambicus* a exposição a concentrações sub-letais de fenol levou a reduções na proteína total que variaram de 7,9% a 45% (RAVICHANDRAN, 1994). Por outro lado, HOLMBERG e colaboradores (1972) encontraram uma redução na atividade da ALAT em músculo e fígado de *Anguilla anguilla* após 8 dias de recuperação a exposição ao pentaclorofenol (PCP). A exposição ao PCP também levou a um aumento nos níveis de proteínas solúveis no tecido hepático em *A. anguilla* (BOSTRÖM & JOHANSSON, 1972). Outras enzimas podem ter suas atividades afetadas pelo fenol. A glutamato desidrogenase (GDH), lactato desidrogenase (LDH) e succinato desidrogenase (SDH) também foram inibidas de forma significativas em cérebro e músculo de *C. punctatus*. A SDH também foi inibida em *N. Notopterus* exposto ao fenol e ao PCP (DALELA et al.,

1980). Os níveis de acetilcolinesterase no cérebro aumentaram de maneira significativa quando comparados com o controle, enquanto no músculo essa enzima não apresentou diferenças (REDDY et al., 1993). A exposição ao PCP afetou as atividades da piruvato quinase (PK) (redução), fumarase (aumento) e citocromo oxidase (aumento) no fígado de *A. anguilla* (BOSTRÖM & JOHANSSON, 1972). Esses autores não observaram nenhuma diferença significativa nas atividades da LDH, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e hexoquinase (HK). Enzimas como a LDH e a GDH são importantes para determinar o efeito de um tóxico como o fenol no metabolismo intermediário, uma vez que representam pontos chave no metabolismo de carboidratos e proteínas respectivamente.

DANGÉ (1986) pode observar uma série de alterações nos níveis de glicose e glicogênio de exemplares de *Oreochromis mossambicus* expostos a doses letais de fenol. Tanto o glicogênio muscular quanto o hepático diminuíram após 96 horas de exposição. Já a glicose plasmática aumenta significativamente após 2 horas de exposição e se manteve assim até 96 horas. REDDY e colaboradores (1993) encontraram redução tanto de glicogênio quanto de glicose em músculo branco e cérebro de *C. punctatus* exposto ao fenol. Em *A. anguilla* exposta ao PCP ocorreu também redução no glicogênio muscular (HOLMBERG et al., 1972). Nesse peixe os níveis plasmáticos de proteína, fosfato inorgânico, triglicérides e lactato aumentaram.

As fosfatases são enzimas que estão relacionadas com a manutenção de diversos processos como a digestão ou a formação dos ossos, e, portanto, sua inibição pode ter impactos grandes na manutenção da homeostase. Além disso, as fosfatases ácidas estão envolvidas com a proliferação de lisossomos, que sequestram os xenobióticos (GILL et al., 1992). Entretanto, devido a sua lipofilicidade os fenóis podem afetar as membranas citoplasmáticas, causando inclusive rompimento das

mesmas em lisossomos e outras organelas. Os lisossomos são caracterizados pela presença de uma série de enzimas hidrolíticas e o extravasamento destas para o interior da célula ou mesmo para o sangue pode causar grandes danos. Por fim, perdas nos estoques de lisossomos podem prejudicar a capacidade do organismo de eliminar os xenobióticos. Os níveis das fosfatases alcalina e ácida se reduziram em *N. notopterus* exposto ao pentaclorofenol e ao fenol (DALELA et al., 1980; GUPTA et al., 1984).

ROCHE & BOGÉ (2000) verificaram que em casos de administração intra-abdominal de fenol em *Dicentrarchus labrax*, os marcadores metabólicos e eritrocitários foram mais sensíveis do que as enzimas antioxidantes. Esses autores observaram a inibição na atividade da fosfatase alcalina e aumento nos níveis de cortisol. Além disso, nos peixes que receberam somente uma única dose houve aumento nos níveis de hemoglobina. A superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) teve sua atividade reduzida quando foi aplicada uma dose única, enquanto as peroxidases apresentaram um aumento em sua atividade quando foram aplicadas doses fracionadas. Em outro trabalho os mesmos autores também verificaram inibição na atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) (ROCHE & BOGÉ, 1996). Essa mesma inibição também foi observada em eritrócitos humanos expostos ao fenol e ao catecol (BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004). Os mesmos autores também verificaram uma redução nos níveis de glutathione reduzida (GSH) e na atividade da glutathione-S-transferase (GST).

Os parâmetros hematológicos também respondem à intoxicação por fenóis. Eritrócitos incubados por uma hora na presença de doses variando entre 5 e 1000 ppm de catecol e fenol mostraram um aumento na porcentagem de metahemoglobina além de um aumento significativo na porcentagem de eritrócitos hemolizados (BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004). STOLZE e colaboradores (1996) demonstram

a indução da formação de metahemoglobina por fenóis com substituições em eritrócitos bovinos. Em *D. labrax*, a exposição a 1/10 da dose letal de fenol causa redução de cerca de 20% no hematócrito (ROCHE & BOGÉ, 1996). Por outro lado, a truta arco-íris apresentou um aumento no hematócrito nas primeiras 24 horas de exposição a 3,0 ppm de fenol, sendo que esse aumento gradualmente desaparece com ao longo da exposição ao fenol (SWIFT, 1981). Quando exposto por 48 horas ao fenol este mesmo peixe apresenta aumento no hematócrito (HALSBAND & HALSBAND, 1963). No entanto, KRISTOFFERSON e colaboradores (1973) não detectaram essa alteração em “pike” (*Esox lucius*) exposto ao fenol por 5 dias e nem SWIFT (1982) na truta exposta a 60% ou 80% da CL_{50-48h} por 4 horas. Em *A. anguilla* a intoxicação com PCP causa um aumento tanto do hematócrito quanto do conteúdo total de hemoglobina e essas alterações se mantêm após 8 dias de recuperação (HOLMBERG, 1972).

Uma diversidade de compostos, entre eles os fenóis, são capazes de afetar as funções endocrinológicas. Esses agentes são conhecidos como desorganizadores endócrinos (endocrine disruptor) (HONTELA, 1997). Existem diversas formas pelas quais um composto pode atuar sobre o sistema endocrinológico. Alguns tóxicos (PAH's e PCB's) emulam hormônios esteróides, outros se ligam aos receptores desses hormônios. Um terceiro efeito possível é a incapacitação da produção de um determinado hormônio. Apesar de existirem evidências de que a exposição a poluentes aumenta o cortisol plasmático (ROCHE & BOGÉ, 2000; HONTELA, 1997; SWIFT, 1981) outros trabalhos mostram que animais expostos a diversos desses poluentes têm uma resposta reduzida quando expostos a um segundo estressor (DORVAL et al., 2002; WALSH et al., 2000; LEBLOND et al., 2000; BRODEUR et al., 1997).

MUKHERJEE e colaboradores (1991) demonstraram inibição da esteroidogênese na carpa comum (*C. carpio*) exposta ao fenol. Esses autores observaram um aumento nos níveis de colesterol não esterificado em diversos órgãos e sugeriram que esse fato é um indicativo da inabilidade do organismo de converter o colesterol em hormônios esteróides. Outros compostos fenólicos são capazes de alterar a resposta dos peixes ao estresse. Diversas formas dos citocromos P-450 participam da síntese do cortisol (FIGURA 1) e, portanto, xenobióticos que têm a capacidade de estimular os P-450 podem interferir diretamente na síntese do cortisol por meio de inibição competitiva. Esse fato já foi demonstrado em aves por LUND & LUND (1995) utilizando 3-metilsufolonil-2,2-bis-(4-clorofenil)-1. Em peixes, WILSON e colaboradores (1998) mostraram que a β -naftoflavona (β -NF), que é um potente indutor do citocromo P-4501A1, aboliu a produção *in-vitro* de cortisol pelas células interrenais. Outros poluentes como os organoclorados, organofosforados, PAH's e metais pesados também exercem esse efeito (LEVESQUE et al., 2003; LEBLOND et al., 2000; NORRIS et al., 1998).

Os possíveis mecanismos de ação dos xenobióticos estão sumarizados na FIGURA 3.

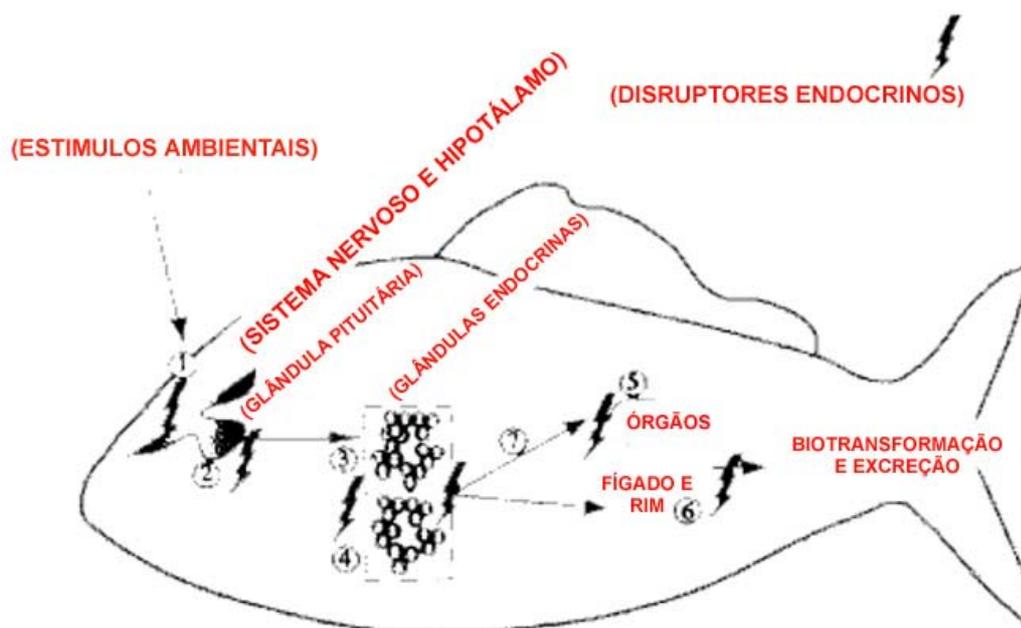


FIGURA 3. Alvos potenciais onde os xenobióticos podem exercer seu efeito inibidor no sistema endócrino dos peixes. 1) Sistema nervoso central; 2) Glândula pituitária; 3) Glândulas endócrinas que dependem da ação estimulatória da pituitária 4) Outras glândulas endócrinas; 5) Órgãos alvo do cortisol e 6) proteínas transportadoras (modificado de HONTELA, 1997).

1.5 Mecanismos de desintoxicação

Os mecanismos envolvidos na eliminação do fenol já foram pesquisados em diversos trabalhos (NAGEL & URICH, 1980; LAYIWOLA & LINNECAR, 1981, NAGEL, 1983). Esses autores demonstraram que os principais produtos excretados pelo organismo após a exposição ao fenol são o fenil glicoronídeo (PG), fenil sulfato (PS) e a hidroquinona sulfato.

A biotransformação do fenol pode ser dividida em duas fases. A fase I envolve processos de hidroxilação e é dependente dos citocromos P-450c. Uma das enzimas que participa desse processo é a 7-etoxiresufurina-O-desetilase (EROD). No caso do fenol, os principais produtos dessa fase são a hidroquinona e o catecol

(SOLEM et al., 2003). Esses dois compostos consistem em um anel benzênico associado a dois grupos hidroxila. LEITÃO e colaboradores (2000) investigaram a concentração do citocromo P-450 em fígado de matrinxã, assim como a atividade da EROD. Apesar de o matrinxã apresentar uma concentração hepática total de citocromo P-450 baixa quando comparada a outros peixes, esses autores observaram uma atividade de EROD consistente com a atividade descrita para peixes ou mesmo para ratos.

A fase II consiste de processos de conjugação os quais visam facilitar a excreção dos tóxicos ou de produtos da fase I. McKIM e colaboradores (1999) não detectaram hidroquinona na urina da truta arco-íris exposta ao fenol, mas sim de PS, PG e o próprio fenol. Uma enzima bem caracterizada que participa desse processo é a fenol sulfotransferase (TONG & JAMES, 2000). Essa enzima catalisa a transferência de um grupo sulfato da 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), formando ésteres sulfatados. Esses autores sugerem que tanto a sulfatação quando a glicoronização são caminhos para desintoxicação dos compostos fenólicos. Os compostos excretados após a exposição ao fenol corroboram essa hipótese. A ação da fenol sulfotransferase pode ser limitada pela disponibilidade do PAPS ou mesmo de sulfato inorgânico. Talvez por isso, a glicoronização se torne a principal via de conjugação para excreção do fenol após 144 horas de exposição (McKIM et al., 1999).

O tecido hepático é um dos principais sítios biotransformação de xenobióticos, porém o rim, intestino e as células vermelhas também apresentam mecanismos bioquímicos para lidar com essas substâncias (SOLEM et al., 2003; ROCHE & BOGÉ, 2000; TONG & JAMES, 2000; McKIN et al., 1999). McKIN e colaboradores (1999) demonstraram que o rim da truta arco-íris apresenta um “clearance” máximo para o fenil sulfato de 30 ml de plasma/h/kg. Já o fígado dessa

mesma espécie apresenta uma taxa de formação de hidroquinona (HQ) e catecol (CAT) que tem uma relação positiva com a dose de fenol injetada no animal. As taxas máximas de formação encontradas para *O. mykiss* são de 6 pmols/min para HQ e 0,32 para o CAT (SOLEM et al., 2003). 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 acumular facilmente nos tecidos adiposos.

1.6 Teste de toxicidade - LC-50/96h

Os testes de toxicidade são uma das maneiras para se investigar qual é o potencial de um determinado tóxico de causar mortalidade. Esses testes podem ser realizados com diversos seres vivos e, muitas vezes, são utilizados para determinar os limites máximos de um poluente no ambiente (AGUIAR, 2002). Os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com sua duração. Existem testes agudos e testes crônicos. Os testes crônicos simulam situações em que ocorre uma exposição a baixas concentrações do xenobiótico por longos períodos. Já os testes agudos têm como objetivo recriar uma situação ambiental em que os animais estão expostos a altas concentrações de um tóxico por um curto intervalo de tempo (AGUIAR, 2002). Os testes de toxicidade aguda permitem o cálculo de um parâmetro que representa a concentração letal de um tóxico para 50% de uma determinada população (CL-50), num período que pode variar entre 48 e 96 horas (ZAGATTO, 2002).

No Brasil, agências governamentais como a CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental) realizam estes testes com várias substâncias tóxicas. Diversas espécies de *Daphnia*, oligoquetos, poliquetos, larvas de insetos, algas e bactérias são utilizadas para estes testes, por terem sido padronizados como bons

indicadores e por sua biologia ser bem conhecida (MAZON, 1997). Dentre os peixes algumas espécies foram selecionadas como bons modelos para testes de toxicidade. “Zebra fish” (*Brachidanio rerio*), “fathead minnow” (*Pimephales promelas*), “red killifish” (*Oryzias latipes*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), “blue gill” (*Lepomis macrochirus*) e “golden orfe” (*Leuciscus idus*) são relacionadas por VITTOZZI & De ANGELIS (1991) como espécies recomendadas pela Organization for Economic Cooperation and Development para classificar substâncias quanto a sua toxicidade ao homem e ao ambiente. A TABELA 1 apresenta dados de CL-50 para fenol presentes na literatura para essas e outra espécies de peixe.

Os xenobióticos podem ser classificados de acordo com sua toxicidade, medida através de sua CL-50/96h, expressa em mg/l (ppm). Segundo essa classificação o fenol tem uma toxicidade leve (VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION, 1996) se considerarmos os dados apresentados acima. Esse dado, no entanto, pode levar a uma sub-estimativa do potencial nocivo desta substância. Tendo em vista a aquicultura, por exemplo, mesmo sem causar mortalidade esse poluente pode ter um grande impacto na produtividade. SAHA e colaboradores (1999) mostraram que a exposição ao fenol causa uma redução no consumo, tamanho médio e comprimento médio em *O. mossambicus*. Além disso, esses peixes apresentaram fecundidade reduzida. Em *L. rohita* a exposição ao fenol resultou em menor ganho médio de peso, menor taxa média de crescimento e menor eficiência na conversão alimentar (RAJASEKHARAN & SHERIEF, 1998).

TABELA 1. Dados de CL-50 do fenol para diversas espécies.

Espécie de Referência	Duração	Valor da CL-50	Referência
Truta Arco-Íris	48 Horas	13,1 mg/l	TISLER & KONCAN, 1997

Truta Arco-Íris	10 Dias	11,6 mg/l	FOGELS & SPRAGUE, 1977
“Zebra Fish”	96 Horas	24,9 mg/l	RANZANI et al., 1986
“Zebra Fish”	10 Dias	29,00 mg/l	FOGELS & SPRAGUE, 1977
Carpa Comum	48 Horas	22,5 mg/l	JIANG & CAO, 1985
Outras Espécies	Duração	Valor da CL-50	Referência
<i>Lebistes reticulatus</i>	94 Horas	47,5 mg/l	GUPTA et al., 1982
<i>Notopterus notopterus</i>	96 Horas	12,53 mg/l	GUPTA et al., 1983
<i>Archaeomysis kokuboi</i>	24 Horas	31,31 mg/l	KIM & CHIN, 1995
<i>Labeo rohita</i>	24 Horas	32,00 mg/l	RAJASEKHARAN & SHERIEF, 1998
<i>Oreochromis mossambicus</i>	96 Horas	28,49 mg/l	SAHA et al., 1999
<i>Oreochromis mossambicus</i>	96 Horas	20,00 mg/l	GHOSH, 1983

1.7 *Brycon cephalus*

O *Brycon cephalus* é um teleósteo de água doce originário da Bacia Amazônica. O gênero *Brycon* pertence à família Bryconidae, ordem Characiforme, superordem Ostariophysi e é popularmente conhecido como matrinxã. Esse animal, ao contrário de outros peixes Amazônicos apresenta boa aceitação de ração comercial e, por isso, hoje existe um interesse crescente no seu cultivo em diversas regiões do Brasil (CASTAGNOLLI, 1992).

O matrinxã é um peixe de piracema e, portanto, apresenta comportamento migratório na época da reprodução, quando faz sua desova no ambiente. A época de desova desse peixe ocorre entre dezembro e fevereiro. No auge de seu desenvolvimento pode chegar a pesar 4 quilos e alcançar maturidade sexual com cerca de três anos de idade. Seu corpo é alongado com uma coloração escura na região dorsal até o pedúnculo caudal. Já a região lateral e a parte ventral apresentam uma cor prateada

intensa. As nadadeiras apresentam-se sempre com uma pigmentação preta marcante. A coloração desse animal varia muito pouco ao longo do seu desenvolvimento de jovem a adulto (ZANIBONI FILHO et al., 1986). É um animal considerado onívoro com uma preferência a herbivoria. A análise do seu trato intestinal revela uma grande quantidade de frutos e inseto (VAL & HONCZARYK, 1995). Quando em cativeiro é comum se observar comportamento de canibalismo durante a fase larval.

Em algumas regiões do Brasil o desmatamento ciliar, as hidroelétricas e a poluição são considerados os principais responsáveis pelo desaparecimento dessa espécie (MENDONÇA, 1996).

A piscicultura, inclusive do matrinxã, é uma área em desenvolvimento no Brasil. No entanto, o consumo de peixes é bastante relevante no país. Em 1997, 5300 toneladas de matrinxã foram capturadas no Brasil, sendo 70% deste valor capturado no estado do Amazonas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 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.



FIGURA 4 Exemplar de *Brycon cephalus*.

“A função primordial da educação e da ciência não é acrescentar mais anos à vida, mas acrescentar mais vida aos anos.”

Joan Osborn

2. OBJETIVOS.

O objetivo da presente dissertação foi avaliar os efeitos do fenol no metabolismo e na fisiologia de *Brycon cephalus* juvenis. Para tanto, foram examinadas as respostas metabólicas do matrinxã exposto ao fenol; as respostas de três indicadores de estresse (cortisol, glicemia e HSPs) e as possíveis interferências que a intoxicação pode causar na capacidade do animal de responder ao estresse.

I accept chaos. I am not sure whether it accepts me. I know some people are terrified of the bomb. But then some people are terrified to be seen carrying a modern screen magazine. Experience teaches us that silence terrifies people the most.
Bob Dylan
You need chaos in your soul to give birth to a dancing star.
Nietzsche

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental

Todos os animais experimentais eram juvenis e foram adquiridos da piscicultura “Águas Claras” – Mococa -SP e permaneceram por um mês em tanques de 2000 L com água aerada, fotoperíodo natural e temperatura controlada à 25°C. Os peixes foram alimentados com ração comercial de 35% de proteína. Após este período, os animais foram transportados para os tanques de testes no quais permaneceram dois dias (CL₅₀ e primeira exposição) ou um mês (segunda exposição) em aclimação ao novo ambiente sendo privados de alimentação 24 horas antes do experimento no caso da CL₅₀ e da primeira exposição.

3.1.1 Teste de toxicidade – CL₅₀-96h

O primeiro experimento foi a determinação da CL₅₀ de 96 horas do fenol em matrinxã. Para isto foram testadas cinco concentrações (1, 5, 10, 25, 50 mg/l) além do controle durante 96 horas de exposição. Este teste foi realizado em caixas de 250 L com 10 peixes em cada uma, em um sistema semi-estático, com aeração constante, temperatura controlada de 23°C, fotoperíodo natural e privação de alimentação. Durante este teste, foram analisados os parâmetros de qualidade de água a cada 12 horas. A cada 24 horas foram coletados os animais mortos e as quantidades registradas para posterior cálculo de CL₅₀. Devido à volatilidade do fenol (ver FIGURA no Anexo

1) a água do sistema era renovada a cada 12h para que o fenol pudesse ser repostado nas concentrações testadas.

3.1.2 Primeiro experimento de exposição ao fenol

Para este experimento foram utilizados 40 exemplares de matrinxã, ($19,93 \pm 0,2290$ em comprimento e $112,6 \pm 4,174$ em peso) os quais estavam divididos igualmente em quatro lotes em tanques de 250 L. Os animais foram privados de alimentação 24 horas antes da exposição, permanecendo sob fotoperíodo natural, aeração constante, temperatura controlada de 25°C , e, em seguida, expostos por 96 horas a 2 ppm (mg/l) de fenol (10% da CL_{50}). Os parâmetros de qualidade de água (descritos mais abaixo) foram medidos a cada 24 horas. Após as 96 horas de exposição, o sangue dos animais foi retirado com seringas heparinizadas e logo após, os animais foram sacrificados para a retirada dos tecidos: fígado e músculo branco, sendo esses utilizados para análises posteriores. O sangue foi utilizado como sangue total ou como plasma.

3.1.3 Segundo experimento de exposição ao fenol

Para esta exposição foram utilizados 180 exemplares de matrinxã ($14,06 \pm 0,14$ em comprimento e $34,17 \pm 1,28$ em peso), divididos em 9 tanques, cada um com 20 animais (Três tratamentos com três repetições). Esses animais permaneceram nesses tanques em condições constantes (temperatura, pH, fotoperíodo) por um mês para aclimação. Após este período foi realizada uma coleta, retirando-se 3 peixes de cada tanque. Essa coleta foi utilizada como controle negativo para o estresse (Oh). Em seguida, 2 ppm de fenol foram adicionados a três tanques e 0,2 ppm a outros três. Os três tanques restantes permaneceram como controle para a exposição ao fenol. Após 96

horas de exposição três peixes de cada tanque foram coletados (96h) e os peixes restantes foram submetidos a um estresse de manuseio (net stress) e em seguida colocados em tanques com água na mesma temperatura e livre de fenol. Os animais permaneceram nesses tanques por 24 horas, sendo realizadas coletas 1 (1h), 6 (6h), 12 (12h) e 24 (24h) horas após o estresse. O experimento foi realizado em triplicatas. Todas as coletas seguiram os mesmos procedimentos descritos acima.

3.2 Parâmetros de qualidade de água

3.2.1 Temperatura, pH, condutividade e oxigênio

Estes valores foram determinados eletrometricamente com o uso do Check Mate II Corning, sendo as leituras efetuadas no próprio tanque de teste.

3.2.2 Dureza

Para as medidas de dureza foi utilizada a titulação das amostras, previamente tamponadas com EDTA, até o ponto de viragem de lilás para azul com o indicador Eriocromo Negro. As determinações foram feitas segundo a APHA (1980). Para o cálculo da dureza em mg CaCO₃/L foi utilizada a seguinte fórmula:

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

onde F= 1,001

3.2.3 Alcalinidade

Para as medidas, foram utilizados um pH-metro e um titulador. As determinações foram efetuadas segundo as técnicas descritas por GOLTERMAN & CLYMO (1969), utilizando-se o ácido sulfúrico 0,01 N como indicador da alcalinidade,

para titular até o pH 4,00. Para o cálculo da alcalinidade das amostras, em mg /L de carbonatos e bicarbonatos foi utilizada da seguinte fórmula:

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

onde N = normalidade do ácido sulfúrico.

3.2.4 Amônia

A amônia foi quantificada por nesslerização (modificado de GENTZKOW & MASEN, 1942), onde foram utilizados um volume de 2,0 mL da água, adicionando-se 0,5 mL de reativo de Nessler. A leitura óptica foi realizada em 420 nm. A concentração de amônia foi estimada contra um padrão de amônia contendo 100 nmols.

3.2.5 Nitrito

O nitrito foi determinado segundo TAVARES (1994). Para as determinações foi utilizado um volume de 5 mL de água. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de sulfanilamida (58,07 mM), agitando-se a amostra e esperando por 10 minutos. Após este período, foram adicionados 100 µL de solução de bicloridrato N-1 Naftilenodiamina (3,86 mM) e o produto de reação de coloração rosa escuro foi determinado colorimetricamente 540 nm. A concentração de nitrito foi estimada a partir de um padrão de nitrito contendo 50 nmols.

3.2.6 Fenol

As concentrações de fenóis na água foram determinadas utilizando a reação dos compostos fenólicos com a aminoantipirina na presença de ferricianeto de potássio em pH 7,9 (APHA, 1980). A 100 ml de amostra eram adicionados de 2,5 mL de NH₄OH e em seguida o pH era acertado com tampão fosfato. Após 15 minutos de

descanso, 1 mL de 4-aminoantipirina e 1 mL de ferricianeto de potássio eram adicionados às amostras. O produto final avermelhado era lido em 500nm contra um branco contendo água destilada.

3.3 Parâmetros Hematológicos e íons plasmáticos

3.3.1 Hematócrito:

Para determinação do hematócrito foram utilizados microcapilares, que uma vez preenchidos com uma amostra de sangue, foram vedados com massa de modelar e centrifugados a 10000 X g por três minutos. Os valores, em porcentagem foram determinados a partir de um cartão de leitura de hematócrito.

3.3.2 Hemoglobina total:

Os níveis de hemoglobina total foram determinados utilizando a solução de Drabkin (KCN, KH₂PO₄, K₃[Fe (CN)₆]). Dez µL de sangue foram adicionados a dois ml dessa solução. Os tubos foram devidamente agitados para se obter uma boa mistura. A densidade óptica foi medida utilizando um espectrofotômetro, em 540 nm, contra um branco contendo somente a solução de Drabkin (DRABKIN, 1948).

Os valores de hemoglobina total foram determinados pela expressão matemática:

$$\text{Hb total (gHb/dL)} = \text{densidade óptica} \times 1,6114/11 \times \text{diluição.}$$

3.3.3 Metahemoglobina

A porcentagem de metahemoglobina foi determinada segundo o método de MATSUOKA (1997). Uma alíquota de 6 µL de sangue foi misturada a 1,2 mL de água destilada e deixada em repouso por 2 minutos. Após este procedimento foram adicionados 600 µL de tampão fosfato (0,1M, pH 6,8) e todo o conteúdo centrifugado a

500 X g por 2 minutos. O sobrenadante foi utilizado na determinação da metahemoglobina. Para tal, foram realizadas quatro medidas de densidade óptica em 563 nm:

1) A densidade óptica de 600 µL do sobrenadante, denominada A₁.

2) A este sobrenadante foram adicionados 4 µL de KCN 0,9 M, os tubos foram agitados e o conteúdo lido após 30 segundos. Esta leitura é denominada A₂. Estas determinações foram feitas contra um branco de água. As determinações A₃ e A₄ foram feitas contra um branco de água e 60 µL de K₃Fe(CN)₆.

3) A determinação A₃ foi feita utilizando-se 600 µL de sobrenadante e 60 µL de K₃Fe(CN)₆ após reação por 2 minutos.

4) A determinação A₄ foi feita utilizando-se o produto da A₃ adicionado de 4 µL de KCN deixando-se agir por 30 segundos.

Para o cálculo da porcentagem de metahemoglobina foi utilizada a expressão:

$$\text{MetaHb}\% = \frac{(A_2 - A_1) \times 100}{(A_4 - A_3) \times 1,1}$$

3.3.4 Contagem de eritrócitos (RBC):

A contagem de eritrócitos foi feita utilizando a câmara de Neubauer. Para isso utilizamos 10 µL de sangue misturados a 2 ml de solução de citrato formol. Essa mistura foi colocada na lâmina que possui divisões, formando quadrados. Fizemos uso de cinco grupos de quadrados, que são subdivididos em 16 quadrados menores, o que nos deu um total de oitenta quadrados contados. Os valores foram obtidos através da

soma dos cinco grupos de quadrados. Esses, que têm 0,1 mm³, foram convertidos para milhões por 1 mm³, levando em conta a diluição (LIMA, 1969).

3.3.5 Volume corpuscular médio (VCM)

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

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

3.3.6 Hemoglobina corpuscular média (HCM)

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

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

3.3.7 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

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

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

3.3.8 Sódio e Potássio

As concentrações de sódio e potássio no plasma foram determinadas através de um fotômetro de chama (Digimed). As amostras de plasma eram diluídas 100 vezes em água destilada e lidas contra um padrão 100 mEq de sódio de 20 mEq de potássio.

3.3.9 Cloreto

As concentrações de cloreto plasmático foram determinadas utilizando um kit LabTest. O princípio dessa determinação de baseia na reação dos cloretos com o tiocianato de mercúrio (BURTIS & ASHWOOD, 1994). Uma alíquota de 10 μ L de amostra era colocada em duplicata em uma “microplate” e depois adicionadas de um reagente e de um ativador, ambos fornecidos no Kit. As concentrações de cloreto foram determinadas espectrofotometricamente em 505 nm utilizando um microplate reader (Termomax®, Molecular Devices).

3.4 Intermediários metabólicos em tecidos e plasma:

3.4.1 Glicose, lactato, piruvato, amônia e aminoácidos livres:

Os tecidos a serem analisados (fígado e músculo branco) foram homogeneizados em um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem a 1000 rpm por 3 minutos em banho de gelo e adicionados de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% ou água na proporção de 1 ml para cada 100 mg de tecido. O homogeneizado foi centrifugado por 3 minutos a 10000 X *g* e o sobrenadante foi utilizado nas determinações de intermediários, sendo o precipitado descartado. Para as determinações plasmáticas foram utilizados 100 μ L plasma em 1 ml de TCA 20% ou plasma total.

a) Glicose:

O conteúdo de glicose no plasma e tecidos foi determinado utilizando-se um Kit LabTest. Foram utilizados o plasma total ou extratos dos tecidos homogeneizados em água destilada. Esse ensaio de baseia na reação catalisada pela glicose oxidase. O

gluconato, produto dessa reação reage com um componente do coquetel fornecido pelo Kit e gera uma cor rósea (TRINDER. 1969). Uma alíquota de 10 μ L era colocada na placa e depois eram adicionados 200 μ L do reagente fornecido pelo fabricante. A concentração de glicose foi determinada espectrofotometricamente em 505 nm utilizando um “microplate reader” (Termomax®, Molecular devices).

b) Lactato:

Os níveis de lactato foram determinados utilizando o método descrito por HARROWER & BROWN (1972). Um volume apropriado de amostra era adicionado a um meio de reação contendo 20 μ L de $\text{CuSO}_4(\text{H}_2\text{O})$ 4%. A seguir 3,5 ml de ácido sulfúrico concentrado eram lentamente adicionados ao tubo de ensaio. Os tubos eram agitados e fervidos durante 5 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, eram adicionados 80 μ L de p-Fenilfenol (1,5 g de p-fenilfenol em 100 ml de solução aquosa de NaOH 2%). Os tubos eram então agitados em vortex e mantidos em repouso por 1 hora. Passado esse período, as amostras eram novamente fervidas por 90 segundo para retirar o excesso de p-fenilfenol. Novamente as amostras eram resfriadas em gelo e a leitura feita em espectrofotômetro a 570 nm. As concentrações de lactato foram determinadas utilizando-se um padrão de lactato contendo 20 nmols.

c) Piruvato:

Os níveis de piruvato foram determinados utilizando o método descrito por LU (1939). Um volume apropriado de amostra era adicionado a um meio de reação contendo 250 μ L de dinitrofenilhidrazina 0,1% (em HCl 2N). Os tubos eram mantidos por 30 minutos em banho a 37°C. Após esse período eram adicionados 3 ml de NaOH 1,3N. Os tubos eram então resfriados e a leitura feita em espectrofotômetro foi feita a 440 nm. As concentrações de piruvato foram determinadas utilizando um padrão de piruvato contendo 100 nmols.

d) Amônia

A amônia foi determinada por nesslerização (GENTZKOW & MASEN, 1942). Um volume adequado de extrato era transferido para um tubo com água destilada em um volume final de 2,0 mL e em seguida adicionado de 0,5 mL de reativo de Nessler. A leitura óptica era realizada em 420 nm. As concentrações de amônia foram estimadas contra um padrão de amônia contendo 100 nmols.

e) Aminoácidos livres

Os níveis de aminoácidos livres no plasma e nos tecidos foram determinados pela metodologia descrita por COPLEY (1941), que se baseia na reação dos aminoácidos com a nihidrina. Os extratos em água destilada ou plasma total eram misturados em tubos de ensaio com 2 ml de nihidrina 0,1% (em propanol), vedados e incubados por 30 minutos a 40°C. A leitura era feita em espectrofotômetro (BECKMAN DU®520) em 570 nm e a glicina era utilizada como padrão.

3.4.2 Glicogênio:

Os níveis de glicogênio foram determinados utilizando-se o método descrito por BIDINOTTO et al (1997). Porções dos tecidos, pesando entre 50 e 100 mg eram transferidas para tubos de ensaio e misturadas com 1,0 ml de KOH 6,0N. Os tubos eram colocados em banho-maria, a 100°C, por cinco minutos. Esse processo provoca a digestão alcalina dos tecidos. Em seguida 250 µL desse extrato eram transferidos para outros tubos em que eram adicionados 3,0 ml de etanol e 100 µL de K₂SO₄ 10% e, posteriormente, agitados. Os tubos eram então centrifugados, os sobrenadantes eram descartados e o precipitado foi resuspenso em água destilada. O teor de açúcares

reduzidos totais foi determinado nessa solução utilizando-se o método de DUBOIS et al (1956) utilizando-se um padrão contendo 100 nmols de glicose. As concentrações de glicose foram expressas em μmols de glicosil-glicose/g de tecido.

3.4.3 Proteínas solúveis nos tecidos

Após a homogeneização em água e posterior centrifugação, os sobrenadantes eram diluídos apropriadamente de acordo com o tecido. Uma alíquota de 10 μL do homogenato foi utilizada para determinação do conteúdo de proteína total nos tecidos. As amostras eram pipetadas nos poços de uma “microplate” e em seguida 200 μL do reagente de Bradford eram adicionados. Esse reagente consiste de uma mistura do pigmento Comassie Brilliant Blue diluído em Etanol P.A e ácido fosfórico (KRUGER, 1994). Em cada placa juntamente com as amostras era realizada uma curva padrão de caseína. A concentração de proteína foi determinada espectrofotometricamente em 520 nm, utilizando um “microplate reader” (Termomax®, Molecular devices).

3.5 Determinações enzimáticas no fígado, músculo branco e plasma

3.5.1 Preparação dos extratos para os ensaios enzimáticos

Ao fígado ou músculo branco era adicionado na relação de 1 ml para cada 100 mg de tecido um tampão de homogeneização, composto de fosfato de sódio 10 mM e glicerol 50% (v/v), ajustado para o pH 7,0. Uma quantidade apropriada de tecido era então homogeneizada utilizando-se um homogeneizador Potter-Elvehjem a 1000 rpm por 1 minuto em banho de gelo. O homogeneizado era então centrifugado por 3 minutos a 600 X g à 0°C, descartado o sedimento, o sobrenadante era novamente centrifugado, só que a 6000 X g durante 8 minutos também à 0°C. Uma quantidade apropriada do sobrenadante era utilizada como fonte de enzima.

O plasma foi utilizado integralmente para as determinações enzimáticas. Para cada uma das enzimas foi utilizada uma quantidade apropriada de plasma total.

3.5.2 Fosfatase ácida (FAC)

A atividade da fosfatase ácida foi determinada pela modificação do método de MOSS apud BERGMEYER & BEACH (1983), pela adição de 100 μL de p-nitrofenilfosfato (0,12 M) à uma mistura de 2,7 mL de tampão citrato de sódio pH 5,0 (0,05 M) e 30 μL de homogeneizado. A mistura reacional era incubada a 30°C por 30 minutos sendo bloqueada pela adição de 400 μL de NaOH (2,0 N). Os tubos eram centrifugados à 5000 X g por 3 minutos e lidos em espectrofotômetro em 405 nm contra um tubo branco de reação (p-nitrofenilfosfato mais o tampão e sem o homogenato). O coeficiente de extinção molar foi determinado e utilizado para expressar a atividade enzimática em nmol/min/mg de proteína.

3.5.3 Fosfatase alcalina (FALC)

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada pela modificação do método de BRETAUDIERE & SPILMAN apud BERGMEYER & BEACH (1983), através da adição de 100 μL de p-nitrofenilfosfato (0,12 M) a uma mistura de 2,7 mL de tampão glicina pH 8,5 (0,05 M), MgCl_2 (0,01 M) e 30 μL de homogeneizado. A mistura reacional foi incubada a 30°C por 30 minutos sendo bloqueada pela adição de 400 μL de NaOH (2,0 N). Os tubos eram centrifugados à 5000 X g por 3 minutos e lidos em espectrofotômetro em 405 nm contra um tubo branco de reação (p-nitrofenilfosfato mais o tampão e sem o homogenato). O coeficiente de absorvidade molar foi determinado e utilizado para expressar a atividade enzimática em nmol/min/mg de proteína.

3.5.4 Desidrogenases

A atividade das desidrogenases foi determinada pela adaptação do método de HOCHACHKA et al., (1978) que se baseia na oxidação do NADH determinada cineticamente em espectrofotômetro em 340 nm. O coeficiente de extinção molar determinado em espectrofômetro (BECKMAN DU®520) foi 0,855108/mM.cm.

3.5.4.1 Lactato desidrogenase (LDH)

A reação da LDH foi monitorada durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos em um meio contendo 200 μ L de ácido pirúvico (0,05 M), 100 μ L de NADH 2 mM e 1,7 mL de tampão Tris pH 7,5 (0,05 M), ao qual era adicionado o homogeneizado. O coeficiente de extinção do NADH foi determinado e utilizado para expressar a atividade enzimática em nmol/min/mg de proteína (mU/mg de proteína).

3.5.4.2 Malato desidrogenase (MDH)

A reação da MDH foi monitorada durante 2 minutos com registro de 15 em 15 segundos, em um meio contendo tampão imidazol pH 7,0 (0,05 M), NADH 0,2 mM e oxaloacetato 0,33 mM, ao qual era adicionado o homogeneizado. O coeficiente de extinção do NADH foi determinado e a atividade da enzima está expressa em nmol/min/mg de proteína (mU/mg de proteína).

3.5.4.3 Glutamato desidrogenase (GDH)

A reação da GDH foi monitorada durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos em um meio contendo 2 mL de um coquetel constituído por tampão imidazol pH 7,0 (0,05 M), NADH 0,1 mM, ADP 1 mM, α -cetoglutarado 5 mM e acetato de amônio 250 mM, ao qual era adicionado o homogeneizado. O coeficiente de

extinção do NADH foi determinado e utilizado para expressar a atividade enzimática em nmol/min/mg de proteína (mU/mg de proteína).

3.5.5 Alanina amino transferase (ALAT)

Como substrato de reação foi utilizada a seguinte mistura: alanina 400 mM, α -cetoglutarato 210 mM, piridoxal fosfato 0,25 mM e arsenato de sódio 20 mM. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato pH 7,5 e tiveram o pH novamente ajustado para o mesmo valor. Após a adição de um volume adequado de extrato celular a mistura era incubada por 30 minutos a 25°C e a reação interrompida pela adição de dinitrofenilhidrazina (REITMAN & FRANKEL, 1957). O produto da reação (piruvato) foi determinado colorimetricamente pela reação com dinitrofenilhidrazina (LU, 1939) para α -cetoácidos.

3.5.6 Aspartato amino transferase (ASAT)

Como substrato de reação foi utilizada a seguinte mistura: aspartato 80 mM, α -cetoglutarato 210 mM, piridoxal fosfato 0,25 mM e arsenato de sódio 20 mM. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato pH 7,5 e tiveram o pH novamente ajustado para o mesmo valor. Após a adição de volume adequado de extrato celular a mistura era incubada por 30 minutos a 25°C e a reação interrompida pela adição de dinitrofenilhidrazina (REITMAN AND FRANKEL, 1957). O produto da reação (oxaloacetato) foi determinado colorimetricamente pela reação com dinitrofenilhidrazina (LU, 1939) para α -cetoácidos.

3.5.7 Piruvato Quinase (PK)

A atividade da Piruvato quinase foi determinada cineticamente numa reação acoplada com LDH pela oxidação do NADH durante a transformação de piruvato (produto da PK) em lactato (STALL et al., 1975). Para tanto uma quantidade apropriada de homogeneizado era adicionada a um coquetel composto de fosfoenolpiruvato 2,8 mM, KCl 100 mM, MgCl 100 mM, NADH 0,15 mM, LDH 21 U/mL e tampão HEPES, pH 7,5. A oxidação do NADH era acompanhada em 340 nm utilizando um espectrofotômetro.

3.6 Proteína no homogeneizado dos tecidos

O teor de proteína total foi determinado nos mesmos homogeneizados utilizados nas determinações enzimáticas e o resultado foi utilizado no cálculo das atividades específicas. A quantificação foi feita pelo método descrito por KRUGER (1994) que utiliza o reagente de BRADFORD, consistindo de uma mistura de ácido fosfórico e Comassie Brilliant Blue. Depois de feitas as diluições apropriadas para cada tecido, 10 μ L de cada amostra eram colocados em duplicata numa microplate e 200 μ L do reagente de BRADFORD eram adicionados aos poços. As placas eram lidas após 5 minutos em 520nm utilizando um “microplate reader” (ThermoMax®, Molecular Devices).

3.7 Indicadores de estresse

3.7.1 Cortisol Plasmático

O cortisol plasmático foi quantificado utilizando kit da Neogen (Lexington, KY, EUA). A quantificação foi feita utilizando um ensaio ELISA (enzyme linked ImmunoSorbent Assay) que se baseia na competição entre um conjugado enzimático e

o cortisol por um número limitado de sítios de ligação. Cinquenta μL das amostras e dos padrões juntamente com o conjugado enzimático eram adicionados a uma “microplate” que contém anticorpos específicos adsorvidos as paredes dos poços. Após esse passo as placas eram incubadas por 1 hora para que a competição pelos sítios pudesse ocorrer. Em seguida, a placa era lavada com um tampão especial para remover o resto de conjugado que não se ligara e o reagente 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina + H_2O_2 era adicionado para revelar a cor. Os resultados eram lidos após 30 minutos em 650 nm, sendo inversamente proporcionais à quantidade de cortisol presente na amostra.

3.7.2 Glicose Plasmática

A glicose foi determinada utilizando-se o mesmo método descrito em 3.4.1 A.

3.7.3 HSPs

As HSPs foram quantificadas através de imunodeteção utilizando anticorpos monoclonais específicos para HSP's (IWAMA et al., 1998), fornecidos pela Sigma (St. Louis, EUA). Primeiramente as amostras eram diluídas com um tampão (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; Dodecil Sulfato de Sódio-SDS (0,1%) e inibidores de proteases (EDTA, Pepstatina, Leupeptina, Aproptina e PMSF) na proporção de 100 mg de tecido/mL e em seguida homogeneizadas em banho de gelo. Para a homogeneização foram utilizados pulsos de 10 segundos em um sonicador (60 Hz). Após a homogeneização, as amostras eram divididas em duas alíquotas: uma para determinação de proteína e outra era colocada em tampão de Laemmli (2X) (0,5M Tris-HCl, Glicerol, SDS 10%, azul Bromofenol 0,05% e β -mercaptoetanol P.A) na proporção 1:1. A quantidade de proteína era determinada pelo método BCA, utilizando o ácido binciconínico (Sigma) adicionado de sulfato de cobre II (4%). Após a determinação da proteína todas as

amostras eram diluídas com tampão de Laemmli (1X) para que a concentração de proteínas em todas elas fosse de 2 mg/mL.

As proteínas eram separadas em géis SDS-poliacrilamida (12%) por 1 hora à 150V e em seguida eram transferidas para membranas de nitrocelulose (Western Blot). Após a transferência as membranas eram incubadas com os anticorpos, cujas concentrações ideais foram previamente determinadas (FIGURAS 38 e 39). O anticorpo primário era Anti-Hsp feito para a proteína de ratos. O anticorpo secundário era Anti-IG' g de coelho com Horseradish Peroxidase conjugada. A proporção dos anticorpos utilizada foi de 1/5000 do primário, 1/15000 (Brânquias) e 1/10000 (Fígado) do secundário. Ambos eram diluídos em blocking buffer (Tampão TBS e leite desnatado em pó) e lavados com TBS-T (0,5% de solução Tween20). Após a lavagem final as membranas eram colocadas sobre uma transparência num Spectroline cassette (Kodak, EUA) e cobertos com o reagente (Luminol) para quimiluminescência (Amersham, EUA). Em seguida um filme rádio-sensível era colocado sobre as membranas e deixado no escuro por 1 hora e meia. Após esse período os filmes eram revelados e as bandas resultantes eram quantificadas num programa fornecido pela BioRad.

3.8 Análise Estatística

A $CL_{50}/96h$ foi determinada utilizando o software “Trimmed Spearman-Kärber” “LC50 Programs JSPEAR” (HAMILTON et al., 1978).

Os dados do primeiro experimento foram testados quanto a sua normalidade utilizando o teste de Anderson-Darling ($p > 0,05$) e as diferenças entre os grupos testadas através de um teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey para comparar os grupos.

Os dados do segundo experimento foram testados quanto as diferenças utilizando-se ANOVA “two-way” ($p>0,05$) para dois fatores e os grupos comparados utilizando-se o pós-teste de Tukey.

"In three words I can sum up everything
I've ever learned about life: It goes on."
Robert Frost

4. RESULTADOS

4.1 Teste de Toxicidade – CL₅₀/96h

Os dados de mortalidade estão sumarizados na tabela 2. A mortalidade foi zero no controle, 1 e 5 ppm. No grupo que foi tratado com 25 ppm 5 peixes morreram após 48 horas. Na concentração mais alta (50 ppm) todos os animais morreram em 24 horas. A CL₅₀/96h do fenol calculada através do software “Trimmed Spearman-Kärber” “LC50 Programs JSPEAR” (HAMILTON et al., 1978) para o matrinxã foi 17,4 ppm com 95% de confiança. Os dados dos parâmetros de qualidade de água estão representados na TABELA 3. A presença do fenol não causou alterações significativas nesses parâmetros.

TABELA 2.- Sobreviventes de *B. cephalus* submetidos ao teste de toxicidade.

Concentrações de fenol	Número de peixes sobreviventes		
	Início (0 hora)	Final (96 horas)	% de sobreviventes
Controle (0 ppm)	10	10	100
1 ppm	10	10	100
5 ppm	10	10	100
10 ppm	10	0	100
25 ppm	10	5	50
50 ppm	10	0	0

4.2 Primeiro experimento de exposição ao fenol

4.2.1 Parâmetros Hematológicos

4.2.1.1 Hematócrito

Os resultados do hematócrito (média±EPM) estão apresentados no FIGURA 5 e na TABELA 4 e foram expressos em porcentagem. O hematócrito apresentou uma

redução significativa nos peixes expostos ao fenol, caindo de uma média de $39,05 \pm 0,087$ para $37,13 \pm 0,32$.

4.2.1.2 Hemoglobina Total

Os valores médios \pm EPM (erro padrão da média) de hemoglobina total estão apresentados na TABELA 4 e foram expressos em g/dL. Os níveis de hemoglobina total não apresentaram alterações significativas nos animais expostos ao fenol, mas uma pequena redução nos níveis de hemoglobina total foi encontrada.

4.2.1.3 Metahemoglobina

Os valores médios \pm EPM de metahemoglobina estão apresentados na TABELA 4 e no FIGURA 6, sendo expressos em valores %. Os níveis de metahemoglobina apresentaram um aumento significativo, subindo de $0,92 \pm 0,38\%$ no controle para $4,5 \pm 1,3\%$ nos animais expostos ao fenol.

4.2.1.4 Contagem de Eritrócitos (RBC)

Os valores médios \pm EPM da contagem de células vermelhas estão apresentados na TABELA 4 e no FIGURA 7, sendo expressos em milhões de células/mm³. Os animais expostos ao fenol apresentaram uma redução significativa no número de células vermelhas com valores médios de $1,17 \pm 0,02$ contra $1,33 \pm 0,023$ do controle.

4.2.1.5 Volume Corpuscular Médio (VCM)

Os valores médios \pm EPM do VCM estão apresentados na TABELA 4, sendo expressos em μmm^3 . Não foram observadas diferenças significativas nos valores do

TABELA 3. Valores médios da qualidade da água durante o teste de toxicidade (CL₅₀-96h) para *B. cephalus*

	Controle (0 ppm)		1ppm		5 ppm		10 ppm		25 ppm		50 ppm	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final
Temperatura (C°)	23,8± 0,88	22,25± 1,54	23,1± 0,88	22,25± 1,54	23,12± 0,82	22,2± 1,48	23,22± 0,84	23,07± 2,10	23,22± 0,84	22,77± 1,90	22,35± 0,007	22,35± 0,007
Oxigênio (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
Dureza (mg/L)	37,4± 6,98	33,75± 1,7	36,6± 6,34	34,75± 1,89	37,6± 5,59	36,75± 4,99	41,0± 7,54	33,0± 0,81	38,8± 6,37	38± 1,41	46± 1,41	46± 1,41
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± 0,17	7,47± 0,17
Condutividade (µS/cm ³)	86,36± 12,77	78,7± 1,81	87,8± 12,78	79,1± 2,09	88,02± 13,55	77,82± 1,91	91,44± 18,50	80,95± 4,06	89,28± 13,44	81,02± 1,19	101,85± 0,21	101,85± 0,21
Alcalinidade (mg/L)	48,4± 6,85	42,12± 1,31	47,4± 7,17	46,9± 6,37	46,9± 6,37	46,37± 3,75	49,5± 10,39	46,0± 5,36	47,1± 7,36	45,25± 3,32	54,5± 0,70	54,5± 0,70
Amônia (mg/L)	0,35± 0,001	0,11± 0,0088	0,27± 0,001	0,30± 0,0001	0,30± 0,001	0,07± 0,001	0,22± 0,001	0,08± 0,0001	0,25± 0,0001	0,11± 0,001	0,524± 0,007	0,524± 0,007
Nitrito (mg/L)	0,0012± 0,002	0,0069± 0,0035	0,0058± 0,0001	0,0064± 0,001	0,0064± 0,001	0,0104± 0,002	0,00476± 0,0018	0,0141± 0,005	0,0108± 0,001	0,008± 0,001	0,0045± 0,0007	0,0045± 0,0007
Fenol (mg/L)	0	0	0,85± 0,09	0,2± 0,05	4,87± 0,34	2,87± 0,17	9,68± 0,42	4,13± 0,93	24,5± 0,12	20,52± 2,44	50	50

VCM nos grupos tratados em relação ao controle, apesar da média do grupo exposto ($321,68 \pm 12,71$) ser um pouco maior que a do controle ($300,51 \pm 12,57$).

TABELA 4. Valores médios \pm EPM dos parâmetros hematológicos de *B. cephalus* exposto ao fenol.

	CONTROLE	2PPM
HEMATÓCRITO	$39,05 \pm 0,688152$	$37,13158 \pm 0,834449^*$
HB TOTAL	$11,0586 \pm 0,777373$	$9,548123 \pm 0,413548$
META HB	$0,92 \pm 0,38$	$4,51 \pm 1,36^*$
RBC	$1,3355 \pm 0,048083$	$1,175 \pm 0,034118^*$
VCM	$300,2184 \pm 12,84572$	$321,6872 \pm 12,71063$
HCM	$85,08478 \pm 7,069755$	$81,77551 \pm 3,578071$
CHCM	$2,837896 \pm 0,199026$	$2,593223 \pm 0,130281$

(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Hematócrito (%), RBC (milhões de células/ mm^3), Metahemoglobina (%), Hb total (g/dl), VCM (μmm^3), HCM (pg/célula) e CHCM (%).

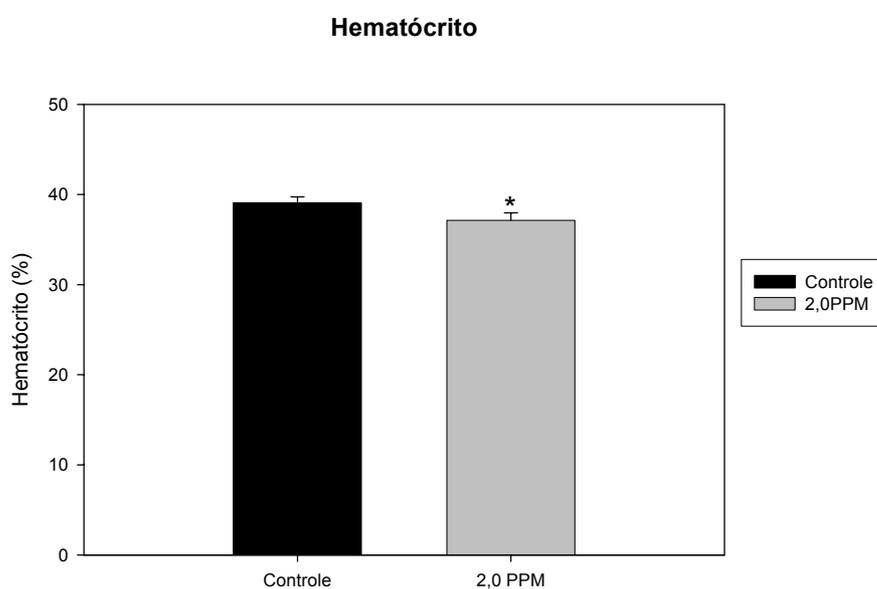


FIGURA 5. Valores médios \pm EPM do hematócrito (%) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (* $p < 0,05$).

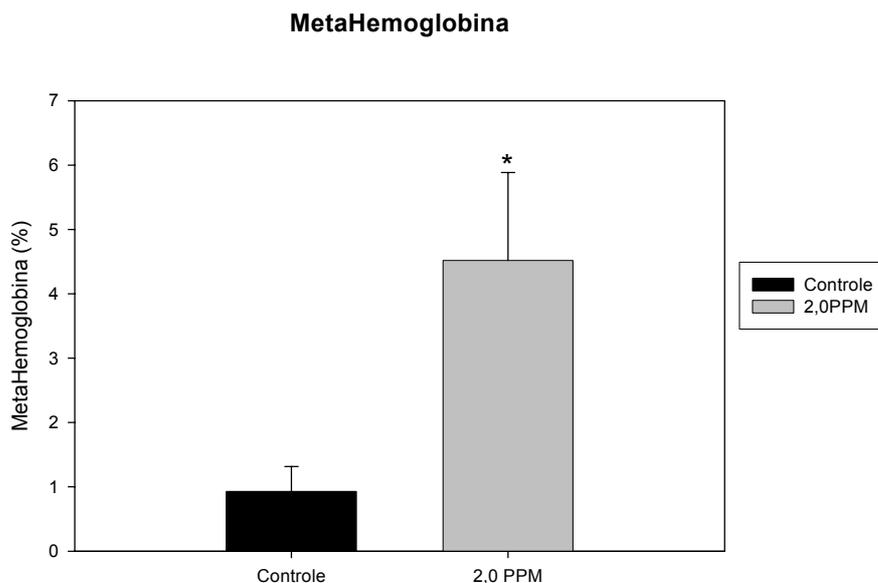


FIGURA 6. Valores médios±EPM da concentração de metahemoglobina (%) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.

4.2.1.6 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

Os valores médios±EPM da HCM estão apresentados na TABELA 4, sendo expressos em pg/célula. A HCM dos animais expostos ao fenol não foi significativamente diferente da dos animais do controle.

4.2.1.7 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

Os valores médios da CHCM estão apresentados na TABELA 4, sendo expressos em %. Os resultados de CHCM dos peixes expostos não foram diferentes daqueles expostos ao fenol.

4.2.1.8 Sódio

Os valores médios±EPM das concentrações de sódio plasmático estão apresentados no FIGURA 8, sendo expressos em miliequivalentes por mililitro (mEq/ml). A concentração média de sódio do grupo exposto ao fenol foi de

117,11±7,13 contra 126,77±6,71 do controle. Essa diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa.

4.2.1.9 Cloretos

Os valores médios±EPM das concentrações de cloreto plasmático estão apresentados no FIGURA 9, sendo expressos em mEq/ml. O grupo tratado apresentou uma redução significativa nos níveis de cloreto plasmático, caindo de 173,36±10,87 (controle) para 150,31±10,04.

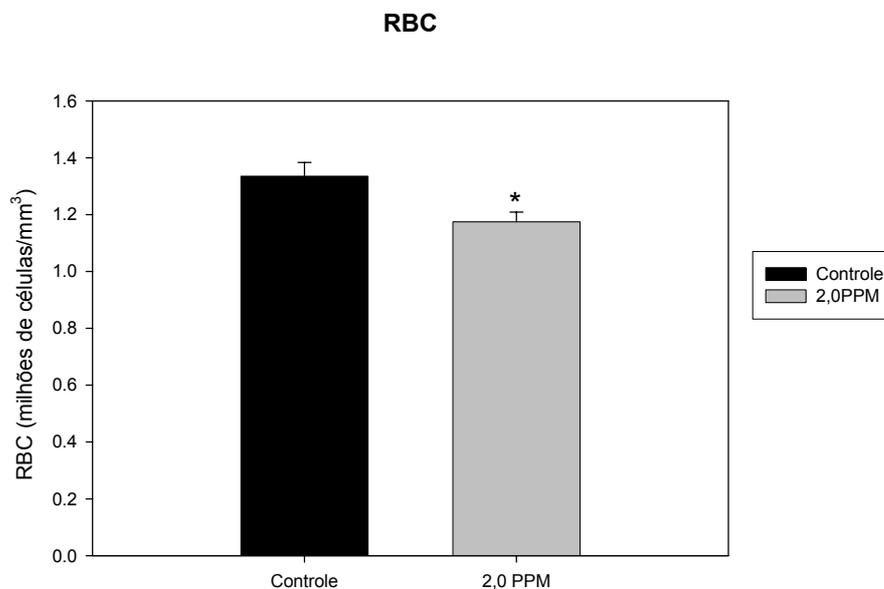


FIGURA 7. Valores médios±EPM do número de células vermelhas (milhões de células/mm³) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (*p < 0,05).

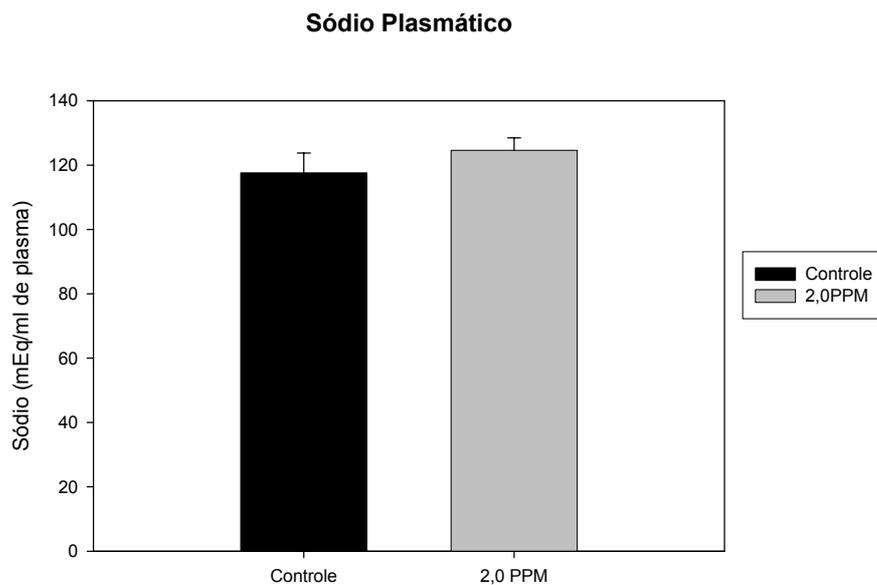


FIGURA 8. Valores médios \pm EPM das concentrações de sódio plasmático (mEq/ml) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol.

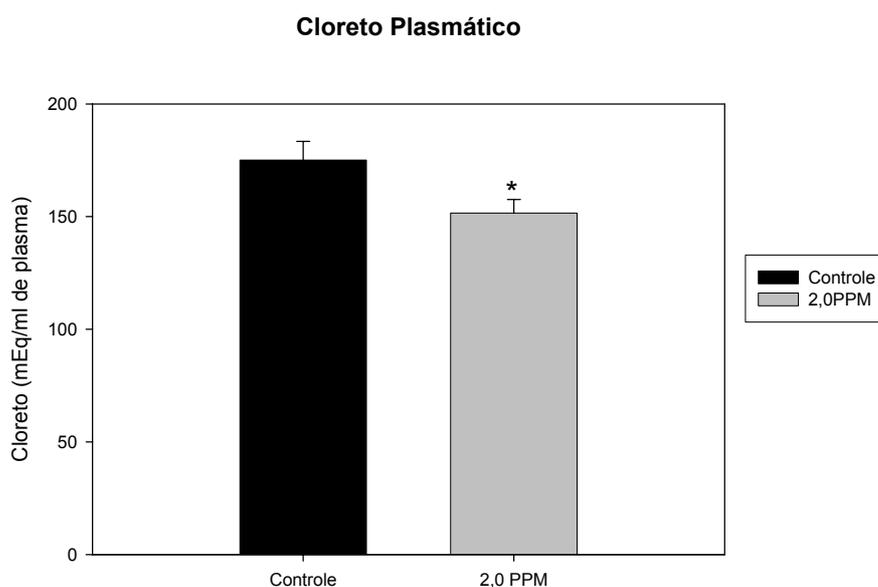


FIGURA 9. Valores médios \pm EPM das concentrações de cloreto plasmático (mEq/ml) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (* $p < 0,05$).

4.2.2 Intermediários metabólicos

4.2.2.1 Fígado

4.2.2.1.1 Glicose

As médias \pm EPM da concentração hepática de glicose estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 10, sendo expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido. Nos animais expostos ao fenol houve uma redução significativa de 33% na concentração de glicose (de $1096\pm96,16$ para $740,3\pm29,27$).

4.2.2.1.2 Lactato

As médias \pm EPM da concentração hepática de lactato estão apresentadas na TABELA 5, sendo expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido. Não houve diferença significativa entre os níveis de lactato nos animais tratados e o nos animais do controle.

4.2.2.1.3 Piruvato

As médias \pm EPM da concentração hepática de piruvato estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 11, sendo expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido. Os níveis hepáticos de piruvato caíram significativamente de $1,984\pm0,1239$ para $1,609\pm0,08980$ no grupo tratado com fenol.

4.2.2.1.4 Amônia

As médias \pm EPM da concentração hepática de amônia estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 12, sendo expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido. Os níveis de amônia no fígado dos animais expostos ao fenol foram significativamente maiores que os do grupo controle. Esse aumento foi de quase 21% ($68,51\pm2,234$ no controle e $86,25\pm4,749$ no grupo exposto ao fenol).

TABELA 5. Atividade de enzimas e intermediários metabólicos do tecido hepático de *B. cephalus* exposto ao fenol. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Enzimas (mU/mg de proteína); glicose, piruvato, lactato, aalivres, amônia expressos em $\mu\text{mols/g}$ de tecido; glicogênio (μmols de glicosil-glicose/g de tecido) e proteína (mg de proteína/mg de tecido).

FÍGADO		
GLICOSE	1096 \pm 96,16	740,3 \pm 29,27**
PIRUVATO	1,984 \pm 0,1239	1,609 \pm 0,08980*
LACTATO	25,99 \pm 1,351	27,60 \pm 1,297
A.A LIVRES	98,17 \pm 9,200	71,56 \pm 5,946*
AMÔNIA	68,51 \pm 2,234	86,25 \pm 4,749**
GLICOGÊNIO	599,6 \pm 78,96	428,8 \pm 28,82*
PROTEÍNA TOTAL	135,2 \pm 5,216	119,5 \pm 5,544*
ALAT	254,8 \pm 19,65	199,1 \pm 17,06*
ASAT	304,1 \pm 25,73	393,0 \pm 24,86*
GDH	948,4 \pm 68,01	930,2 \pm 67,96
MDH	11732 \pm 939,4	15545 \pm 1075*
LDH	172,7 \pm 16,98	272,1 \pm 33,24*
PK	1226 \pm 129,4	1326 \pm 288,6
FALC	0,01560 \pm 0,001431	0,01679 \pm 0,002655
FAC	0,1257 \pm 0,01584	0,1561 \pm 0,01557

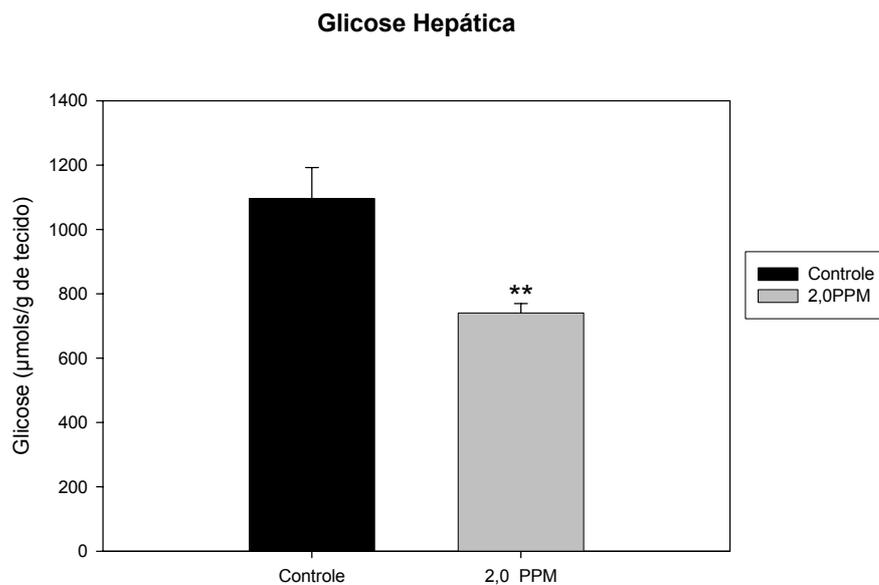


FIGURA 10. Valores médios \pm EPM das concentrações de glicose hepática ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (** $p < 0,01$).

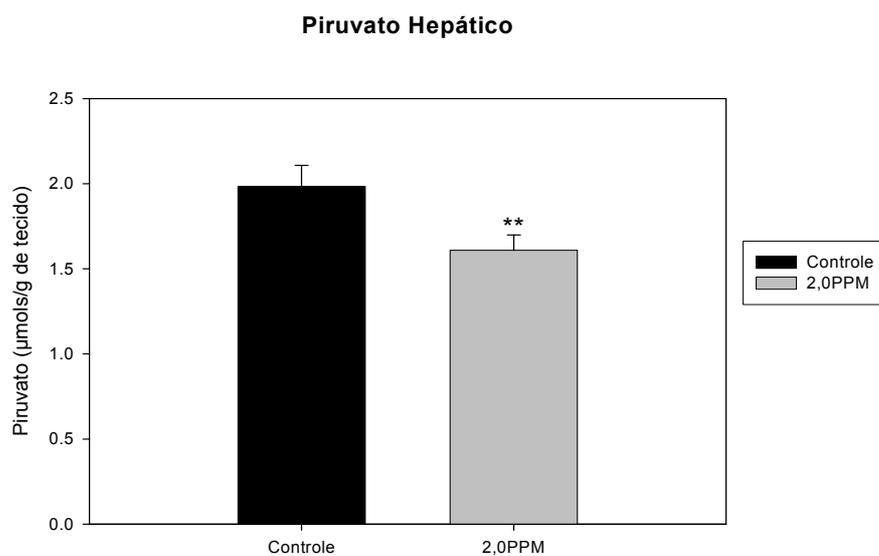


FIGURA 11 Valores médios \pm EPM das concentrações de piruvato hepática ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol. (** $p < 0,01$)

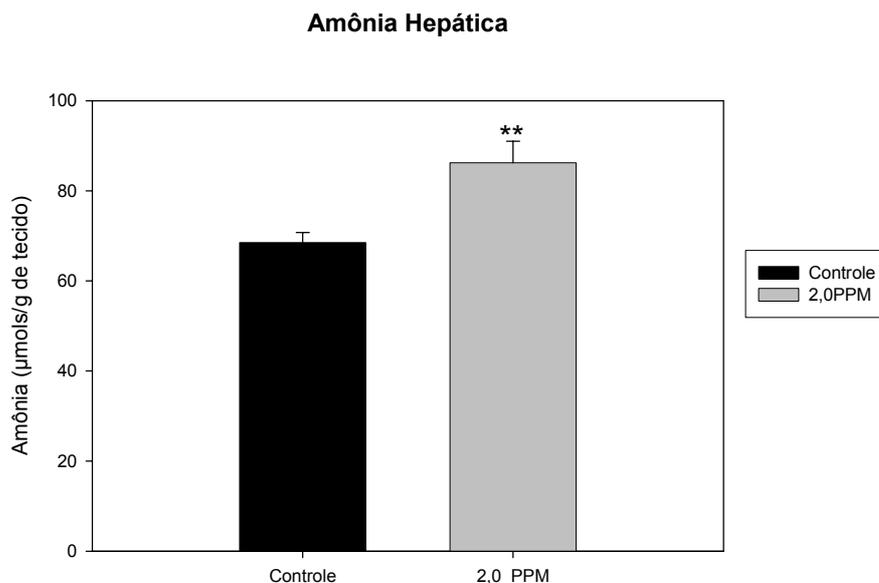


FIGURA 12. Valores médios±EPM das concentrações de amônia hepática ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (** $p < 0,01$).

4.2.2.1.5 Aminoácidos Livres

As médias±EPM da concentração hepática de aminoácidos livres estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 13, sendo expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido. As concentrações de aminoácidos livres foram significativamente menores no grupo de peixes expostos ao fenol, apresentando uma queda de 28% (de $98,17 \pm 9,2$ para $78,56 \pm 5,946$).

4.2.2.1.6 Glicogênio

As médias±EPM da concentração hepática de glicogênio estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 14, sendo expressas em μmols de glicosil-glicose/g de tecido. Os níveis de glicogênio foram significativamente menores nos peixes tratados em relação ao controle. Houve uma queda de $599,6 \pm 78,96$ para $428,8 \pm 28,82$, o que representa uma redução de aproximadamente 29%.

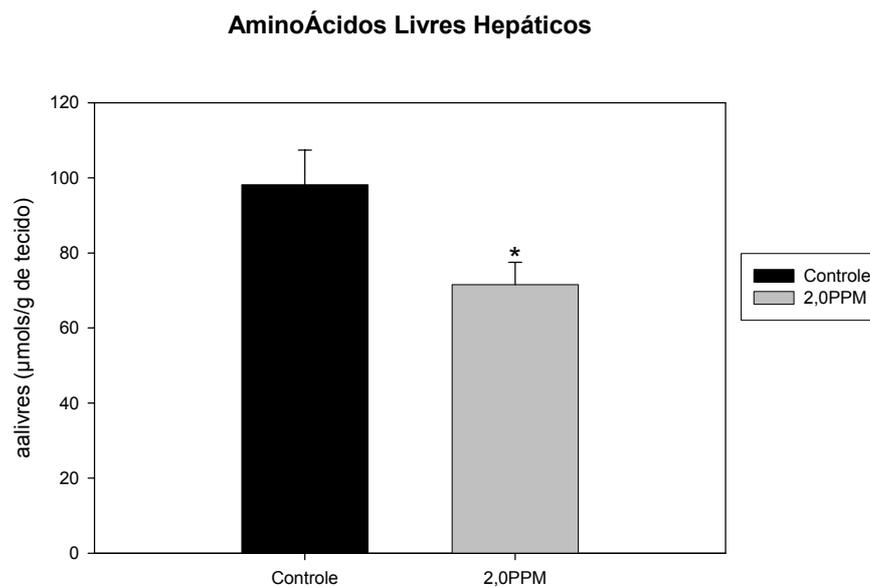


FIGURA 13. Valores médios \pm EPM das concentrações de aminoácidos livres ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (* $p < 0,05$).

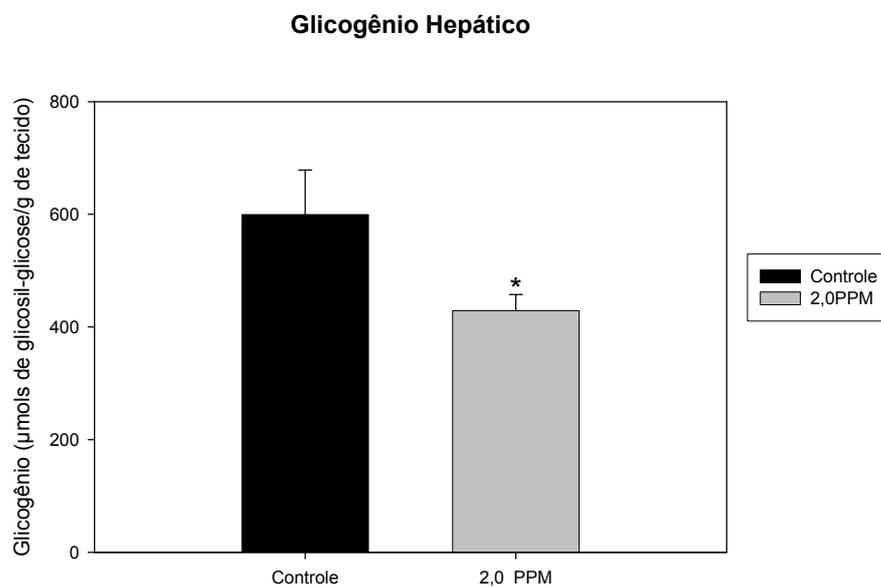


FIGURA 14. Valores médios \pm EPM das concentrações de glicogênio hepático (μmol de glicosil-glicose/g de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (* $p < 0,05$).

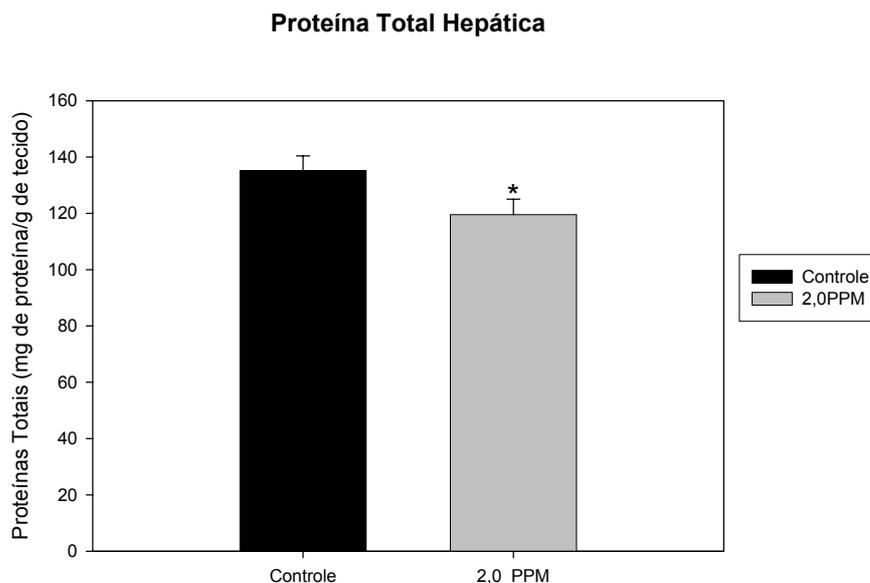


FIGURA 15. Valores médios \pm EPM das concentrações de proteína total hepática (mg de proteína/mg de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (* $p < 0,05$).

4.2.2.1.7 Proteína Total

As médias \pm EPM da concentração hepática de proteínas totais estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 15, sendo expressas em mg de proteína/mg de tecido. Os níveis de proteínas totais no fígado do matrinxã apresentaram uma queda significativa de 12%, caindo de 135,2 \pm 5,216 para 119,5 \pm 5,544.

4.2.2.2 Músculo Branco

4.2.2.2.1 Glicose

As médias \pm EPM da concentração muscular de glicose estão apresentadas na TABELA 6 e no FIGURA 16, sendo expressas em μ mols/g de tecido. Nos animais expostos ao fenol houve uma redução significativa de 19% nas concentrações de glicose (de 22,3 \pm 1,22 para 18,22 \pm 0,73).

TABELA 6. Atividade de enzimas e intermediários metabólicos do tecido muscular de *B. cephalus* exposto ao fenol. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Enzimas (mU/mg de proteína); glicose, piruvato, lactato, aalivres, amônia expressos em $\mu\text{mols/g}$ de tecido; glicogênio ($\mu\text{mols de glicosil-glicose/g}$ de tecido) e proteína (mg de proteína/mg de tecido).

MÚSCULO BRANCO		
	Controle	2 ppm
GLICOSE	22,31 ± 1,22	18,22 ± 0,73**
PIRUVATO	0,5650 ± 0,03918	0,7498 ± 0,03593**
LACTATO	51,06 ± 3,336	36,95 ± 1,886**
A.A LIVRES	60,43 ± 3,922	63,66 ± 3,103
AMÔNIA	16,86 ± 0,9653	18,76 ± 0,7864
GLICOGÊNIO	79,91 ± 5,161	82,69 ± 4,072
PROTEÍNA TOTAL	46,48 ± 3,542	59,80 ± 3,016**
ALAT	28,79 ± 3,779	41,45 ± 4,516*
ASAT	143,7 ± 8,390	188,8 ± 16,99*
MDH	8562 ± 747,2	10590 ± 680,5
LDH	78769 ± 5159	82337 ± 6148
PK	4646 ± 337,7	3740 ± 233,3*

4.2.2.2.2 Lactato

As médias \pm EPM da concentração muscular de lactato estão apresentadas na TABELA 6 e no FIGURA 17, sendo expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido. Os níveis de lactato muscular apresentaram redução significativa nos peixes tratados com fenol, caindo de $51,06 \pm 3,336$ para $38,95 \pm 1,886$, uma redução de quase 24%.

4.2.2.2.3 Piruvato

As médias \pm EPM da concentração muscular de piruvato estão apresentadas na TABELA 6 e no FIGURA 18, sendo expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido. Os níveis de piruvato muscular aumentaram significativamente nos peixes tratados com fenol, subindo de $0,5650\pm 0,03918$ para $0,7498\pm 0,03593$ uma elevação de quase 25%.

4.2.2.2.4 Amônia

As médias \pm EPM da concentração muscular de amônia estão apresentadas na TABELA 6, sendo expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido. Os valores de amônia no músculo não apresentaram diferenças significativas.

4.2.2.2.5 Aminoácidos livres

As médias \pm EPM da concentração muscular de aminoácidos livres estão apresentadas na TABELA 6, sendo expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido. Os valores de aminoácidos livres no músculo não apresentaram diferenças significativas.

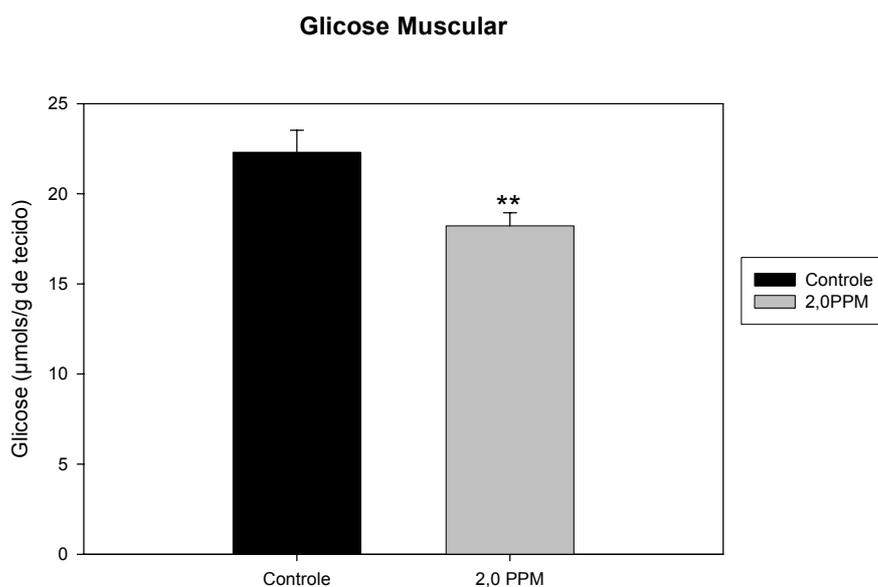


FIGURA 16. Valores médios \pm EPM das concentrações de glicose muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (**p < 0,01).

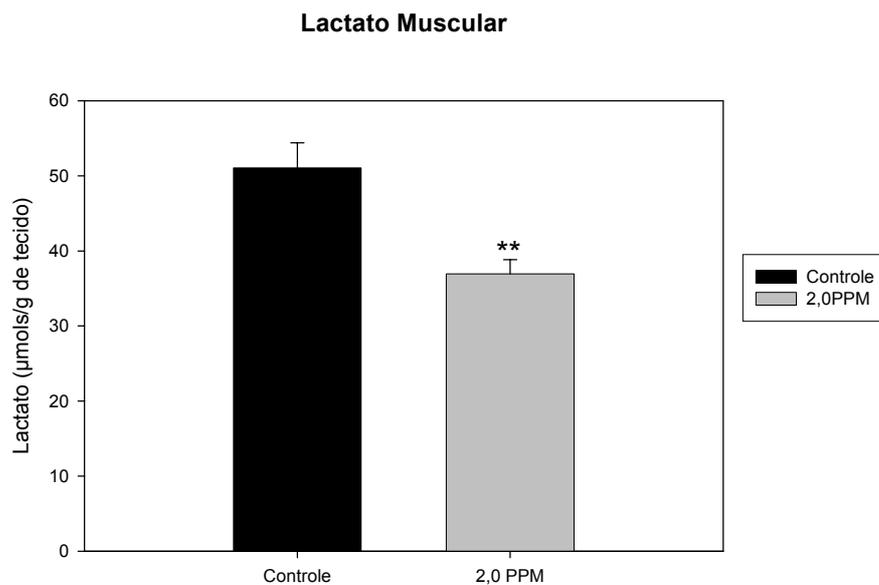


FIGURA 17. Valores médios \pm EPM das concentrações de lactato muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (**= $p < 0,01$).

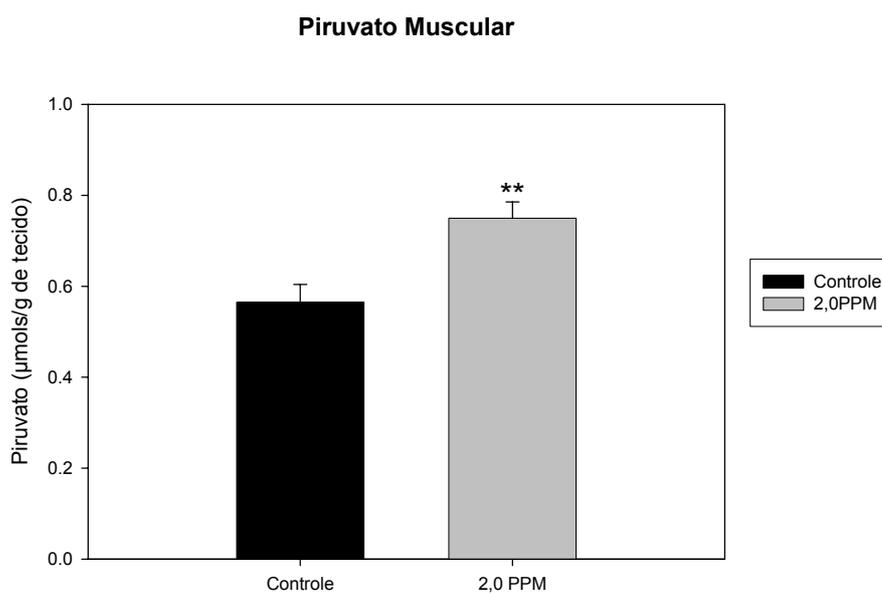


FIGURA 18. Valores médios \pm EPM das concentrações de piruvato muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (**= $p < 0,01$).

4.2.2.2.6 Glicogênio

As médias \pm EPM da concentração muscular de glicogênio estão apresentadas na TABELA 6, sendo expressas em μ mol de glicosil-glicose/g de tecido. Os valores de glicogênio no músculo não apresentaram diferenças significativas.

4.2.2.2.7 Proteína Total

As médias \pm EPM da concentração muscular de proteína total estão apresentadas na TABELA 6 e no FIGURA 19, sendo expressas em mg de proteína/mg de tecido. Os níveis de proteína total muscular aumentaram significativamente nos peixes tratados com fenol, subindo de $46,48\pm 3,542$ para $59,80\pm 3,016$ uma elevação de quase 23%.

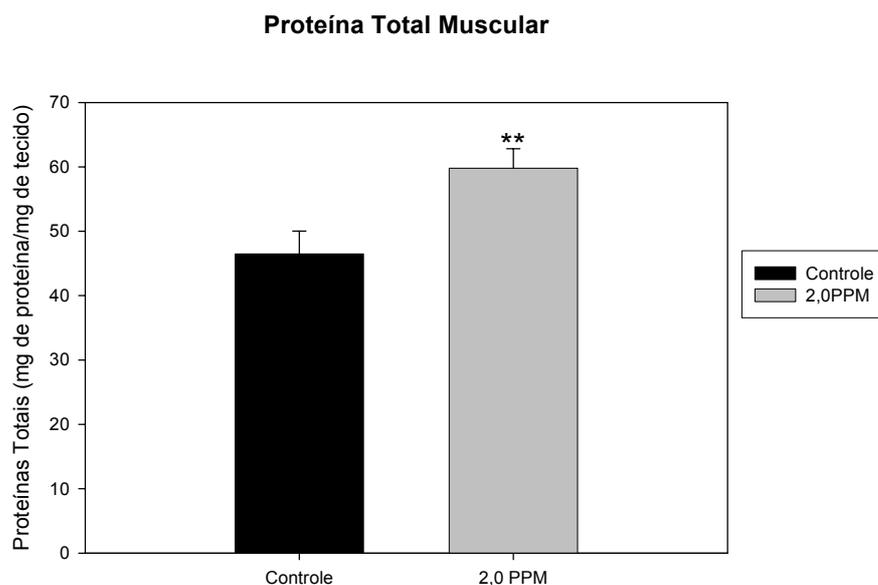


FIGURA 19. Valores médios \pm EPM das concentrações de proteína total muscular (mg de proteína/mg de tecido) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (**= $p < 0,01$).

4.2.2.3 Plasma

4.2.2.3.1 Glicose

As médias \pm EPM da concentração plasmática de glicose estão apresentadas na TABELA 7, sendo expressas em $\mu\text{mol/ml}$ de plasma. A glicose plasmática sofreu uma pequena queda, mas essa não foi estatisticamente significativa. No controle os níveis de glicose eram de $42,62\pm 3,39$ e nos animais expostos foram de $39,13\pm 1,59$.

TABELA 7. Atividade de enzimas e intermediários metabólicos do plasma de *B. cephalus* exposto ao fenol (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Enzimas (mU/mg de proteína); glicose, piruvato, lactato, aalivres, amônia expressos em $\mu\text{mols/ml}$ de plasma; e proteína (mg de proteína/ml de plasma).

	PLASMA	
	Controle	2 ppm
GLICOSE	$42,62\pm 3,39$	$39,13\pm 1,59$
PIRUVATO	$0,4624\pm 0,01423$	$0,4955\pm 0,01583$
LACTATO	$2,583\pm 0,3246$	$1,612\pm 0,2247^*$
A.A LIVRES	$27,86\pm 1,624$	$20,46\pm 2,025^{**}$
AMÔNIA	$4,101\pm 0,1068$	$4,382\pm 0,1184$
PROTEÍNA TOTAL	$37,08\pm 3,149$	$59,97\pm 2,529^{**}$
ALAT	$4,234\pm 0,7985$	$6,397\pm 0,7734$
ASAT	$5,074\pm 0,8402$	$1,927\pm 0,3036^{**}$
LDH	$158,5\pm 30,20$	$75,87\pm 19,34^*$
FALC	$0,00412\pm 0,00021$	$0,0038\pm 0,00025$
FAC	$0,0021\pm 0,0003$	$0,00184\pm 0,0004$

4.2.2.3.2 Lactato

As médias \pm EPM da concentração plasmática de lactato estão apresentadas na TABELA 7 e no FIGURA 20, sendo expressas em $\mu\text{mol/ml}$ de plasma. O conteúdo de lactato plasmático foi significativamente menor nos animais tratados, caindo de $2,583\pm 0,3246$ para $1,612\pm 0,2247$ uma redução de aproximadamente 38%.

4.2.2.3.3 Piruvato

As médias \pm EPM do conteúdo de piruvato plasmático estão apresentadas na TABELA 7, sendo expressas em $\mu\text{mol/ml}$ de plasma. Não houve diferenças significativas nas concentrações de piruvato plasmático.

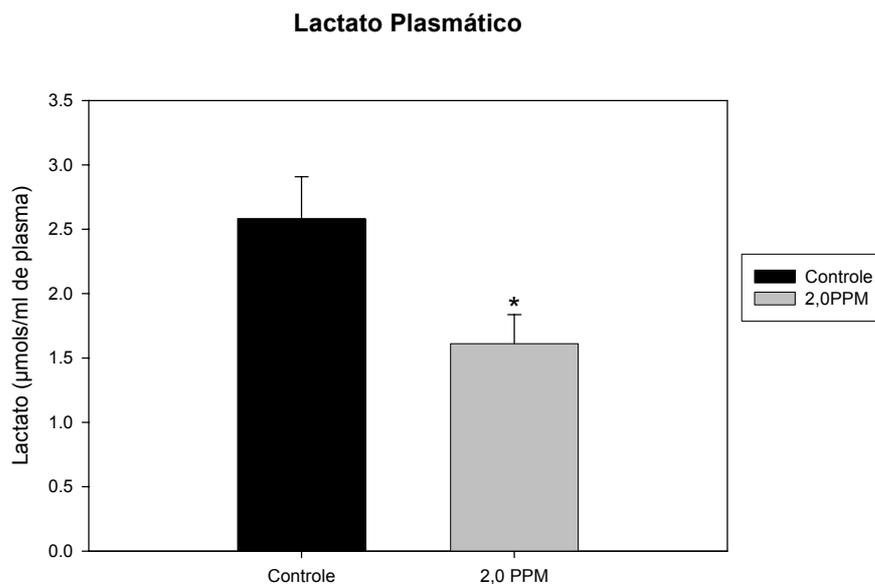


FIGURA 20. Valores médios \pm EPM das concentrações de lactato plasmático ($\mu\text{mol/ml}$ de plasma) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol(*= $p < 0,05$).

4.2.2.3.4 Amônia

As médias \pm EPM do conteúdo plasmático de amônia estão apresentados na TABELA 7, sendo expressas em $\mu\text{mol/ml}$ de plasma. Não foi detectada nenhuma diferença significativa no conteúdo de amônia plasmática.

4.2.2.3.4 Aminoácidos livres

As médias \pm EPM do conteúdo plasmático de aminoácidos livres estão apresentados na TABELA 7 e no FIGURA 21, sendo expressas em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma. Houve uma redução significativa de aproximadamente 27% nas concentrações de aminoácidos livres no plasma, caindo de $27,86\pm 1,624$ para $20,46\pm 2,025$.

4.2.2.3.4 Proteína Total

As médias \pm EPM do conteúdo total de proteínas no plasma estão apresentadas na TABELA 7 e no FIGURA 22, sendo expressas em mg de proteína/ml de plasma. O conteúdo total de proteínas plasmáticas aumentou cerca de 61% nos animais tratados com fenol, subindo de $37,08\pm 3,149$ para $59,97\pm 2,529$.

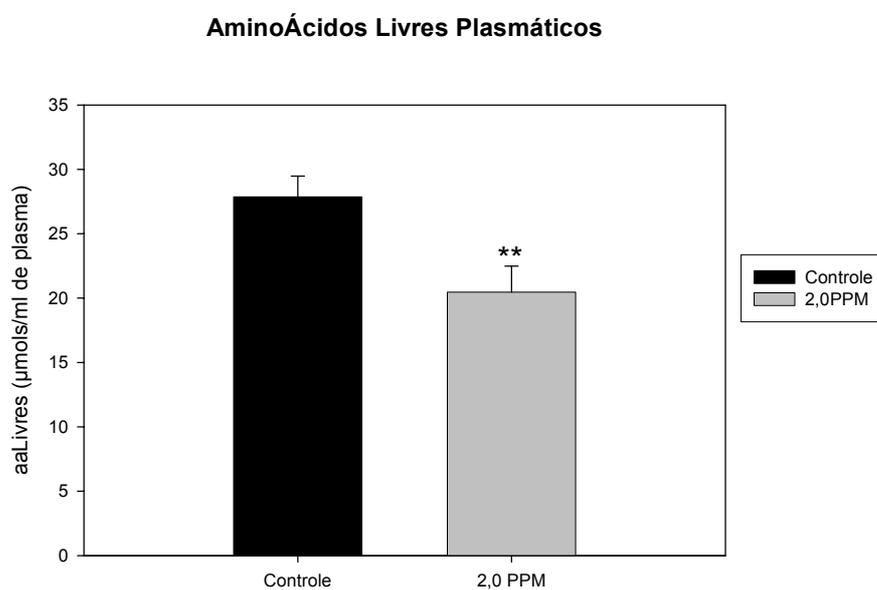


FIGURA 21. Valores médios \pm EPM das concentrações de Aminoácidos livres plasmáticos ($\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (**= $p < 0,01$).

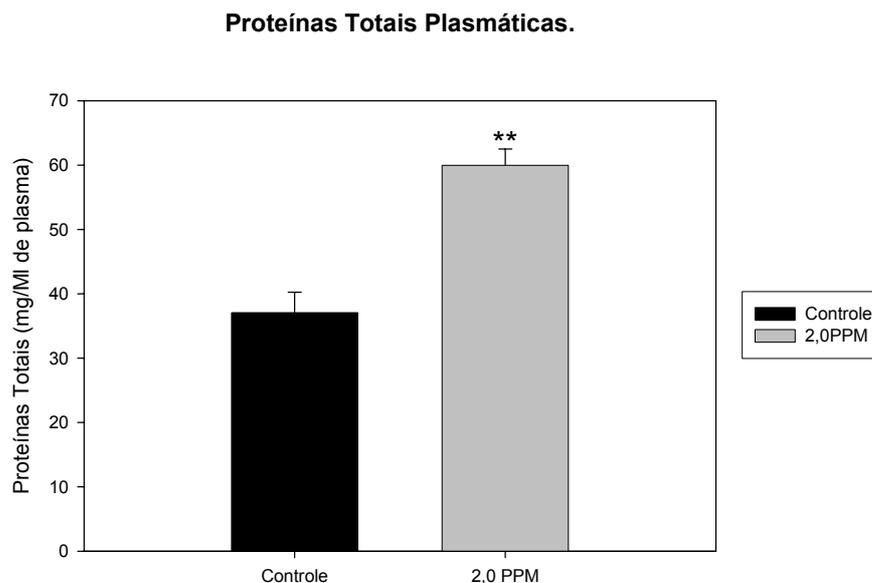


FIGURA 22. Valores médios±EPM das concentrações de proteína total plasmática (mg de proteína/ml de plasma) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (**=p < 0,01).

4.2.3 Enzimas

4.2.3.1 Fígado

4.2.3.1.1 FAC

As médias±EPM das atividades específicas da FAC hepática estão apresentadas na TABELA 5, sendo expressas em mU/mg de proteína. Apesar de haver uma aparente tendência de aumento na atividade específica da FAC, não foi detectada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre controle e tratamento.

4.2.3.1.2 FALC

As médias±EPM das atividades específicas da FALC hepática estão apresentadas na TABELA 5, sendo expressas em mU/mg de proteína. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as atividades específicas nos animais do grupo controle e nos animais expostos ao fenol.

4.2.3.1.3 LDH

As médias \pm EPM das atividades específicas da LDH hepática estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 23, sendo expressas em mU/mg de proteína. A média da atividade no controle foi de 172,7 \pm 16,98, enquanto os animais expostos ao fenol apresentaram uma média de 272,1 \pm 33,24. Esse aumento foi estatisticamente significativo e representa uma elevação de quase 37%.

4.2.3.1.4 MDH

As médias \pm EPM das atividades específicas da MDH hepática estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 24, sendo expressas em mU/mg de proteína. Houve um aumento significativo de quase 25% na atividade específica da MDH, que subiu de 11732 \pm 939,4 no grupo controle para 15545 \pm 1075 nos peixes tratados com fenol.

4.2.3.1.5 GDH

As médias \pm EPM das atividades específicas da GDH hepática estão apresentadas na TABELA 5, sendo expressas em mU/mg de proteína. Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos na atividade da GDH.

4.2.3.1.6 ALAT

As médias \pm EPM das atividades específicas da ALAT hepática estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 25, sendo expressas em mU/mg de proteína. Houve uma redução significativa na atividade específica da ALAT hepática nos animais do grupo experimental. No controle a média encontrada foi de

254,8±19,65 contra 199,1±17,06 no grupo experimental. Essa redução na atividade específica foi de quase 23%.

4.2.3.1.7 ASAT

As médias±EPM das atividades específicas da ASAT hepática estão apresentadas na TABELA 5 e no FIGURA 26, sendo expressas em mU/mg de proteína. Em contraste com a ALAT, a ASAT apresentou um aumento significativo em sua atividade específica naqueles animais que permaneceram expostos ao fenol. Pudemos observar um aumento de 304,1±25,73 para 393,0±24,86, que representa uma elevação de quase 23% na atividade.

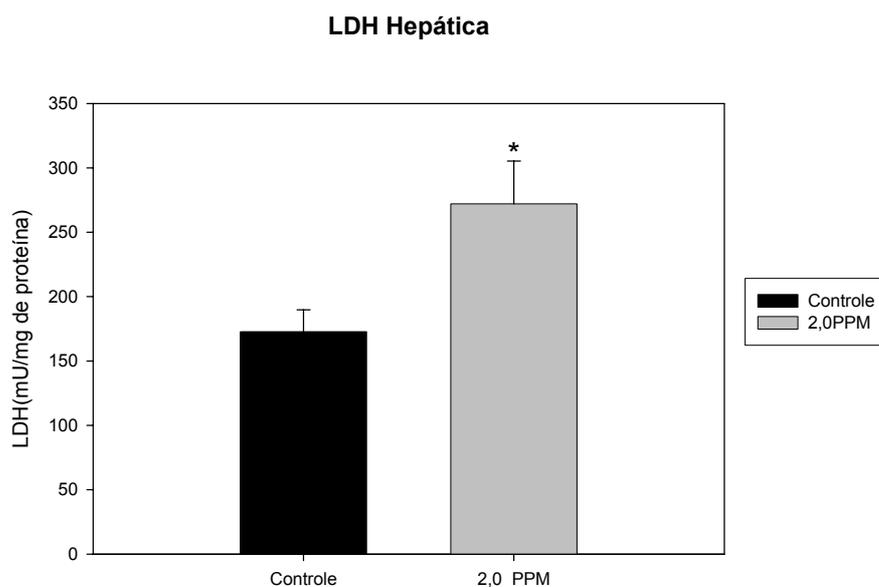


FIGURA 23. Valores médios±EPM das atividades específicas da LDH de fígado (mU/mg de proteína) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (*=p < 0,05).

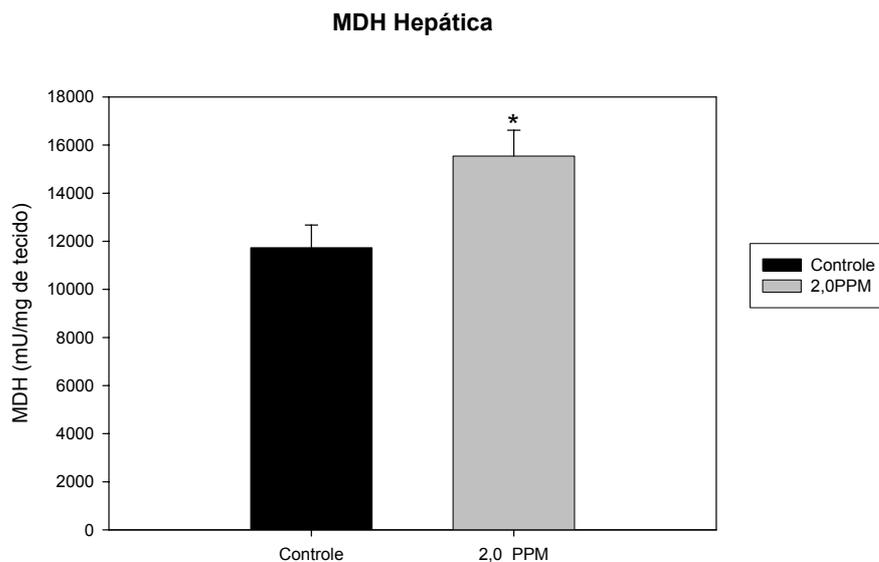


FIGURA 24. Valores médios \pm EPM das atividades específicas da MDH de fígado (mU/mg de proteína) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (*= $p < 0,05$).

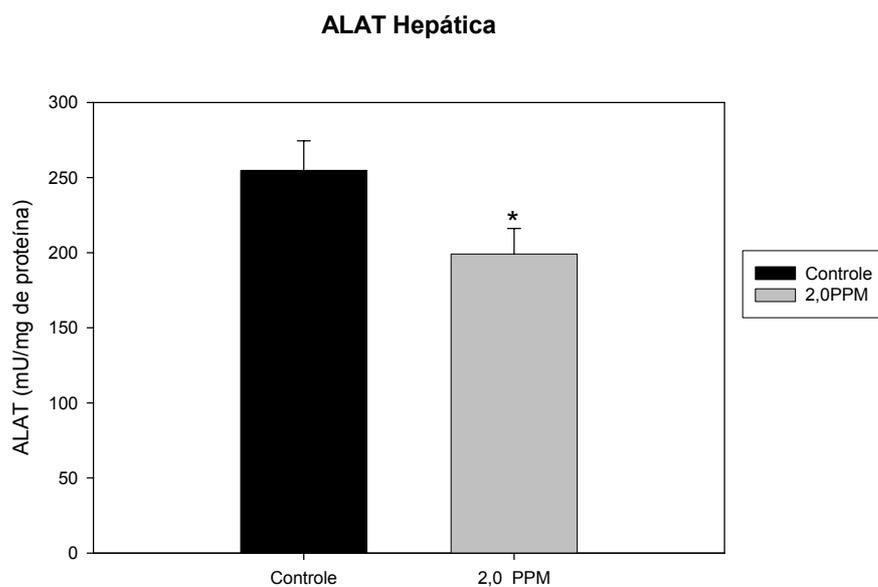


FIGURA 25. Valores médios \pm EPM das atividades específicas da ALAT de fígado (mU/mg de proteína) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (*= $p < 0,05$).

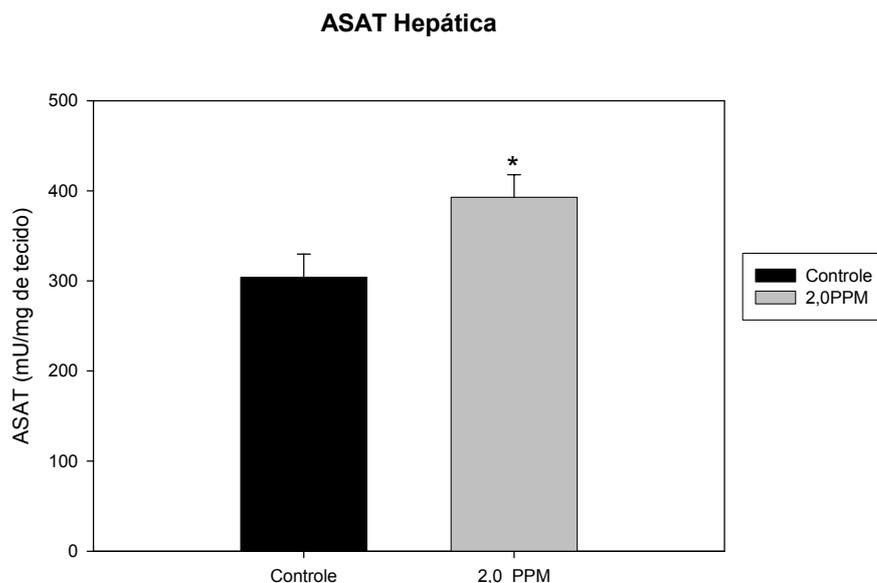


FIGURA 26. Valores médios \pm EPM das atividades específicas da ASAT de fígado (mU/mg de proteína) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (*= $p < 0,05$).

4.2.3.1.8 PK

As médias \pm EPM das atividades específicas da PK hepática estão apresentadas na TABELA 5, sendo expressas em mU/mg de proteína. As médias dos grupos controle e tratado com fenol não foram estatisticamente diferentes.

4.2.3.2 Músculo Branco

4.2.3.2.1 LDH

As médias \pm EPM das atividades específicas da LDH muscular estão apresentadas na TABELA 6, sendo expressas em mU/mg de proteína. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias do grupo controle e do grupo dos animais tratados com fenol.

4.2.3.2.2 MDH

As médias \pm EPM das atividades específicas da MDH muscular estão apresentadas na TABELA 6, sendo expressas em mU/mg de proteína. As médias observadas no controle não foram estatisticamente diferentes daquelas observadas nos peixes expostos ao fenol.

4.2.3.2.3 ALAT

As médias \pm EPM das atividades específicas da ALAT muscular estão apresentadas na TABELA 6 e no FIGURA 27, sendo expressas em mU/mg de proteína. Houve um aumento significativo na atividade da ALAT de quase 31%. O valor médio do controle foi de $28,79\pm 3,779$, enquanto nos peixes tratados com fenol foi de $41,45\pm 4,516$.

4.2.3.2.4 ASAT

As médias \pm EPM das atividades específicas da ASAT muscular estão apresentadas na TABELA 6 e no FIGURA 28, sendo expressas em mU/mg de proteína. Assim como a ALAT, a ASAT também apresentou um aumento significativo em sua atividade. As médias subiram de $143,7\pm 8,39$ no controle para $188,8\pm 16,99$ nos animais expostos ao fenol, um aumento de quase 24%.

4.2.3.2.5 PK

As médias \pm EPM das atividades específicas da PK muscular estão apresentadas na TABELA 6 e no FIGURA 29, sendo expressas em mU/mg de proteína. Houve uma redução significativa de quase 20% na atividade da PK no

músculo branco dos animais expostos ao fenol. O valor encontrado para o controle foi de $4646 \pm 337,7$ e para os animais expostos foi de $3740 \pm 233,3$.

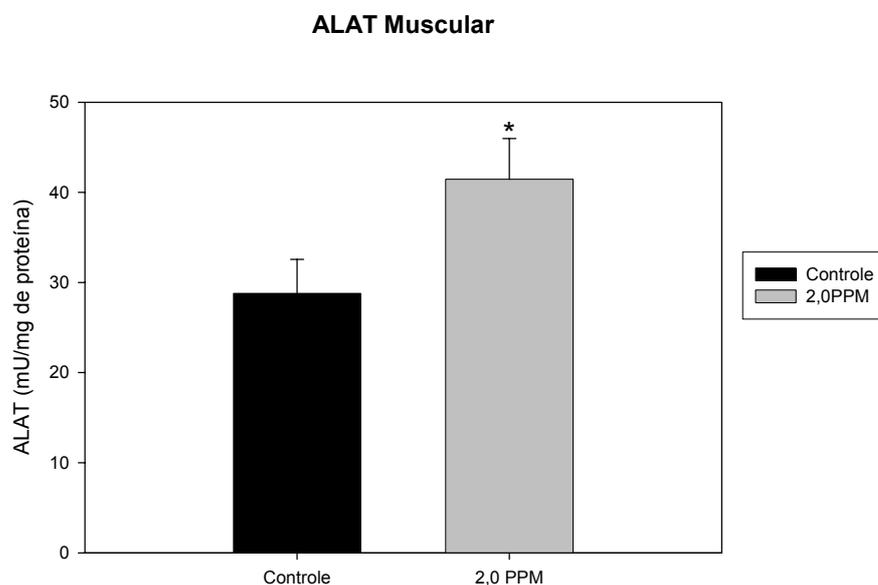


FIGURA 27. Valores médios \pm EPM das atividades específicas da ALAT de músculo branco (mU/mg de proteína) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (*= $p < 0,05$).

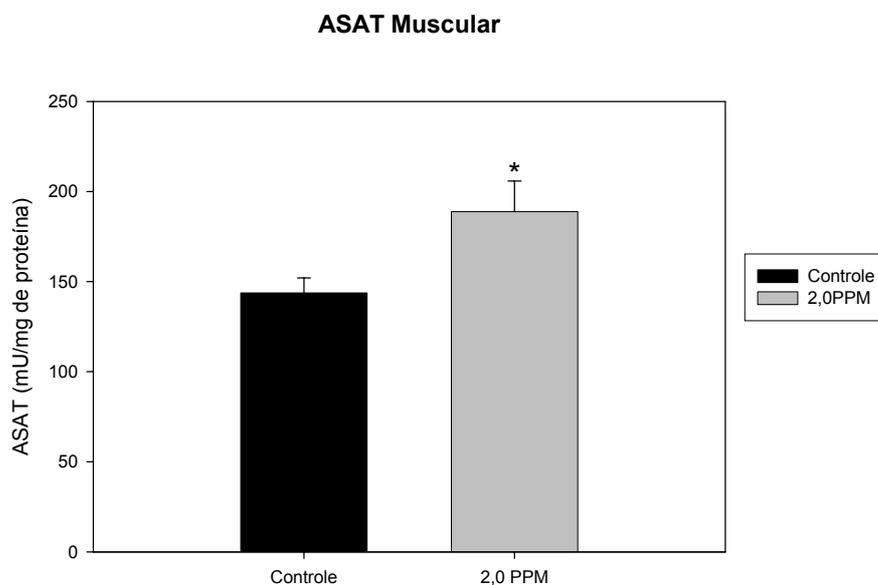


FIGURA 28. Valores médios \pm EPM das atividades específicas da ASAT de músculo branco (mU/mg de proteína) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (*= $p < 0,05$).

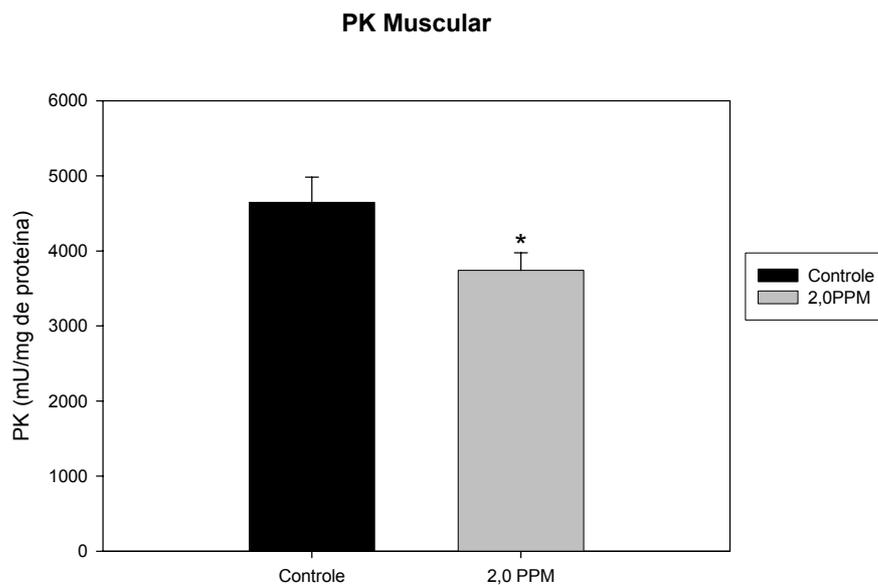


FIGURA 29. Valores médios \pm EPM das atividades específicas da PK de músculo branco (mU/mg de proteína) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (*= $p < 0,05$).

4.2.3.3 Plasma

4.2.3.3.1 FAC

As médias \pm EPM das atividades específicas da FAC plasmática estão apresentadas na TABELA 7, sendo expressas em mU/mg de proteína. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos grupos.

4.2.3.3.2 FALC

As médias \pm EPM das atividades específicas da FALC plasmática estão apresentadas na TABELA 7, sendo expressas em mU/mg de proteína. Os animais expostos ao fenol e aqueles do grupo controle apresentaram médias que não foram significativamente diferentes.

4.2.3.3.3 LDH

As médias \pm EPM das atividades específicas da LDH plasmática estão apresentadas na TABELA 7 e no FIGURA 30, sendo expressas em mU/mg de proteína. A atividade da LDH apresentou uma redução significativa de quase 53%, caindo de 158,5 \pm 30,2 para 75,87 \pm 19,34.

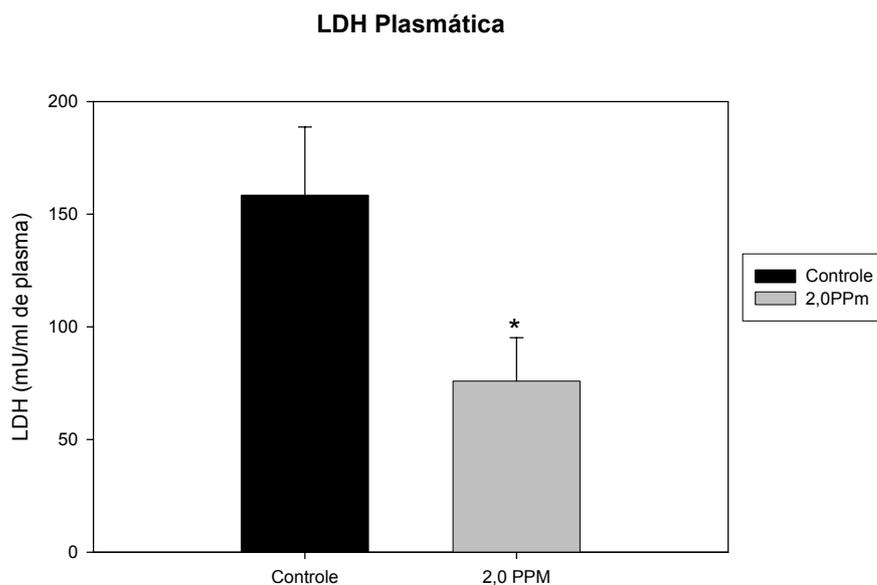


FIGURA 30. Valores médios \pm EPM das atividades específicas da LDH plasmática (mU/mg de proteína) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (*= $p < 0,05$).

4.2.3.3.4 ALAT

As médias \pm EPM das atividades específicas da ALAT plasmática estão apresentadas na TABELA 7, sendo expressas em mU/mg de proteína. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos peixes no grupo controle e aqueles expostos ao fenol.

4.2.3.3.5 ASAT

As médias \pm EPM das atividades específicas da ASAT plasmática estão apresentadas na TABELA 7 e no FIGURA 31, sendo expressas em mU/mg de proteína. Houve uma redução significativa na atividade da ASAT no plasma, que caiu de $5,074\pm 0,8402$ no controle para uma média de $1,927\pm 0,3036$ nos animais expostos ao fenol. Essa redução foi de aproximadamente 71%.

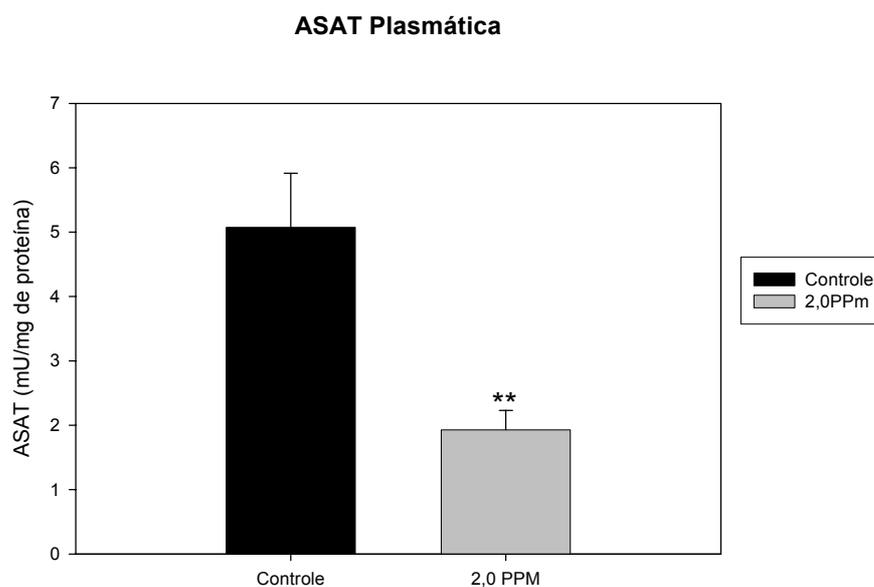


FIGURA 31. Valores médios \pm EPM das atividades específicas da ASAT plasmática (mU/mg de proteína) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 2ppm de fenol (**= $p < 0,01$).

4.3 Segundo experimento de exposição ao fenol

4.3.1 Indicadores de estresse

4.3.1.1 Glicose plasmática

Os valores médios \pm EPM da glicose plasmática estão apresentados no FIGURA 32, sendo expressos em mg/dl. A glicose plasmática não apresentou diferença significativa entre a coleta de 0h e 96h. Dentro da coleta de 96h não houve diferença entre os grupos controle e exposto ao fenol. O grupo controle e exposto a 2,0

ppm responderam significativamente ao estresse de manuseio (“handling stress”), porém o nível de glicose do grupo exposto 0,2 ppm não apresentou diferença significativa. O grupo controle foi significativamente diferente dos grupos expostos na coleta de 1h e 12h. As diferenças ao longo do tempo permaneceram significativas até 6h, após esse período os grupos já se mostraram estatisticamente iguais à coleta de 96h.

4.3.1.2 Cortisol

Os valores médios \pm EPM do cortisol plasmático estão apresentados no FIGURA 33, sendo expressos em ng/ml. A concentração de cortisol não apresentou diferenças significativas entre a coleta de 0h e 96h e nem entre os tratamentos dentro das coletas. Os grupos controle e exposto a 2,0 ppm responderam significativamente ao estresse de manuseio e os níveis de cortisol mostraram uma elevação na coleta de 1h. Esses dois grupos foram também significativamente diferentes do grupo exposto a 0,2 ppm, que permaneceu constante ao longo do tempo. O grupo exposto a 2,0 ppm teve níveis de cortisol elevados ainda na coleta de 24h, enquanto no grupo controle os níveis de cortisol nas 24h já não eram diferentes dos níveis em 96h.

4.3.1.3 Potássio Plasmático

Os valores médios \pm EPM do potássio plasmático estão apresentados no FIGURA 34, sendo expressos em mEq/ml. Os níveis de potássio plasmático foram significativamente menores entre a coleta de 0h e de 96h, exceto no grupo exposto a 2ppm. Esse grupo foi significativamente diferente dos dois outros dentro de todas as coletas, excetuando-se a de 12h e, no entanto, permaneceu constante ao longo do tempo. Nos outros grupos excetuando o controle, as coletas após o estresse de manuseio não foram diferentes da coleta de 96h, mas foram diferentes da de 0h.

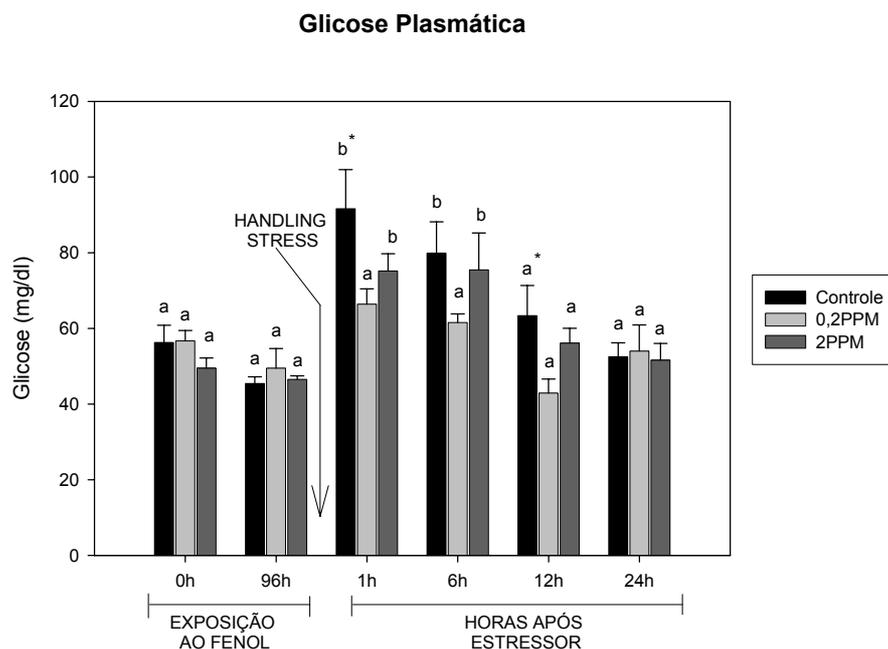


FIGURA 32. Valores médios±EPM das concentrações de glicose plasmática (mg/dl) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 0,2 ppm e 2 ppm de fenol (*= $p < 0,05$ dentro do tratamentos e letras diferentes= $p < 0,05$ entre os tratamentos).

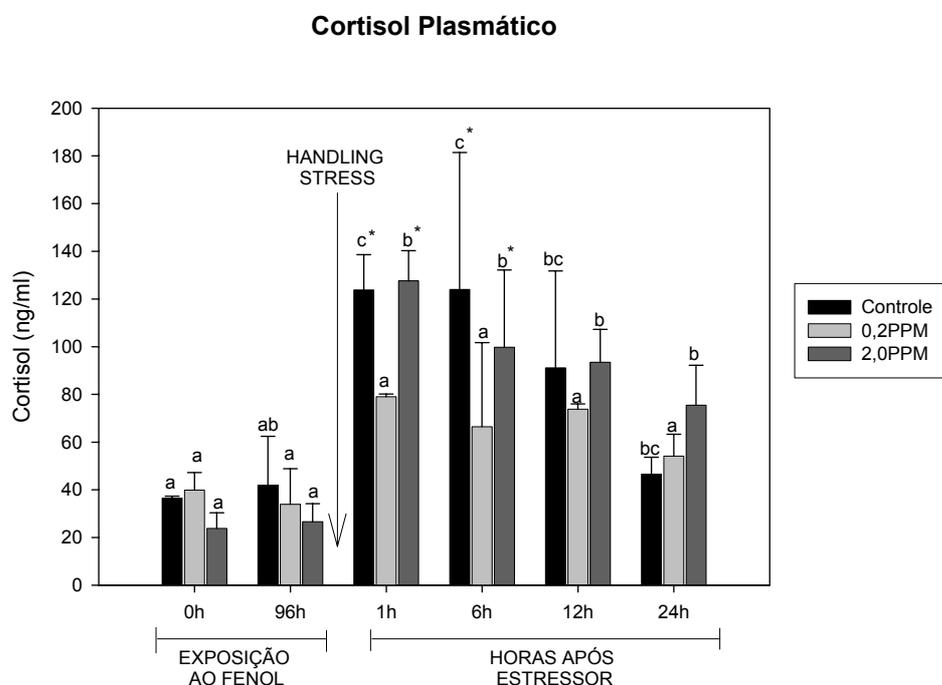


FIGURA 33. Valores médios±EPM das concentrações de cortisol plasmático (ng/ml) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 0,2 ppm e 2 ppm de fenol (*= $p < 0,05$ dentro do tratamentos e letras diferentes= $p < 0,05$ entre os tratamentos).

4.3.1.4 Sódio Plasmático

Os valores médios \pm EPM do sódio plasmático estão apresentados no FIGURA 35, sendo expressos em mEq/ml. Os níveis de sódio no plasma do matrinxã foram significativamente menores na coleta de 96h quando comparada à coleta de 0h. Nessa coleta os níveis do controle foram significativamente maiores que os outros grupos. O grupo controle apresentou uma redução adicional após o estresse de manuseio e assim permaneceu ao longo do tempo. Os outros grupos não apresentaram diferenças ao longo da recuperação. O grupo exposto a 0,2 ppm foi significativamente diferente dos outros grupos na coleta de 96h e o mesmo ocorreu com o grupo de 2,0 ppm nas duas últimas coletas (12h e 24h).

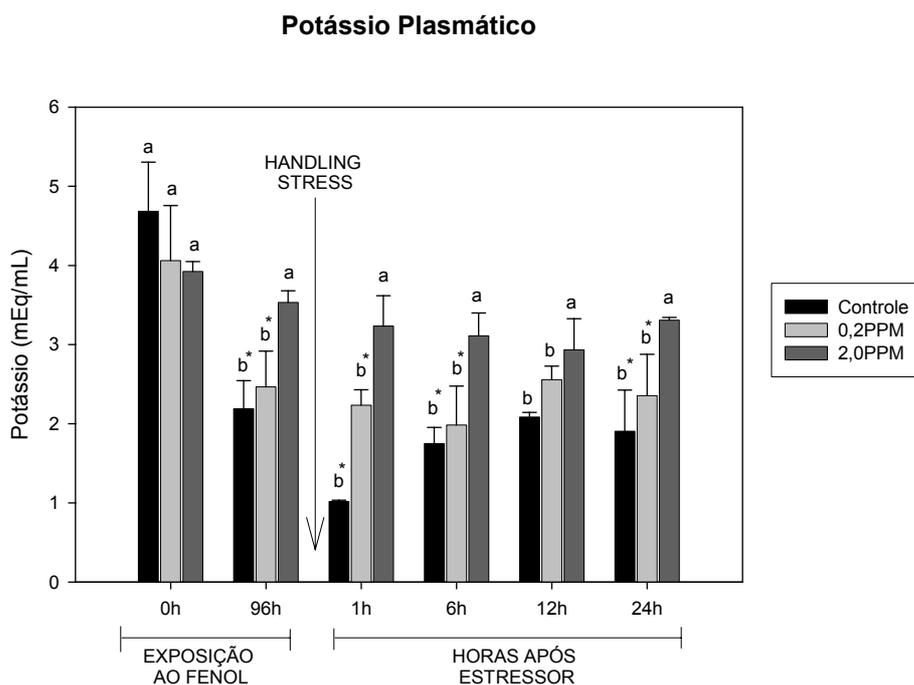


FIGURA 34. Valores médios \pm EPM das concentrações de potássio plasmático (mEq/ml) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 0,2 ppm e 2 ppm de fenol (*= $p < 0,05$ dentro do tratamentos e letras diferentes= $p < 0,05$ entre os tratamentos).

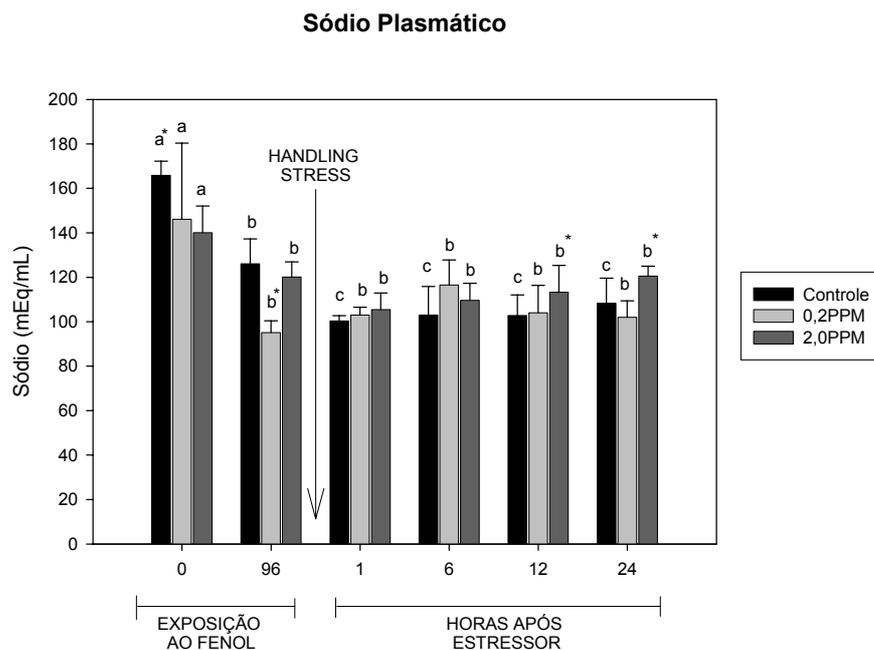


FIGURA 35. Valores médios \pm EPM das concentrações de sódio plasmático (mEq/ml) de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 0,2ppm e 2ppm de fenol (*= $p < 0,05$ dentro do tratamentos e letras diferentes= $p < 0,05$ entre os tratamentos).

4.3.1.5 HSP70

a) Fígado

As médias \pm EPM do conteúdo de HSP70 no tecido hepático estão apresentadas no FIGURA 36 e na FIGURA 40, sendo expressas em unidades de densidade óptica (OD). As HSP70 caíram significativamente em todos os tratamentos da coleta de 0h para a de 96h, sendo que nessa última o tratamento de 2,0 ppm mostrou uma redução significativamente maior. Essa diferença persistiu na coleta de 1h. Os outros tratamentos não foram diferentes da coleta de 0h ou de 96h ao longo de toda a recuperação.

b) Brânquias

As médias \pm EPM do conteúdo de HSP70 no tecido branquial estão apresentadas no FIGURA 37 e na FIGURA 41, sendo expressas em unidades de

densidade óptica (OD). Não houve diferença entre o tratamento de 0h e de 96h, sendo que nesse tratamento houve uma redução no conteúdo de HSP70 dos animais tratados, mas essa diferença não foi significativa. No entanto, na coleta seguinte (1h) o tratamento de 2,0 ppm apresentou uma redução significativa e foi diferente da coleta de 96h e dos outros grupos. Essa diferença permaneceu na coleta de 6h e nas coletas seguintes os 3 grupos já não apresentavam diferenças em relação às coletas de 96h e 0h e nem entre si.

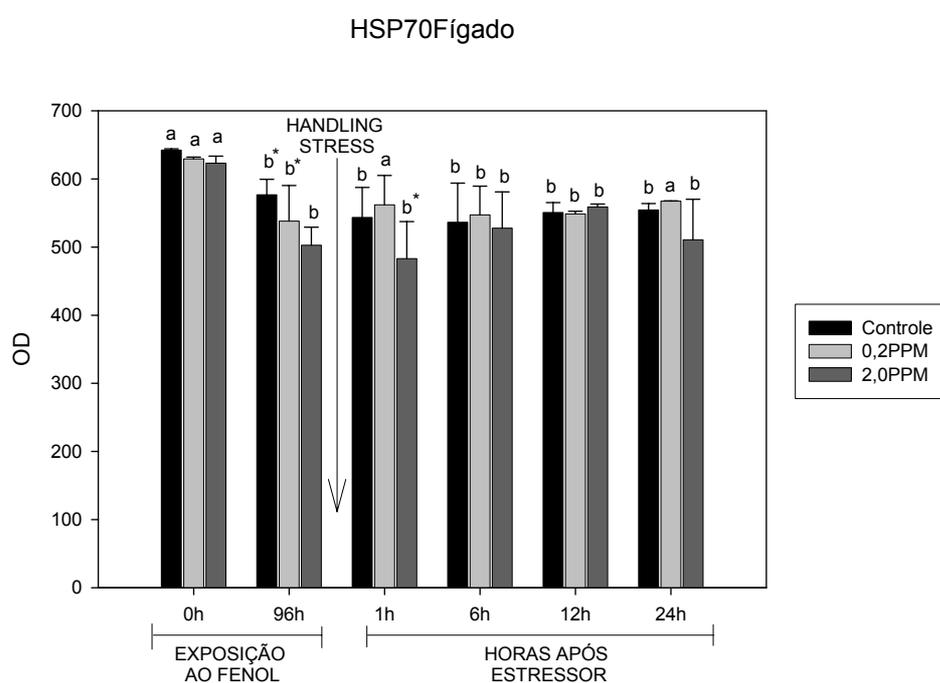


FIGURA 36. Valores médios \pm EPM das concentrações de HSP70 (OD) no tecido hepático de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto à 0,2 ppm e 2 ppm de fenol (*= $p < 0,05$ dentro do tratamentos e letras diferentes= $p < 0,05$ entre os tratamentos)

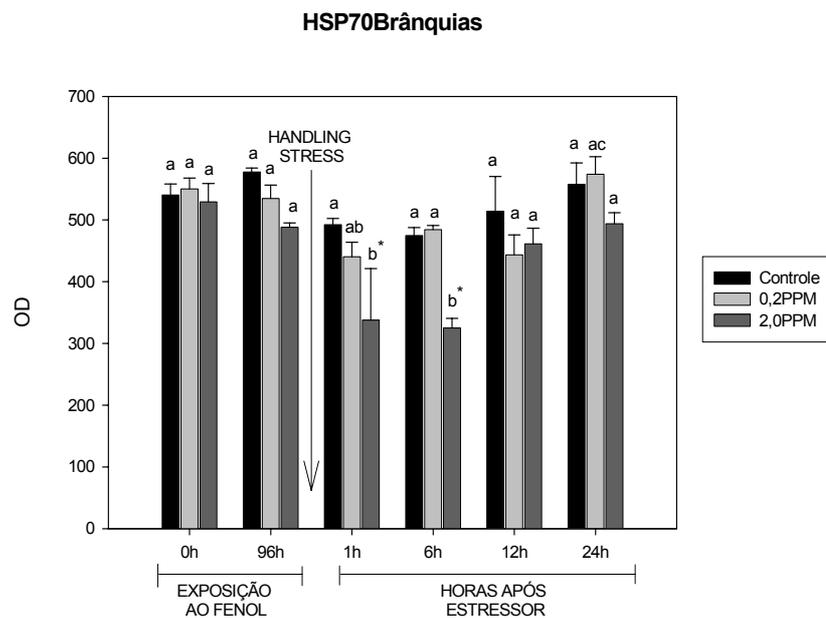


FIGURA 37. Valores médios \pm EPM das concentrações de HSP70 (OD) no tecido branquial de *B. cephalus* nos grupos controle e exposto a 0,2 ppm e 2 ppm de fenol (*= $p < 0,05$ dentro dos tratamentos e letras diferentes= $p < 0,05$ entre os tratamentos).

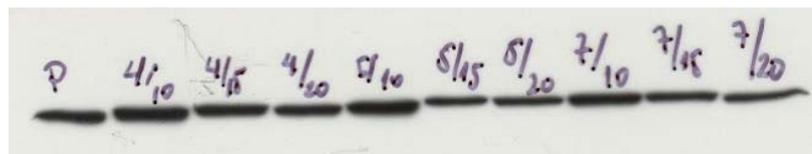


FIGURA 38. Bandas da HSP70 branquial incubada em diversas concentrações dos anticorpos primário e secundário. A fração representa no numerador a diluição do anticorpo primário e no denominador a diluição do anticorpo secundário (X1000). P (Controle Positivo)

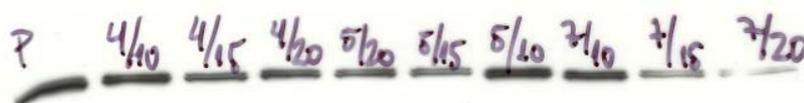


FIGURA 39. Bandas da HSP70 hepática incubada em diversas concentrações dos anticorpos primário e secundário. A fração representa no numerador a diluição do anticorpo primário e no denominador a diluição do anticorpo secundário (X1000). P (Controle Positivo)

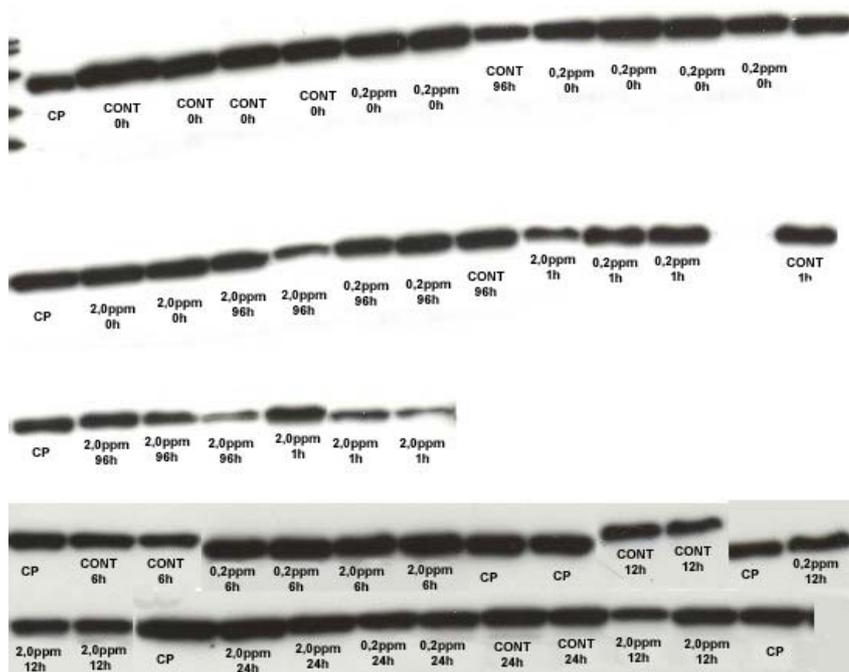


FIG. 40 Bandas da HSP70 no fígado de alguns exemplares de *B. cephalus* exposto ao fenol. CONT (Controle) e CP (Controle positivo).

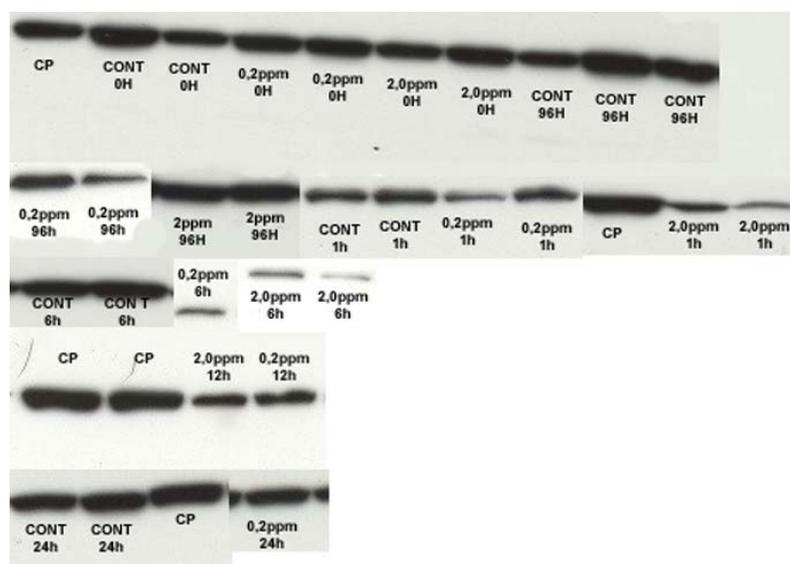


FIG. 41 Bandas da HSP70 nas brânquias de alguns exemplares de *B. cephalus* exposto ao fenol. CONT (Controle) e CP (Controle positivo).

5. DISCUSSÃO

5.1 Teste de Toxicidade CL₅₀/96h

Os testes de toxicidade permitem o cálculo da CL₅₀, que, por sua vez, indica qual é a dose limite considerada como exposição letal (HEATH, 1995). A CL₅₀/96h encontrada para o matrinxã foi de 17,4 ppm. Os dados presentes na literatura mostram uma faixa de CL₅₀/96h que vai de 12,53 para *N. notopterus* (GUPTA et al., 1986) a 47,5 para *L. reticulatus* (GUPTA et al., 1982). Assim, a CL₅₀ do matrinxã fica bem próxima ao limite inferior dessa faixa, indicando que essa espécie é bastante sensível à esse poluente.

A resolução CONAMA n.20 (BRASIL, 1986) determina que a concentração máxima de fenol permitida em águas da classe I (destinadas à conservação da vida aquática) é de 0,001 mg/L (0,001 ppm). Todas as CL₅₀ para peixes encontradas na literatura estão muito acima dessa concentração numa ordem de cerca de 10.000 vezes. Mesmo considerando outros seres vivos, essa concentração está extremamente abaixo das letais ou efetivas. Por exemplo, para *Daphnia pulex* (Crustacea), *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) e colônias mista de bactérias os EC₅₀ (doses efetivas para metade da população) para o fenol foram de respectivamente 25, 403 e 510 mg/L (TISLER & KOCAN, 1996). Isso mostra que a legislação brasileira é bastante severa em relação a poluentes orgânicos como o fenol, uma vez que a concentração permitida por lei está longe de ser letal para qualquer uma das espécies testadas, inclusive o *B. cephalus*. Essa severidade pode estar relacionada com o grande potencial que esse tóxico tem para bioacumulação.

Segundo a classificação para os tóxicos (VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION, 1996) o fenol apresenta uma toxicidade leve para o *B. cephalus*. Assim como para outros peixes, essa classificação pode levar a uma visão enganadora sobre o

potencial danoso do fenol. Nesse trabalho foi possível observar que mesmo concentrações tão baixas como 0,2 ppm (cerca de 1% da CL₅₀/96h) são capazes de provocar alterações na fisiologia do *B. cephalus*. Logo, apesar de não causar mortalidade, a presença do fenol, mesmo em baixas concentrações afeta os animais a ele submetido e, portanto, apresenta um risco à manutenção da vida. Se considerarmos a piscicultura, então o problema pode ser maior, porque a mortalidade não é o único problema numa criação de peixes. O matrinxã é uma espécie que apresenta o potencial para o cultivo e neste trabalho pudemos observar que a intoxicação com o fenol causa uma série de distúrbios em seu metabolismo. Essas alterações, sem dúvida, mostram o alto risco de prejuízo no seu cultivo sob contaminação de fenol, sem considerarmos os possíveis danos, não avaliados neste trabalho, advindos de sua ação crônica e extensivos a outras espécies de sua cadeia alimentar, incluindo-se o homem.

Os parâmetros de qualidade de água não apresentaram nenhuma variação significativa durante o experimento, mostrando que pelo menos nessa concentração (2 ppm) o fenol não é capaz de induzir mudanças nas suas propriedades físico-químicas.

5.2 Primeiro experimento de exposição ao fenol

5.2.1 Parâmetros hematológicos

O hematócrito dos animais expostos ao fenol apresentou uma redução significativa, assim como o número total de células vermelhas (RBC). Outros trabalhos mostram que o fenol é capaz de induzir essa redução (ROCHE & BOGÉ, 2000; BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004). Além disso, os níveis de metahemoglobina também foram maiores nos animais expostos ao fenol. A capacidade dos fenóis de induzir a formação de metahemoglobina já foi demonstrada *in vitro* utilizando-se

eritrócitos bovinos e humanos (STOLZE et al., 1996; VALENTOVIC, et al., 1997; BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004).

A redução no hematócrito parece ser unicamente função da redução na RBC, fruto de uma possível hemólise, já que não houve nenhuma alteração do VCM. Essa hemólise pode ser resultado da diminuição da meia vida das células vermelhas, causada pela formação da metahemoglobina. Isso pode causar, a longo prazo, um estado de anemia hemolítica, como o encontrado em casos de intoxicação com nitrito (SCARANO & SOROGLIA, 1984; AVILEZ, 2002; HORI, 2002). Existem evidências de que os compostos fenólicos (p-hydroxyanisole) são capazes de comprometer diretamente a integridade dos eritrócitos (NOHL & STOLZE, 1998), sendo que essa propriedade pode também ser uma das responsáveis pela redução na meia vida dos eritrócitos. Um composto fenólico que causa altos níveis de hemólise é o catecol, que é um dos produtos da fase I da biotransformação do fenol. BOGÉ & ROCHE (1996) mostraram que esse composto induz 70% de hemólise em *Dicentrarchus labrax*, quando na concentração de 1 mM.

Uma vez ocorrida hemólise, uma série de conseqüências danosas ligadas à liberação da hemoglobina podem ocorrer. Dentre estas estão: a formação de dímeros tóxicos de Hb, indução de heme oxigenases, liberação do grupo heme e do ferro hemínico, sendo que esse último atua como pro-oxidante e aumenta o risco de infecções bacterianas (EVERSE & HSIA, 1997). Os níveis de hemoglobina diminuíram nos animais tratados, mas essa diferença não foi significativa. De qualquer forma, uma redução nos níveis de hemoglobina total é compreensível, uma vez que o organismo tende a metabolizar a hemoglobina liberada devido à hemólise. Por outro lado, não foi possível detectar diferenças na HCM e nem na CHCM. Além disso, outros trabalhos realizados com *D. labrax* mostram pequenos, porém significativos, aumentos na

concentração total de Hb (ROCHE & BOGÉ, 1996; ROCHE & BOGÉ 2000). No entanto, a exposição ao efluente da produção de papel Kraft, que é rica em compostos fenólicos, causa redução na hemoglobina total (HEATH, 1995). CHEN (2002) trabalhando com *Clarias leather* exposto ao fenol também encontrou reduções nos níveis de hemoglobina.

A formação de metahemoglobina reduz a capacidade sanguínea de transporte de oxigênio devido à oxidação do ferro hemínico. Altas concentrações de metahemoglobina induzem um estado fisiológico chamado hipóxia funcional, podendo levar à morte (CAMERON, 1971). A oxidação da oxihemoglobina à metahemoglobina segue uma reação de co-oxidação em que o oxigênio no grupo heme funciona como oxidante ativo tanto do ferro hemínico quanto do xenobiótico redutor (R-H) (RILEY, 1984).



Em condições normais, enzimas anti-oxidantes endógenas como a catalase, a super óxido dismutase e a glutathione peroxidase atuam para eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, se a produção de oxidantes superar a capacidade de “clearance” celular o eritrócito entra num estado de estresse oxidativo. A intoxicação com fenol leva a uma redução significativa nos níveis de GSH dos eritrócitos, o que faz supor que este composto está sendo utilizado para manter os potenciais de redução assim evitar a ação danosa do fenol (BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004). A GSH peroxidase também apresenta atividade aumentada em *D. labrax* exposto ao fenol (ROCHE & BOGÉ, 1996). Essa enzima faz uso da GSH e pode ser, em partes, responsável pela redução nos níveis da mesma. A formação de metahemoglobina pode estar contribuindo para a formação de ROS e indução de um estado de estresse oxidativo (STOLZE et al., 1996). Assim, a intoxicação com fenol causa não só

alterações hematológicas, mas pode, potencialmente, estar produzindo uma cascata de efeitos danosos ao organismo como um todo.

6.2.2 Metabolismo intermediário

Como em outros peixes (HOLMBERG et al., 1972; DALELA et al., 1980; GUPTA et al., 1983; REDDY et al., 1993) a exposição ao fenol causou diversas alterações no metabolismo do matrinxã. Tanto as enzimas como os metabólitos testados foram responsivos à intoxicação. Dois conjuntos de vias metabólicas parecem ser bastante alteradas pela exposição ao fenol, sendo elas o metabolismo de carboidratos e o metabolismo de proteínas.

Considerando-se o metabolismo protéico pudemos detectar aumentos significativos nas atividades das transaminases no músculo branco. No músculo branco tanto as atividades de ALAT quanto de ASAT aumentaram. No fígado somente a atividade de ASAT aumentou, havendo uma redução na atividade de ALAT. Essa redução é, no entanto, provavelmente resultado de um possível dano tissular causado pelo fenol. As atividades de ALAT no fígado e no plasma são comumente utilizadas como indicativos de danos ao tecido hepático (AGUIAR et al., 2004). No presente estudo, a atividade de ALAT no plasma aumentou, mas esse aumento não foi significativo. Aliando-se esses dois resultados, temos indicativos de que o fenol é capaz de causar danos à integridade do tecido hepático. BUCHER (1993) já demonstrou uma série de efeitos histopatológicos no fígado e brânquias de *O. mykiss* exposta ao fenol.

Os aumentos na atividade da ASAT acompanhado de uma redução significativa do conteúdo de proteínas totais no fígado e um aumento nos níveis de amônia hepática, indicam que o matrinxã metabolizou proteínas como uma forma de obter energia. Por outro lado, a redução de proteína hepática pode ser resultado do seu

extravasamento para o plasma devido a danos nesse tecido. Essa hipótese ajuda e explicar o aumento significativo de proteínas no plasma. Esses efeitos, no entanto, não são incompatíveis e podem estar ocorrendo concomitantemente. Em *N. notopterus* o aumento da atividade de transaminases de músculo e fígado também é reportado (GUPTA et al., 1984). Esse quadro proteolítico se mostra evidente principalmente no fígado, uma vez que no músculo não há redução de proteína nem aumento de amônia. O aumento de proteínas no músculo branco pode ser, no entanto, resultado da ação de proteases não específicas atuando sobre proteínas estruturais que, por consequência, produzem peptídeos menores que aumentariam a concentração de proteínas citoplasmáticas. Os níveis de proteína hepática e muscular aparecem reduzidos entre 7,9% e 45% em *O. mossambicus* exposto ao fenol (RAVICHANDRAN et al., 1994), e entre 26% e 59% no músculo e cérebro de *C. punctatus* (REDDY et al., 1993). Outros tóxicos apresentam essa redução no conteúdo de proteínas tanto de fígado quanto de músculo. A exposição ao dimetoato provoca reduções de 40% no fígado e 30% no músculo de *Colisa fasciatus* (SINGH et al., 2004). A intoxicação com vanádio provoca redução na proteína corpórea total de *Clarias batrachus* (CHAKRABORTY et al., 1998). As diferenças entre os resultados de concentração de proteínas do músculo em matrinxã e os encontrados para outros peixes podem também estar relacionadas ao tempo de exposição. Talvez 96 horas de exposição não seja o suficiente para induzir um aumento maior na proteólise do tecido muscular. Exposições de 30 dias chegam a inibir a atividade da SDH além de provocar reduções na proteína muscular, o que indica que há inclusive redução do metabolismo oxidativo (DALELA et al., 1980); fato esse também não observado nesse trabalho. LEVESQUE e colaboradores (2002) sugerem que um peixe exposto a poluentes deve apresentar maior consumo de glicose além de produzi-la em maior quantidade a partir de fontes neoglicogênicas. Uma dessas fontes

são os aminoácidos (MORAES et al., 2002). Neste trabalho verificamos que o conteúdo de aminoácidos no fígado e no plasma diminuiu significativamente. Isso pode significar que parte dos aminoácidos produzidos pela hidrólise de proteínas está sendo utilizada como substrato para neoglicogênese. A glicose resultante é utilizada principalmente para manter a glicemia. Um estudo com *O. mossambicus* mostra que as concentrações de aminoácidos hepáticos aumentam após 24 horas de exposição ao fenol e depois caem gradualmente em 48 e 96 horas (RAVICHANDRAN et al., 1994). Nesse estudo, as concentrações não chegam a ser menores que as do controle, mas isso pode estar relacionado com os diferentes hábitos dos peixes em questão. A tilápia é uma espécie mais calma, enquanto o matrinxã é um peixe que apresenta constante atividade e, portanto, uma maior demanda metabólica. Esses dados também podem ajudar a entender porque apesar de haver um aumento significativo na atividade das duas transaminases no músculo branco, indicando aumento de proteólise, não houve aumento na concentração muscular de aminoácidos livres. Pode ser que os aminoácidos liberados pela proteólise estejam sendo consumidos para gerar energia.

Um aumento no metabolismo de proteínas pode estar relacionado com aumentos nos níveis de cortisol. Um outro efeito conhecido do cortisol é o aumento na atividade das transaminases e da neoglicogênese (IWAMA et al., 1997; MOMMSEN et al., 1999). No presente trabalho, não encontramos diferença entre os níveis controle de cortisol e dos animais expostos após 96h. No entanto, outros trabalhos mostram que a injeção intrapeitoral de fenol induz aumentos na cortisolemia (ROCHE & BOGÉ, 1996; ROCHE & BOGÉ, 2000). Além disso, em *O. mykiss* exposta ao fenol os níveis de cortisol se mostram aumentados após 5 horas, porém após 24 horas retornam aos níveis iniciais (SWIFT, 1981). Talvez nesses experimentos os matrinxãs tenham inicialmente apresentado uma cortisolemia alta que tenha induzido aumentos no

metabolismo proteolítico mas que, no momento da coleta já estavam reduzidos . Essa alteração no metabolismo energético pode inclusive inibir o crescimento desses animais (HEATH, 1987). Crescimento reduzido devido à exposição ao fenol já foi demonstrado em outras espécies como *O. mossambicus* (SAHA, 1999; GHOSH, 1983).

Considerando o metabolismo de carboidratos, pudemos observar que as reservas de glicogênio hepático foram reduzidas pela exposição ao fenol. AHMAD (1979) apud. BEGUM & VIJAYARAGHAVAN (1995) levantou a hipótese de que a síntese das enzimas de desintoxicação pode levar à depleção das reservas de glicogênio hepático. Essa demanda energética poderia também explicar porque aparentemente ocorreu proteólise no fígado e não no músculo branco. O glicogênio muscular permaneceu inalterado, o que faz sentido se consideramos que o matrinxã é um peixe reofílico, que mantém o glicogênio muscular como última reserva energética para a migração durante o período da reprodução.

Os carboidratos são, em geral, a primeira fonte energética utilizada para lidar com situações adversas como, por exemplo, intoxicação. Doses letais de vários poluentes, inclusive fenol, causam reduções nas reservas de glicogênio hepático e muscular em *O. mossambicus* (DANGÉ, 1986). A exposição ao PCP resulta em redução do glicogênio muscular de *A. anguilla* (HOLMBERG et al., 1972) e de cérebro e músculo de *C. punctatus* (REDDY et al., 1993). Em *C. fasciatus* a exposição aos pesticidas dimetoato e ao carbaril também provoca reduções no glicogênio hepático e muscular (SINGH, 2004). Além desses, o vanádio também provoca reduções significativas no glicogênio hepático (CHAKRABORTY et al., 1998). Os níveis de glicose também foram menores tanto no fígado quanto no músculo branco de matrinxã. A degradação do glicogênio hepático provavelmente foi resultante da necessidade de uma fonte de glicose para manutenção das funções vitais,

principalmente no cérebro. A exposição ao fenol causa uma redução de quase 61% na glicose cerebral em *C. punctatus* (REDDY, 1993). Essa estratégia pode ter funcionado durante um período, no entanto, uma constante demanda energética pode ter levado a uma mudança na direção de outra fonte energética. No caso do *B. cephalus* uma possível nova fonte energética são as proteínas (LEVESQUE et al., 2002).

Além dos aminoácidos outras fontes de carbono foram provavelmente utilizadas como substrato para neoglicogênese. Os níveis de lactato muscular apresentaram uma grande redução, assim como os níveis plasmáticos. No fígado, os níveis de lactato permaneceram inalterados. Isso leva a crer que o fígado estivesse importando lactato de outros tecidos e utilizando-o como substrato para neoglicogênese (HOCHCHAKA, 1980). O aumento na atividade da LDH hepática suporta essa idéia, uma vez que o Km dessa enzima mostra uma maior afinidade da isoenzima hepática pelo lactato (LEHNINGHER, 2004). Uma vez que essa enzima converteu lactato em piruvato, este pode ser convertido em fosfoenolpiruvato por uma das vias para essa conversão. Os níveis de piruvato hepático estavam reduzidos nos animais expostos ao fenol, o que corrobora a idéia de que o fígado apresenta um perfil neoglicogênico. O piruvato muscular aumentou nos animais tratados em contraste com uma redução na atividade da PK. Isso indica que o músculo branco pode ter um perfil gliceroneoglicogênico ou está importando piruvato de outras fontes, provavelmente o fígado. O piruvato é um elemento vital para a manutenção tanto do metabolismo oxidativo quanto anaeróbico, já que é o substrato inicial nos dois casos (LEHNINGHER, 2004). A redução na atividade de PK também confirma a redução no catabolismo de glicose, uma vez que essa é uma enzima chave e um passo não reversível da glicólise. Em contraste a esse quadro, a atividade de PK hepática não

apresentou alterações. Isso sustenta a idéia de que o músculo branco de *B. cephalus* tende a manter suas reservas de carboidratos por mais tempo.

A exposição a pesticidas geralmente induz um estado de anóxia celular que aumenta o metabolismo anaeróbico de glicose e reduz o metabolismo oxidativo (BHAVAN & GERALDINE, 1997; AGUIAR et al., 2004). O mesmo quadro é geralmente encontrado com exposição a metais pesados (CHAKRABORTY et al., 1998). No caso da exposição ao fenol, parece ocorrer um quadro oposto. A atividade da MDH aumentou tanto no músculo branco quanto no fígado, sendo que no músculo esse aumento não foi significativo. A atividade da MDH indica que houve um aumento no metabolismo oxidativo. A exposição ao PCP leva a um aumento na atividade da citocromo oxidase em *A. anguilla* (BOSTRÖM & JOHANSSON, 1972). O aumento no metabolismo oxidativo pode ser resultado de uma demanda metabólica aumentada pela intoxicação. Todo o processo de desintoxicação exige além da síntese do maquinário enzimático, energia para que os processos de hidroxilação, conjugação e excreção ocorram (McKIM et al., 1999; TONG & JAMES, 2000). Por outro lado, diversos compostos fenólicos são conhecidos por serem desacopladores da cadeia respiratória. LOOMIS & LIPMAN (1948) mostraram que os dinitrofenóis inibem a formação de compostos fosfatados ricos em energia, como por exemplo, o trifosfato de adenosina (ATP). Um caso de falta de ATP devido ao desacoplamento da cadeia respiratória pode aumentar a demanda pelo mesmo. Essa demanda por sua vez, pode ser o que está provocando o aumento no metabolismo oxidativo do matrinxã. É claro que esses dois mecanismos não são auto-exclusivos e podem estar ocorrendo simultaneamente, ou até mesmo, sinergisticamente, sendo responsáveis por boa parte das alterações metabólicas observadas no presente trabalho.

6.3 Segundo experimento de exposição ao fenol

6.3.1 Indicadores de stress

6.3.1.1 Glicose e Cortisol

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que o fenol, assim como outros poluentes (HONTELA, 1997), atua como desorganizador endócrino. O tratamento de 0,2 ppm apresentou uma redução significativa dos níveis cortisol plasmático e, por conseqüência, de glicose, em resposta a um estresse de manuseio. No entanto, o mecanismo pelo qual o fenol é capaz de inibir a secreção de cortisol não fica claro com os resultados obtidos. Esse composto pode atuar em diversos momentos da resposta gerando esse efeito (HONTELA, 1997, FIG.3). Outros compostos fenólicos, como os bifenis-policlorados (PCBs), são capazes de induzir o mesmo efeito e é sugerido que isso se deva à capacidade desses compostos de induzir os citocromos P-450 (MOMMSEN, et al., 1999). Diversas famílias de citocromos P-450 participam da síntese do cortisol e compostos como o fenol, ou produtos do seu metabolismo, poderiam atuar como competidores (pseudo-substratos)(HORNSBY, 1989).

DORVAL e colaboradores (2003) demonstraram que o endossulfan, que é capaz de inibir a secreção de cortisol, também induz estresse oxidativo. Existem evidências de que o fenol e seus derivados são capazes de induzir estresse oxidativo (ROCHE & BOGÉ, 2000; BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004). Essa característica em comum pode indicar que ambos os poluentes inibem a produção de cortisol através da inibição competitiva dos citocromos P-450, que também participam da fase I da desintoxicação nos dois casos. Por outro lado, outros mecanismos são possíveis. O fenol poderia estar causando problemas na produção e/ou liberação do ACTH, reduzindo a habilidade do animal de perceber o estressor ou inibindo a síntese de cortisol por danos ao tecido renal ou a proteínas específicas (WALSH et al., 2000;

NORRIS et al., 1999; HONTELA, 1997). No caso dos metais pesados, já foi demonstrado que o tecido renal apresenta uma resposta reduzida ao ACTH, quando incubado na presença deste *in vitro* (BRODEUR et al., 1997). Esse fato mostra que os metais pesados provocam algum dano no tecido renal ou na capacidade do mesmo de produzir o cortisol. O mesmo resultado foi obtido por WILSON e colaboradores (1998) utilizando a β -naftoflavona.

MUKHRJEE e colaboradores (1991) sugeriram que o fenol é capaz de inibir a esteroidogênese baseados no fato de que esse composto aumenta significativamente os níveis de colesterol não-esterificado (CnE) em diversos órgãos, além de provocar uma redução significativa do índice gonadossomático (GSI). O aumento nos níveis de CnE indica uma inabilidade do tecido renal de produzir hormônios esteróides a partir do colesterol. Portanto, é bastante provável que a inabilidade do matrxã de secretar o cortisol esteja relacionada à inibição de sua síntese. Ainda assim, o mecanismo preciso de inibição dessa síntese não fica claro. Além da alteração na expressão das P-450, alguns pesticidas (Roundup) são capazes de inibir a síntese da proteína reguladora de esteroidogênese aguda (StAR), sendo esse o principal mecanismo da inibição da secreção de cortisol (WALSH et al., 2000). Essa inibição também poderia estar ocorrendo no caso do fenol. Essa hipótese também é coerente com o aumento nos níveis de CnE. Compostos oxidantes podem causar danos a diversas proteínas (SALVI et al., 2000) e ter efeito genotóxico (JAGETIA & ARUNA, 1997). O fenol ou um de seus produtos secundários poderia, portanto, estar danificando essa proteína ou inibindo sua síntese. No presente trabalho, verificamos que o fenol reduziu a expressão constitutiva das HSP 70, mostrando a capacidade desse composto de causar os efeitos anteriormente citados.

Uma dose menor de fenol parece exercer um efeito mais forte sobre a produção do cortisol. O senso comum seria assumir que quanto maior a dose, maior seria o efeito. No entanto, se os mecanismos de desintoxicação apresentarem uma indução não-linear, o contrário pode ocorrer. Portanto, uma dose menor de fenol poderia estar induzindo muito pouco a expressão do sistema enzimático necessário à eliminação do tóxico e, como consequência, esse poderia estar circulando por mais tempo, mesmo que em pequenas concentrações. Se essas concentrações forem suficientes para inibir a síntese do cortisol então uma dose menor poderia ser, de fato, mais tóxica que uma dose maior. SOLEM e colaboradores (2003) encontraram poucas diferenças na produção de hidroquinona e catecol no fígado de truta arco-íris entre doses baixas, e um subsequente aumento em doses maiores. Esse resultado indica que as doses mais baixas podem provocar menor indução dos mecanismos de desintoxicação.

Apesar do tratamento de 2,0 ppm ter respondido da mesma forma que o controle ao manuseio, a recuperação desses animais foi diferente. Após 24 horas, os peixes desse tratamento ainda apresentaram níveis elevados de cortisol enquanto no controle já com 12 horas esses níveis não foram significativamente diferentes dos de 96h. De alguma forma a exposição a doses maiores afeta a recuperação dos animais, apesar de não afetar a resposta inicial. Pode ser que a dose maior de fenol não afete os níveis do cortisol porque induz uma grande atividade dos mecanismos de desintoxicação, que por sua vez leva a uma grande absorção e biotransformação do mesmo. Entretanto, apesar de não estar livre para afetar o tecido renal, por exemplo, o fenol pode estar presente nos tecidos ou na forma de produtos de excreção e essa permanência pode ser responsável pela não recuperação dos animais. Uma outra hipótese é que o PG seja menos tóxico para o rim dos que os outros produtos da

biotransformação, mas de alguma forma possa atrapalhar a recuperação. O tecido renal leva um tempo para retirar do plasma os produtos da biotransformação (McKIM et al., 1999). Isso significa que o rim e outros órgãos ficam expostos a estes compostos. Já foi demonstrando tanto para peixes como para mamíferos que a depleção de PAPs pode levar a uma maior glicoronização do fenol e que isso tende a acontecer quando o animal está exposto a doses elevadas (TONG & JAMES. 2000; NAGEL, 1983). Infelizmente, não existem muitos estudos para a toxicidade dos produtos da conjugação em peixes.

A resposta da glicose foi similar à resposta do cortisol, mas os níveis no tratamento de 2,0 ppm já se mostraram reduzidos após 24 horas. A dose menor também foi aparentemente mais tóxica no caso da glicose. Muitos trabalhos já demonstraram a indução da liberação de glicose pelos hepatócitos mediada por cortisol (revisado por BARTON, 2002 e MOMMSEN et al., 1999). Esta liberação está provavelmente relacionada com a maior demanda metabólica gerada pela necessidade de manter a homeostase. O fato de a glicose não estar aumentada após 96 horas de exposição provavelmente reflete seu consumo por diversos órgãos. A intoxicação com pesticidas, no entanto, mostra um aumento na glicose plasmática, mesmo após 96h (AGUIAR et al., 2004).

Considerando-se tanto a glicose como o cortisol, fica claro que a exposição ao fenol leva a uma não capacitação do animal em responder ao estresse. Ou seja, peixes em ambientes poluídos podem ter suas chances de sobrevivência reduzidas quando expostos a um segundo estressor.

Em termos dos indicadores de estresse, o fato do cortisol e da glicose não terem sido diferentes após 96 horas de exposição não significa necessariamente que o animal não esteja em uma situação de estresse. Se considerarmos o estresse como um desvio da homeostase (SELYE, 1950; BARTON, 1997), então o quadro metabólico

encontrado nos peixes expostos ao fenol mostra uma série de alterações. Mais do que isso, essas alterações provavelmente representam parte de um processo que visa recuperar a homeostase. Por outro lado, poder-se-ia argumentar que após 96 horas os peixes “aclimataram-se” ao poluente e por isso não encontramos diferenças no cortisol e na glicose. O conceito de aclimação porém, também é complexo. No entanto, acredito que para que esse conceito tenha significância e aplicabilidade, ele precisa representar um estado diferente do de estresse. A meu ver, isso implicaria em não haver mais diferenças observáveis em relação ao estado inicial ou controle, nos peixes. Esse não é o caso se olharmos para as alterações no metabolismo energético. A truta arco-íris exposta a repetidos manuseios por dez semanas apresenta uma resposta reduzida pela metade quando exposta a um estresse agudo (BARTON et al., 1987). Esses autores sugeriram que ocorre um processo de insensibilização do eixo hipotalâmico-pituitário (eixo HPI). Assim, se um estressor não é severo o suficiente para causar uma alteração que vá além dos limites de compensação ou altere a fisiologia permanentemente, o que pode levar à morte, os processos fisiológicos tendem a se adaptar para compensar o estado de estresse (SCHRECK, 1981). BARTON (2002) chama a atenção para que nesses casos em que indicadores como o cortisol e a glicose podem parecer “normais”, se faz necessário que outros indicadores, como a magnitude da resposta ou outros estressores agudos, sejam utilizados para acessar o estado fisiológico do animal. De qualquer forma, fica claro que nem sempre o cortisol e a glicose são os melhores indicadores e se consideramos a inibição da secreção do cortisol, eles podem falhar em revelar efeitos de estressores tradicionais como o manuseio ou o choque térmico (BARTON, 2002). Os resultados encontrados no matrinxã também ajudam a mostrar que a resposta a um determinado estressor pode ser diversa e nem sempre e não específica, como foi proposto por SELYE (1950).

6.3.1.3 HSPs

6.3.1.3.1 HSP70

Muitos trabalhos mostram a expressão das HSP70 como resposta a poluentes (ALI et al., 1996; BOONE et al., 2002; FENG et al., 2003), mas, no caso do fenol, pudemos observar uma resposta contrária. A expressão constitutiva das HSP70 foi afetada tanto nas brânquias como no fígado, sendo que na brânquia o efeito do fenol foi mais duradouro. Diferentemente do cortisol e da glicose, no caso da HSP70 a dose maior foi mais tóxica. Esse fato reforça a idéia de que existe uma diferença entre a dinâmica do fenol circulante e sua acumulação nos tecidos. O mecanismo pelo qual o fenol afeta a expressão das HSP's pode ser variado. Esse composto tem efeito genotóxico (JAGETIA & ARUNA, 1997), pode ser e gerar oxidantes e, por conseqüência, afetar a integridade das proteínas (SALVI et al., 2000). Assim, o fenol pode estar atacando especificamente o gene da HSP70 ou as regiões promotoras (HSE), pode estar interagindo com os fatores de transcrição (HSF) ou com a proteína em si.

O efeito mais duradouro do fenol nas brânquias pode ter sido resultado do fato de que esse órgão representa uma das principais vias de entrada e saída desse composto (McKIM et al., 1999; KISHINO e KOBAYASHI, 1995). Assim, as brânquias podem ter tido um contato mais prolongado com o fenol, mesmo após os animais terem sido colocados nos tanques com água sem fenol. NAGEL & ULRICH (1980) observaram que após a transferência para a água limpa, grande parte do fenol absorvido pelo goldfish era excretada pelas brânquias na forma de fenol. Logo, enquanto o fígado possivelmente estava praticamente livre do fenol é possível que o tecido branquial tenha tido necessidade de um período maior para sua eliminação. Além disso, nas brânquias a redução das HSP70 no tratamento de 2,0 ppm só foi

estatisticamente diferente na coleta de 1h. Some-se a isso o fato de que o fígado é um dos principais sítios de desintoxicação (SOLEM et al., 2003; TONG & JAMES, 2000; HEATH, 1995). Nesse tecido a recuperação foi mais rápida do que nas brânquias, o que corrobora essa idéia. O cortisol pode também ter um papel no efeito mais prolongado nas brânquias. Altos níveis de cortisol atenuam a resposta do fígado ao choque térmico (BASU et al., 2001) e a expressão do CR inibe o fator de transcrição das HSP70 (WADEKAR et al., 2001). Apesar de existirem dados que indicam que o manuseio não afeta a expressão das HSP's, talvez em um caso de perda nos níveis constitutivos dessa proteína, os altos níveis de cortisol induzidos pelo manuseio possam afetar a recuperação dos animais.

Como foi mencionado acima e reportado por VYJAYAN e colaboradores (1997) o manuseio parece não afetar a expressão das HSP70 em peixes não estressados, tal como observamos entre o controle às 96h e às 1h, tanto em brânquias quanto em fígado. Porém, os dados obtidos no tecido hepático indicam que o jejum pode levar a uma redução no conteúdo de HSP70, uma vez que todos os grupos da coleta de 96h tiveram esse conteúdo significativamente menor do que os grupos da coleta de 0h.

Assim como no caso do cortisol, a intoxicação por fenol reduz a capacidade do animal de responder a um segundo estressor através da produção de HSP's. CHAGNON & HLOWSKYJ (1989) demonstraram uma redução na tolerância térmica de *Camptostoma anomalum* exposto ao fenol. Essa espécie apresentara uma redução na CTMax quando exposta a diversas concentrações de fenol, sendo as maiores reduções nas maiores doses. Se considerarmos a situação ambiental, peixes expostos ao fenol apresentam uma menor capacidade de responder a possíveis choques térmicos. Além disso, vários outros tóxicos como etanol, butanol, metanol (NEUHAUS-STEINMETZ & RENSING, 1997) e metais pesados (CHEN et al., 2003) induzem a expressão das

HSP70 e, portanto, devem apresentar uma ameaça para a integridade das proteínas. Num caso em que um peixe esteja exposto a uma mistura de poluentes e um deles seja o fenol, sua habilidade de responder aos outros pode estar reduzida, assim como suas chances de sobrevivência.

Enquanto bioindicador, as HSP70 podem ser uma nova ferramenta para indicar estados de estresse químico. Uma vez que essa resposta parece ser impar, a redução das HSP70 pode se tornar um indicador confiável da intoxicação com fenol. Vale a pena ressaltar que, no entanto, essa resposta precisa ser validada para outras espécies de peixes e para outras classes de animais como aves e mamíferos. Por exemplo, nas células C6 de glioma de ratos tanto o fenol como o dinitrofenol induzem a expressão das HSP70 (NEUHAUS-STEINMETZ & RENSING, 1997). Isso sugere que talvez esse efeito não seja generalizado entre espécies, podendo também ser tecido específico.

6.3.1.2 Balanço iônico

A concentração de íons no plasma precisa se regulada constantemente nos peixes de água doce, uma vez que seu plasma é muitas vezes mais concentrado do que o meio que os cerca. Para esses animais o que ocorre é um processo duplo que poderia potencialmente alterar drasticamente a concentração plasmática de íons: a entrada passiva de água e a perda passiva de íons; ambos os processos ocorrendo através das brânquias. (EDDY, 1981). Para compensá-los, os peixes de água doce produzem uma urina diluída e transportam os íons ativamente, pela ação da Na^+K^+ ATPase (EDDY, 1981).

Diversos estressores causam alterações no balanço iônico dos peixes. Em geral, a resposta a um único estressor envolve um aumento no efluxo de íons através das brânquias (McDONALD & MILLIGAN, 1997). Esses autores mostraram que essa

perda é mediada principalmente pela adrenalina. Os matrinxãs controle apresentaram uma redução tanto em sódio como em potássio após o estresse de manejo. A exposição ao fenol causou uma redução nos níveis de sódio e potássio no grupo de 0,2 ppm. Tanto para potássio quanto para o sódio o tratamento 2,0 ppm teve uma resposta ao estresse atenuada em relação aos grupos controle e 0,2 ppm. Esse resultado é diferente do obtido para o cortisol. No entanto, existem poucas evidências de que o cortisol afete diretamente o balanço iônico, apesar de haver uma correlação positiva entre níveis de cortisol e perda de íons (McDONALD & MILLIGAN, 1997). É possível que além de afetar a resposta dos corticoesteróides, o fenol possa também estar afetando a resposta adrenérgica.

Uma vez que o grupo de 2,0 ppm parece ser o mais afetado, existe também a possibilidade de que doses altas de fenol possam alterar de alguma forma a permeabilidade das membranas. Isso também ajudaria a explicar porque o grupo de 0,2 ppm apresenta uma redução significativa de sódio e potássio, e o grupo de 2,0 ppm não. A composição de fosfolipídios e a quantidade de cálcio ligado a membrana plasmática são dois dos principais fatores determinantes da permeabilidade das mesmas (WENDELAAR-BONGA, 1992). Já foi reportado na literatura que o fenol é capaz de induzir alterações na composição lipídica de membranas de eritrócitos de carpa comum, o que poderia, portanto, resultar em alterações de fluidez e permeabilidade (PRADHAM et al., 1990).

“A felicidade não é uma estação em que se chega,
mas, sim, uma forma de viajar.”

Margaret Lee Ruben

7. CONCLUSÕES

1) A $CL_{-50}/96h$ do fenol para o matrinxã é de 17,4 ppm e indica a alta sensibilidade desta espécie a esse composto com relação a outros peixes já estudados.

2) O fenol pode causar danos em doses tão baixas quanto 1% da $CL_{-50}/96$ e, portanto, esse parâmetro não é necessariamente o melhor para se medir a toxicidade de um composto.

3) O metabolismo energético do matrinxã apresenta diversas alterações que visam suprir um aumento na demanda metabólica, provavelmente originada na desintoxicação.

4) A exposição ao fenol compromete a resposta do matrinxã ao estresse, tanto em termos organizmais quanto celulares.

5) Cortisol e glicose podem falhar na indicação de estados de estresse em casos de intoxicação ou da presença de desorganizadores endócrinos.

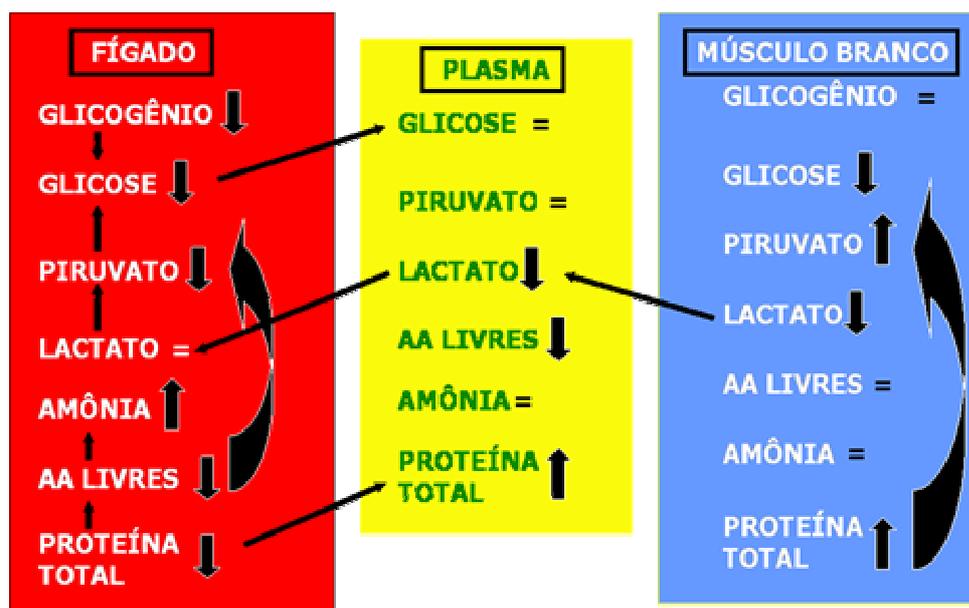


FIGURA 42. Alterações Metabólicas Induzidas Pela Exposição Ao Fenol.

“Fecho encerro reverbero aqui me fino aqui
me zero não canto não conto não quero anoiteço
desprimavero me libro enfim neste livro neste vôo.
Haroldo de Campos – Galáxias

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, P.A., IWAMA, G.K. Physiological and cellular stress response of juvenile rainbow trout to vibriosis. **J. Aquat. Anim. Health.** v.13, pp. 173-180, 2001.

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, 82pp. Dissertação (doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e recursos naturais) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

AGUIAR, L.H., MORAES, G., AVILEZ, I.M., ALTRAN, A.E., CORRÊA, C.F. Metabolical effects of Folidol 600 on the Neotropical freshwater fish matrinxa *Brycon cephalus*. **Environ. Res.** v. 95(2), pp. 221-230, 2004.

ALI, A., KRONE, P.H., PEARSON, D.S., HEIKKILA, J.J. Evaluation of stress inducible hsp90 gene expression as a potential molecular biomarker in *Xenopus laevis*. **Cell Stress Chap.** v.1(1), pp. 62-69, 1996.

APHA. **Standard methods for examination of water and wastes.** 12. ed., Washington, DC: Join Editorial board, 1980.

AIRAKSINEN, S., RABERGH, C.M.I., SISTONEN, L., NIKINMAA, M. Effects of heat shock on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells. **J. Exp. Biol.**, v. 210, pp. 2543-2551, 1998.

AVILEZ, I. **Respostas metabólicas e hematológicas de *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869), matrinxã (TELEOSTEI, BRICONIDAE) submetido ao nitrito ambiental.** 2002, 77pp Dissertação (Mestrado em genética e evolução) –

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

BARTON, B.A, SCHRECK, C.B., BARTON, L.D. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological condition and stress responses in juvenile rainbow trout. **Dis. Aquat. Org.** v. 2, pp. 173-185, 1987.

BARTON, B.A, IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Ann. Rev. Fish Dis.** Pp. 3-26, 1991.

BARTON, B.A. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In: IWAMA, G.K, PICKERING, A.D, SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. (eds.) **Fish stress and health in aquaculture.** Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

BARTON, B.A. Stress in fish: a diversity of response with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integ. Comp. Biol.** v. 42, pp. 517-525, 2002.

BASU, N., NAKANO, T., GRAU, E.G., IWAMA, G.K. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. **Gen. Comp. Endocrinol.** V. 124, pp. 97-105, 2001.

BHAVAN, P.S., GERALDINE, P. Alterations on concentrations of protein, carbohydrates, glycogen, free sugar, and lipid in the prawn *Macrobrachium malcomsonni* on exposure to sublethal concentrations of endosulfan. **Pest. Biochem. Physiol.** v. 58, pp. 89-101, 1997.

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

BERGMEYER, H.U., BEACH, W.D. **Methods of enzymatic analysis.** Weinheim Durfield Beach, Florida Basel. Third edition, 1983.

- BIDINOTTO, P.M., MORAES, G., SOUZA, R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Bol Tec. CEPTA.**, v. 10, p. 53-60, 1997.
- BRADBURY, S.P., HENRY, T.R., NIEMI, G.J., CARLSON, R.W., SNARSKY, V.M. Use of respiratory-cardiovascular response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish. Part 3. Polar narcosis. **Environ. Toxicol. Chem.** v.8, pp. 247-262, 1989.
- BRETT, J.R. Implications and assessment of environmental stress. In: LARKIN, P.A. (ed.) **The investigation of Fish-Power problems.** H.R MacMillan Lectures in Fisheries. University of British Columbia, Vancouver, pp. 69-83, 1958.
- BOGÉ, G., ROCHE, H. Cytotoxicity of phenolic compounds on *Dicentrarchus labrax* erythrocytes. **Bull. Environ. Cotam. Toxicol.** v.57, pp. 171-178, 1996.
- BOONE, A.N., VIJAYAN, M.M, Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 132©, pp. 223-233, 2002.
- BRADBURY, S.P, HENRY, T.R., NIEMI, G.J., CARLSON, R.W., SNARSKI, V.M., Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish. Part 3.. Polar narcosis. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 8, pp. 247-262, 1989.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Portaria n. 20, de 30 de julho de 1986. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. 1986
- BOSTRÖM, S-L., JOHASSOM, R.G. Effects of pentachlorophenol on enzymes involved in energy metabolism in the liver of the eel. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 41(B), pp. 359-369, 1972.

BRIVIBA, K., DEVASAGAYAM, T.P.A, SIES, H., STEENKEN, S. Selective para hydroxylation of phenol and aniline by singlet molecular oxygen, **Chem. Res. Toxicol.**, n. 6, pg. 548-553, 1993.

BRODEUR, J.C., SHERWOOD, G., RASMUSSEN, J. B., HONTELA, A. Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals: in vivo and in vitro assessment. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 54, pp. 2752-2758, 1997.

BUCHER, F. Histopatological effects of sublethal exposure to phenol on two variously pre-stresses populations of bullhear (*Cottus gobio* L). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.51(2), pp. 309-316, 1993.

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

BURTIS, C.A, ASHWOOD, E.R, **Tietz text book of clinical chemistry.** Saunders Company, Philadelphia, 1994.

CAMERON, J.N. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 40A. p. 743-749, 1971.

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

CETESB, **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2001**, publicado em 2002 http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua_geral.html, Acesso em Fevereiro de 2003, 2003

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

CHAKRABORTY, A., OINAM, S., KARMAKAR, R., CHATTERJEE, M. Vanadium toxicology – an assessment of general health, hematological aspects and energy response in an Indian catfish *Clarias batrachus* (Linn.). **Biometals**. v.11, pp. 95-100, 1998.

CHAVIN, W., YOUNG, J.E. Factors in the determination of normal serum glucose levels in goldfish, *Carassius auratus* L. **Comp. Biochem. Physiol.** v.33, pp. 629-653, 1970.

CHEN, H. Effects of phenol on hematological properties of catfish (*Clarias leather*). **Environ. Pollut. Control**. v. 24(2), pp. 104-105, 2002.

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

DALELA, R.C., RANI, S., VERMA, S.R. Physiological stress induced by sublethal concentrations of phenol and pentachlorophenol in *Notopterus notopterus*: hepatic acid and alkaline phosphatases and succinic dehydrogenase. **Environ. Pollut. (Ser. A)**. v.21, pp. 3-8, 1980.

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, pp. 165-177, 1986.

DARWIN, C.R. **On the origin of the species by the means of natural selection, or, the preservation of the favoured races in the struggle for life.** Murray, London, 1859, 345 p.

DERHAM, B.K., HARDING, J.J. α -Crystallin as a molecular chaperone. **Prog. Retinal Eye Res.** v.18, pp. 463-509, 1999.

DORVAL, J. LEBLOND, V.S., HONTELA, A. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. **Aquat. Toxicol.** v. 63, pp 229-241, 2003.

- DRABKIN, D. L. The standardization of hemoglobin measurement. **Am. J. Med. Sci.**, v. 215, n. 1, p. 110-111, 1948.
- DUBOIS, M., GILES, K.A., HAMILTON, J.K., ROBERTS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal.Chem.**, v.28, p. 350-358, 1956.
- DUNIER, M., SIWICKI, A.K. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. **Fish and Shellfish Immunol.** v.3, pp. 423-438, 1993.
- EDDY, F. B. Effects os Stess on Osmotic and ionic Regulation in Fish. In: PICKERING, A.D. (ed.) **Stress and fish.** pp.295-231, Academic Press, New York, 1981.
- EVERSE, J., HSIA, N. The toxicities of native and modified hemoglobins. **Free Radic. Biol. Med.** v.22, 1075-1099, 1997.
- FENG, Q., BOONE, A.N., VIJAYAN, M.M. Copper impact on heat shock protein 70 expression and apoptosis in rainbow trout hepatocytes. **Comp. Biochem. Physiol.** v.135C, pp. 345-355, 2003.
- FOGELS, A., SPRAGUE, J.B. Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish, and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants. **Wat. Res.** v. 11, pp. 811-817, 1977.
- FLESHER, M., DEAK, T., SPENCER, R.L., LAUDENSLAGER, M.L., WATKINS, L.R., MAIER, S.F. A long term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. **Endocrinology.** v.136, pp. 5336-5342, 1995.
- 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.

GHOSH, T.K. Effects of phenol pollution on aquatic life. **Environ. Ecol.** v. 1, pp. 1-3, 1983.

GILL, T.S., TEWARI, H., PANDE, J. Short and long-term effects of cooper on the rosy barb (*Puntius conchoniis*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* v. 23, pp 294, 1992.

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

GUPTA, P.K., MUJUMDAR, V.S., RAO, P.S., DURVE, V.S. Toxicity of phenol, pentachlorophenol and sodium pentachlorophenolate to a fresh water teleosts *Lebistes reticulatus* (Peters). **Acta Hydrochim. Hydrobiol.** v. 10(2), pp. 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, pp. 8-13, 1983.

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

GUPTA, R.S., GOLDING, G.B. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. **J. Mol. Evol.** v. 37, pp. 573-582, 1993.

HALSBAND, E., HALSBAND, I. Veränderungen des Blutbildes von Fischen infolge toxischer Schäden. **Arch. FischWiss.** v. 14, pp. 68-85, 1963.

HAMILTON, M.A, RUSSO, R.C., THURSTON, R.U. Trimmed sparmam-karber 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.** CRC. Prees. Inc., Boca Raton, Florida, 1995, 245p.

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

HOCHACHKA, P. W. **Living without oxygen: Closed and Open systems in hypoxia tolerance.** 1 ed. Harvard University Press, Cambridge. Cap. 1, 5, 6 e 7, 1980.

HOCHACHKA, P. W., SOMERO, G. N. **Biochemical Adaptation.** Princeton University Press, Princeton, 1984, 537p.

HOLMBERG, B., JENSEN, S., LEWANDER, K., OLSSON, M. Metabolic effects of technical pentachlorophenol (PCP) on the eel *Anguilla anguilla* L. **Comp. Biochem. Physiol.** V. 43B, pp. 171-183, 1972.

HONTELA, A. Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticoid hormones. **Rev. Toxicol.** v. 1, pp. 159-206, 1997.

HORI, T.S.F **Alterações do perfil metabólico de tambacu, híbrido *Colossoma macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*, submetido a três concentrações de nitrito ambiental.** 2002.48pp. Monografia (Graduação em Biologia). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

IWAMA, G.K, PICKERING, A.D, SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. (eds.) **Fish stress and health in aquaculture.** Cambridge University Press, Cambridge, 1997, 278p.

IWAMA, G.K., THOMAS, P.T., FORSYTH, R.B., VIJAYAN, M.M. Heat shock protein expression in fish. **Rev. Fish Biol. Fish.** v.8, pp. 35-56, 1998.

IWAMA, G.K., AFONSO, L.O.B., TODGHAM, A., ACKERMAN, P., NAKANO, K. Are Hsps suitable for indicating stressed state in fish? **J. Exp. Biol.** v.207, pp. 15-19, 2004.

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

JING, L-F., CAO, C-H. The toxicity of phenol on fish under different temperatures. **J. Fish. China/Shuichan Xuebao.** v. 9(3), pp. 223-230, 1985.

KIM, J-S, CHIN, P. Acute and chronic toxicity of phenol to mysid, *Archaeomysis kokuboi*. **J. Korean. Fish. Soc.** v. 28(1), pp. 87-97, 1995.

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, 1995.

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, pp. 35-39, 1999.

KRISTOFFERSSON, R., BROBERG., S., OIKARI, A. Physiological effects of a sublethal concentrations of phenol in the pyke (*Esox lucius* L.) in pure brackish water. **Ann. Zool. Fenn.** v. 11, pp. 392-397, 1973,

KRUGER, N.J.. The Bradford method for protein quantification. In: WALKER, J.M (Ed.), **Methods in molecular biology, Vol 32: Basic protein and peptide protocols.** Humana Prss Inc., Totowa, NJ, 1994

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

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

LEBLOND, V.S., BISSON, M., HONTELA, A. Inhibition of cortisol secretion in dispersed head kidney cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by endosulfan, an organochlorine pesticide. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 121, 48-56, 2001.

LEHNINGHER, A., NELSON, D.L., COX, M.M **Principles of biochemistry.** W.H. Freeman, New York, NY, 2004, 1100p.

LEVESQUE, H.M., DORVAL, J., HONTELA, A., VAN Der KRAAK, G.J., CAMPBELL, P.G.C. Hormonal, morphological and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. **J. Toxicol. Environ. Health.** v. 66(A), pp. 657-676, 2003.

LEVESQUE H.M, MOON, T.W., CAMPBELL, P.G.C., HONTELA, A. Seasonal variation in carbohydrates and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquat. Toxicol.** v. 60, pp. 257-267, 2002.

LIMA, A.O., SOARES, J.B., GRECO, J.B., GALIZZI, J., CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica.** 4. ed., Guanabara Koogan, R.J., 1969, 653p.

LOOMIS, W. F., LIPMANN, F.. Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. **J. Biol. Chem.** v.173, pp. 807-814, 1948

LU, G.D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem.J.**, v. 33, p. 249-254, 1939.

LUND, B.O., LUND, J. Novel involvement of a mitochondrial steroid hydrolase (P450c11) in xenobiotic metabolism. **J.Biol. Chem.** v. 270, pp. 20895–20897, 1995.

MATSUOKA, T. Determination of methemoglobin and carboxyhemoglobin in blood by rapid colorimetry. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 20, n. 11, p. 1208-1211, 1997.

MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: **Stress and fish.** Pickering, A.D. (ed.), pp. 49-75, Academic Press, London, 1981.

MASON, J.W. A re-evaluation of the concept of non-specificity in stress theory. **J. Psychiatric. Res.** v. 8, pp. 323-333, 1971.

MAZON, A.F. **Efeitos dos Íons Cobre sobre Curimbatá, Prochilodus scrofa (Steindachner, 1881)**. 1997. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP.

McDONALD, G., MILLIGAN. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G.K, PICKERING, A.D, SUMPSTER, J.P., SCHRECK, C.B. (eds.) **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

McKIM, J.M., KOLANCZYK., R.C., LIEN, G.J., HOFFMAN, A.D Dynamics of renal excretion of phenol and major metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.** v.45, pp. 265-277, 1999.

MENDONÇA, J.O.J, O gênero Brycon. Panorama da aquicultura, jan/fev., 1996.

MILES, H.M, LOEHNER, S.M., MICHAUD, D.T., SALIVAR, S.L. Physiological responses of hatchery reared muskellunge (*Esox masquinongy*) to handling. **Transactions of the American Fisheries Society**. v. 103, pp. 336-342, 1974.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO DESENVOLVIMENTO. Estatísticas. **www.agricultura.gov.br**, Acesso em 2000.

MITROVIC, V.V., BROWN, V.M., SHURBEN, D.G., BERRYMAN, M.H. Some pathological effects of sub-acute and acute poisoning of rainbow trout by phenol in hard water. **Wat. Res.** v. 2(4), pp. 249-252, 1968.

MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M, MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol. Fish.** v.9, pp. 211-268, 1999.

MORAES, G. AVILEZ, I.M. ALTRAN, A.E. BARBOSA, C.C. Biochemical and hematological responses of the banded knife fish *Gymnotus caapo* (Linnaeus, 1758) exposed to environmental hypoxia. **Braz. J. Biol.** v. 62 (4A), pp. 633-640, 2002.

MORIMOTO, R.I, TISSIERES, A., GEORGOPOULOS, C. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones In: **Cold Spring Harbor Monograph Series**, v. 26. Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, 496 pp., 1994.

MUKHERJEE, D., BHATTACHARYA, S., KUMAR, V., MOITRA, J. Biological significance of [¹⁴C]phenol accumulation in different organs of a murrel, *Channa punctatus*, and the common carp, *Cyprinus carpio*. **Biomed. Environ. Sci.** 3, 337-342, 1990.

MUKHERJEE, D., GUHA, D., KUMAR, V., CHAKRABARTY, S. Impairment of steroidogenesis and reproduction in sexually mature *Cyprinus carpio* by phenol and sulfide under laboratory conditions. **Aquat. Toxicol.** v. 21, pp. 29-40, 1991.

NAGEL, R. Species differences, influence of dose and application on biotransformation of phenol in fish. **Xenobiotica.** v. 13, pp. 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, pp. 374-378, 1980.

NEUHAUS-STEINMETZ, U., RENSING, L. Heat shock protein induction by certain chemical stressors is correlated with their cytotoxicity, lipophilicity and protein-denaturing capacity. **Toxicology** v.123, pp. 185-195, 1997.

NIKINMAA, M., SOIVIO, A., NAKARI, T., LINDGREN, S. Hauling stress in Brown Trout (*Salmo trutta*): physiological responses to transport in fresh water or salt water, and recovery in natural brackish water. **Aquaculture.** v. 34, pp. 93-99, 1983.

NOHL, H., STOLZE, K. The effects of Xenobiotics on Erythrocytes. **Gen. Pharmacol.** v.31, pp. 343-347, 1998.

NORRIS, D.O., DONAHUE, S., DORES, R.M., LEE, J.K., MALDONADO, T.A., RUTH, T., WOODLING, J.D. Impaired Adrenocortical response to stress by brown trout, *Salmo trutta*, living in metal-contaminated waters of the eagle river, Colorado. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 113, pp. 1-8, 1999.

OLSEN, C.M., MEUSSEN-ELHOLM, E.T.M., HOLME, J.A., HONGSLO, J.K. Brominated phenols: characterization of estrogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7. **Toxicol. Lett.** v.129, pp. 55-63, 2002.

PICKERING, A.D (ed.) **Stress and fish.** American Press, London, 1981, 367 p.

PRADHAN, D., WEISER, M., LUMLEY-SAPASNSKI, K., FRANZIER, D., KEMPER, S., WILLIAMSON, P., SCLEGEL, R. A. Peroxidation-induced perturbation of erythrocyte lipid organization. **Biochem. Biophys. Acta.**, n. 1023, pg. 398-404, 1990.

RAJASEKHARAN, J.N., SHERIEF, P.M. Acute toxicity of phenol and long-term effects on food consumption and growth of juvenile rohu *Labeo rohita* (Ham.) under tropical conditions. **Asian Fish. Sci.** v. 10(3), pp. 179-187, 1998.

RANZANI, H., NANBA, K., MURACHI, S. Acute toxic effect of phenol on zebra fish *Brachydanio rerio*. **Bull. Jap. Soc. Fish.** v. 52(9), pp. 1547-1557, 1986.

RAVICHANDRAN, S., MIDHUNA, SHANTHI, K., INDRA, N. Effects of phenol on protein metabolism in the freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. **Environ. Ecol.** v. 13, n. 1, pp. 129-131, 1994.

REDDY, M.M., KUMAR, V.A., REDDY, P.S., REDDY, S.L.N. Phenol induced metabolic alterations in the brain and muscle of a fresh water fish *Channa punctatus* during sublethal toxicosis. **Ecotoxicol. Environ. Monit.** v.3(1), pp. 13-17, 1993.

REITMAN, S., FRANKEL, S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 28, pp. 56-63., 1957.

RILEY, P.A. Hydroxyanisole: the current status. In: **Hydroxyanisole: Recent Advances in Anti-Melanoma Therapy**, IRL Press, Oxford, 1984.

RITOSSA, F.M. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia.** v.18, pp. 571-573, 1962.

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(1), pp. 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.** v. 125(C), pp. 345-353, 2000.

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

SALVI, A., CARRUPT, P.A., TILLEMENT, J.P., TESTA, B. Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants and influence of protein binding. **Biochem. Pharmacol.** v. 61, pp. 1237-1242, 2000.

SCARANO, G., SAROGLIA, M.G. Recovery of fish from functional and haemolytic anaemia after brief exposure to a lethal concentration of nitrite. **Aquaculture**, n. 43, p. 421-426, 1984.

SCHRECK, C.B. Stress and compensation in teleostean fishes: Response to social and physical factors. In: PICKERING, A.D. (ed.) **Stress and fish**. pp.295-231, Academic Press, New York, 1981.

- 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.** v. 91C, pp. 413–418, 1988.
- SELYE, H. Stress and the general adaptative syndrome. **Brit. Med. J.** v. 1(4667), pp. 1383-1392, 1950.
- SELYE, H. The evolution of the stress concept. **American Scientist.** v. 61, pp. 692-699, 1973.
- SINGH, S.K, TRIPATHI, P.K., YADAV, R.P., SINGH, D., SINGH, A. Toxicity of Malathion and carbaryl Pesticides: effects on some biochemical profiles of the freshwater fish *Colisa fasciatus*. **Bull. Enviro. Contam. Toxicol.** v.72, pp. 592-599, 2004.
- 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, pp 337-347, 2003.
- SRI. **Directory of chemical producers, USA.** SRI Int., Menlo Park, CA, p.839, 1988.
- STAALL, G.E., KOSTER, J.F.L., VEGGER, C. Human erythrocyte pyruvate kinase. **Meth. Enzymol.** v. 42, pp. 182-186, 1975.
- STICH, H.F. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. **Mut. Res.** v. 259, pp. 307-324, 1991.
- STOLZE, K., DADAK, A., LIU, Y., NOHL, H. Hydroxylamine and Phenol-induced formation of methemoglobin and Free Radical Intermediates in Erythrocytes. **Biochem. Pharmacol.** v.52, pp. 1821-1829, 1996.
- SUMPTER, J.P., DYE, H.M, BENFEY, T.J. The effects of stress in plasma ACTH, α -MSH and cortisol levels in salmonid fishes. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 62, pp. 377-385, 1986.

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

TAVARES, L. H. S. **Limnologia aplicada à aquicultura**. 1. ed., Jaboticabal –SP FUNEP, 1994. 70p.

TAYSSE, L., TROUTAND, D., KHAN, N.A., DESCHAUX, P. Structure activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (*Cyprinus carpa*). **Toxicology**. v.98, pp. 207-214.

TONG, Z., JAMES, M.O. Purification and characterization of hepatic and intestinal phenol sulfotransferase with high affinity for Benzo[a]pyrene phenols from channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Arch. Biochem. Biophys.** v.376(2), pp.409-419, 2000.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annal. Clin. Biochem.** v. 6, pp. 24-27, 1969

TSUTSUI, T., HAYASHI, N., MAIUMI, H., HUFF, J., BARRET, J.C. 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, pp. 112-123, 1997.

URBINATI, E.C., ABREU, J.S., CAMARGO, A.C.S.C., PARRA, M.A.L. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**. v.229, pp.389-400, 2004.

VAL, A. L., HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia**. 1.ed., Manaus, AM, INPA., 1995, 160p.-

VALENTOVIC, M.A., ROGERS, B.A., MEADOWS, M.K., CONNER, J.T., WILLIAMS, E., HONG, S.K., RANKIN, G.O. Characterization of methemoglobin

formation induced by 3,5-dichloroaniline, 4-amino-2,6-dichlorophenol and 3,5-dichlorophenylhydroxylamine. **Toxicology** v. 118, pp. 23-36, 1997.

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, pg. 171-176, 1982.

VIJAYAN, M.M, PERREIRA, C., FORSYTH, R.B., KENNEDY, C.J., IWAMA, G.K Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation heat-shock-cognate hsc71 gene from rainbow trout. **Eur. J. Biochem.** v.204, pp. 893-900, 1997.

VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION Pesticide and Aquatic Animals. A guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems. Publication 420-013, Junho 1996.
<http://www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.html>. Acesso em: 15/10/1999.

VITTOZZI, L. De ANGELIS, G. a Critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. **Aquat. Toxicol.** v. 19, pp. 167-204, 1991.

WADEKAR, S.A., LI, D., PERIYASAMY, S., SÁNCHEZ, E.R. Inhibition of heat shock transcription factor by GR. **Mol. Endocrinol.** v. 15(8), pp. 1396-1410, 2001.

WALSH, L.P., McCORMICK, C., MARTIN, C., STOCCO, D.M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environ. Health. Perspect.** v. 108(8), pp. 769-776, 2000.

WELCH, W.J. How cells respond to stress. **Scient. Am.** v. 268, 56-64.

WENDELAAR-BONGA, S.E. Toxicants and osmoregulation in fish. **Nethl. J. Zool.** v. 42(2-3), pp. 478-493, 1992.

WILSON, J.M., VIJAYAN, M.M., KENNEDY, C.J., IWAMA, G.K., MOON, T.W. β -Naphthoflavone abolishes interrenal sensitivity to ACTH stimulation in rainbow trout. **J. Endocrinol.** v. 157, pp. 63–70, 1998

WITZ, G., ZHANG, Z., GOLDSTEIN, B.D. Reactive ring-opened aldehyde metabolites in benzene hemetotoxicity. **Environ. Health Perspect.**, n. 104, pg. 1195-1199, 1996.

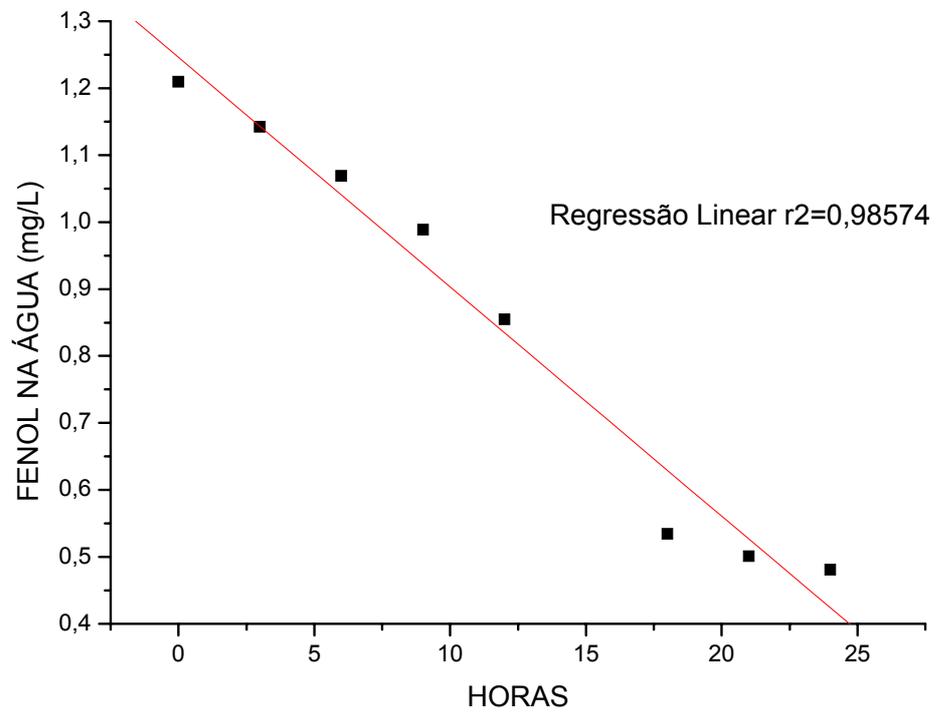
YOUNG G., THORARENSEN, H., DAVIE, P.S. 11-Ketotestosterone suppresses interrenal activity in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Gen. Comp. Endocrinol.** v.103, pp. 301-307, 1996.

ZANIBONI FILHO, E., CARVALHO, J.L., CORREA, M.A.V., RESENDE, E.K. Caracterização morfológica do matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (TELEOSTEI: CHARACIDAE). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 48, n. 1, p. 41-50, 1988.

ZAGATTO, P.A. Mini curso: Ecotoxicologia Aquática VI Encontro de Ecotoxicologia e III Reunião da Setac Latino Americana. São Carlos, 2000.

ZARATE, J., BRADLEY, T.M. Heat shock protein are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. **Aquaculture.** v.223, pp. 175-187, 2003.

8. ANEXOS



ANEXO 1. Concentração de fenol na água a 25 °C ao longo de 24 horas.