



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA DELATIM SIMONATO

**BIOMARCADORES FUNCIONAIS E HISTOLÓGICOS
ASSOCIADOS À EXPOSIÇÃO DO PEIXE *Prochilodus lineatus*
AO ÓLEO DIESEL**

Londrina
2006

JULIANA DELATIM SIMONATO

**BIOMARCADORES FUNCIONAIS E HISTOLÓGICOS
ASSOCIADOS À EXPOSIÇÃO DO PEIXE *Prochilodus lineatus*
AO ÓLEO DIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2006

JULIANA DELATIM SIMONATO

**BIOMARCADORES FUNCIONAIS E HISTOLÓGICOS
ASSOCIADOS À EXPOSIÇÃO DO PEIXE *Prochilodus lineatus*
AO ÓLEO DIESEL**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Ângela Teresa Silva e Souza
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 17 de fevereiro de 2006.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que são meus exemplos, aos meus irmãos pelo carinho, ao Henrique pelo seu amor e à Cláudia pela orientação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Cláudia, que acreditou em mim. Ela é meu exemplo de pessoa, profissional, orientadora, bióloga e tudo mais. Sem ela, eu não teria conseguido.

Aos meus pais, obrigada por TUDO, mas principalmente por nunca terem desistido de mim. Tudo que faço é por eles. Obrigada por terem plantado a sementinha e não terem soltado as “rédiás”.

Aos meus MARAVILHOSOS irmãos eu agradeço primeiro por eles existirem, e depois pelos conselhos, briguinhas, desabafos, risadas, empréstimos...

Ao Hique, meu amor, namorado, “marido”, amigo, companheiro, confidente... agradeço pelo apoio incondicional, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis e principalmente por ter entrado na minha vida.

Agradeço muito a TODA minha família que mesmo à distância., que sempre me incentivam a continuar.

Agradeço à Jô, ao Zé Rocha, aos Danis, à Ju, ao Moi, à Maju e Rafa e a toda esta família que me aceitou maravilhosamente bem.

Agradeço às minhas cunhadinhas queridas Nessa e Ju que são como irmãs.

À minha amiga e comadre Nina, agradeço por me ouvir, por me fazer rir nos bons e nos maus momentos, pelo apoio nos momentos angústias, pela vibração nos momentos de felicidade, por apoiar sonhos malucos...etc, etc, etc...

À Marta minha amiga e companheira, agradeço pelas inúmeras conversas, conselhos, receitas e dietas compartilhadas.

À Silvia pela ajuda incondicional, apelos de socorro e apoio.

Agradeço a todos que passaram pelo laboratório mais cheiroso da UEL e que de alguma forma participaram da minha vida (Thiago mineiro, Lígia, Ju P., Ju R., Elis, Bruno B.) e principalmente à Marina, à Vivian, à Andressa, ao Gabriel e à Lindalva. À Catarina agradeço pela amizade e companheirismo no laboratório.

Agradeço aos amigos que sempre carregou comigo Ene, Itulango, Carlinha mãe, Carla loira, Carolzinha, Renata, Xuxa, Helô, Gui, Pedrão, Luidi, Neura, Cadu, Elvis, Débora, Camila, Feijão, Marcela, Deise, Guga, Maricy, Passoca, Ju Carneiro....

Agradeço à Prof. Carmen e à Vanessa pela simulação dos derrames de óleo diesel.

Agradeço aos funcionários da Estação de Piscicultura da UEL (EPUEL).

À coordenação do curso de Mestrado em Ciência Biológicas da UEL.

Agradeço a CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq – CT-petro (processo 50.2238/2003-8) pelo apoio financeiro

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho

E agradeço a Deus pela vida.

**Tentar mudar o mundo é a minha bandeira, mas
não é para já é luta para a vida inteira.**

(Aroldo Pereira)

Simonato, J. D. **Biomarcadores Funcionais e Histológicos Associados à Exposição do Peixe *Prochilodus lineatus* ao Óleo Diesel.** 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração Zoologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

Considerando-se o elevado número de acidentes com petróleo e seus derivados que vem ocorrendo atualmente no Brasil e a escassez de trabalhos sobre os efeitos destes contaminantes nos organismos aquáticos, testes de toxicidade voltados para a avaliação dos efeitos destes poluentes em espécies de peixes de ambientes neotropicais são necessários e urgentes. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do óleo diesel em parâmetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos da espécie de peixe Neotropical *Prochilodus lineatus* (curimba), após exposição aguda e sub-crônica à fração solúvel de óleo diesel (FSD). Para o preparo da fração solúvel do diesel em água (FSD) o óleo diesel automotivo comercial foi adicionado à água (1:4) e a mistura foi exposta à radiação solar direta, simulando um derrame de diesel em ambiente tropical; após, a fração solúvel foi coletada e diluída em água de poço artesiano em duas diferentes proporções, de acordo com a série experimental. Numa primeira série experimental os peixes foram expostos à FSD diluída para 40%, durante 24, 48 e 96 horas e 15 dias e apenas à água (controle). Numa segunda série experimental, os peixes foram expostos a uma solução um pouco mais concentrada, sendo a FSD diluída para 50%, durante 6, 24 e 96 horas e 15 dias. Na primeira série, os animais expostos à FSD apresentaram hiperglicemia após 24, 48 e 96 horas refletindo a mobilização de reservas energéticas. As concentrações plasmáticas das proteínas totais e íons sódio e cloreto permaneceram estáveis, sendo constatada apenas uma variação transitória da osmolaridade após 15 dias. Os peixes apresentaram aumento significativo na atividade da GST hepática após 15 dias de exposição, indicando a ativação das reações de biotransformação associadas ao metabolismo dos compostos presentes na FSD. Os peixes expostos à FSD não apresentaram alterações significativas na atividade hepática da catalase em relação aos grupos controles. Na segunda série de experimentos, além da inclusão de um tempo de exposição mais curto (6h), alguns parâmetros também foram incorporados à análise na tentativa de se compreender melhor os efeitos da FSD para *P. lineatus*. Foi observada diminuição do conteúdo de hemoglobina e do hematócrito nos dois últimos tempos experimentais. Estes resultados hematológicos associados ao aumento do potássio, que foi observado nos mesmos períodos, devem refletir a hemólise dos eritrócitos decorrente da exposição à FSD. A hiperglicemia, encontrada após 24h e 96h de exposição, e a diminuição da concentração plasmática de proteínas totais, após 15 dias, refletem uma mobilização energética provavelmente mediada pela ação das catecolaminas, visto que não houve indicação de elevação do cortisol. A liberação de cortisol parece ter sido inibida pelo diesel, como indicada pela redução significativa de sua concentração após 15 dias, em relação ao grupo controle. Os peixes desta segunda série também apresentaram ativação da GST hepática após 96h e 15 dias de exposição à FSD, confirmando assim os resultados encontrados nos experimentos da primeira série e reforçando a idéia da estimulação das reações de biotransformação, associadas ao metabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos presentes na FSD. O fato de não ter havido indução da catalase hepática, em ambos experimentos, não exclui a possibilidade de ter ocorrido aumento na geração de oxi-radicais após a exposição à FSD, pois outras enzimas podem ter atuado na metabolização dos hidroperóxidos. Assim como na primeira série experimental, os parâmetros osmo-iônicos dos animais expostos à FSD, com exceção do

potássio, mantiveram-se, no geral, estáveis indicando que o diesel não interferiu no balanço osmo-iônico desses peixes. Os animais expostos à FSD apresentaram alterações histológicas moderadas nas brânquias e danos severos no fígado, que devem refletir a ação da FSD na integridade desses tecidos e o possível prejuízo de processos fundamentais para a manutenção da homeostase desses peixes. Portanto, fica claro que o óleo diesel promove alterações significativas em alguns parâmetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos de *Prochilodus lineatus* e dentre estes parâmetros os melhores candidatos a biomarcadores para o monitoramento de locais contaminados com diesel seriam: atividade da GST hepática, concentração plasmática de cortisol, conteúdo de hemoglobina e hematócrito, níveis glicêmicos e as alterações histológicas nas brânquias e no fígado.

Palavras-chave: Óleo diesel. *Prochilodus lineatus*. Biomarcadores bioquímicos. Resposta de estresse. Parâmetros hematológicos. Histopatologia.

Simonato, J. D. **Biomarcadores Funcionais e Histológicos Associados à Exposição do Peixe *Prochilodus lineatus* ao Óleo Diesel.** 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração Zoologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

In the present study, alterations in biochemical, physiological and histological parameters were determined in *Prochilodus lineatus* exposed to a water-soluble fraction of diesel oil. Toxicity tests were conducted simulating a diesel oil spill in a tropical environment. A water-soluble fraction of diesel (WSD) was prepared by adding commercial automotive diesel oil to water (1:4) and exposing the mixture to direct solar radiation for 6 h. Afterward the water-soluble fraction was collected and diluted to 50%. Fish were exposed to WSD or only water (control) in acute static tests of 6 h, 24 h and 96 h and sub-chronic static tests of 15 days. The following parameters were determined: hematocrit, hemoglobin content, plasma concentrations of cortisol, glucose, total protein, sodium, chloride and potassium, plasma osmolarity, catalase and glutathione-S-transferase (GST) activities in liver, and histological alterations in gills and liver. A decrease in hemoglobin content and hematocrit was observed in the last two experimental times. These hematological results combined with an increase in potassium observed for the same time periods, indicate the occurrence of hemolysis due to exposure to WSD. The release of cortisol appears to have been inhibited by diesel, as indicated by a significant reduction in its concentration after 15 days, in relation to the control group. Hyperglycemia noted after 24 h and 96 h exposure and the decrease in the plasma concentration of total protein after 15 days, reflect an energy mobilization to maintain homeostasis. The fish showed activation of hepatic GST after 96 h and 15 days exposure, indicating the stimulation of biotransformation reactions associated with the metabolism of aromatic hydrocarbons present in WSD. The osmotic-ionic parameters of the animals exposed to WSD, with the exception of potassium, remained stable, indicating that the diesel did not interfere with the maintenance of osmotic-ionic homeostasis in these fish. Animals exposed to WSD showed moderate histological alterations in the gills and more severe damage in the liver, which would interfere directly with fundamental processes involved in the maintenance of homeostasis in these fish.

Keywords: Diesel oil. *Prochilodus lineatus*. Biochemical biomarkers. Response to stress. histopathology.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	11
1.1 POLUIÇÃO POR DERIVADOS DE PETRÓLEO.....	11
1.2 A ECOTOXICOLOGIA E OS BIOMARCADORES	13
1.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	14
1.4 BIOMARCADORES ENDÓCRINOS.....	16
1.5 BIOMARCADORES METABÓLICOS	18
1.6 BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS.....	18
1.7 BIOMARCADORES OSMO-IÔNICOS.....	19
1.8 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS.....	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
4 ARTIGO I	25
Efeitos da Fração Solúvel em Água do Óleo Diesel Combustível em Alguns Parâmetros Funcionais do Peixe de Água Doce Neotropical <i>Prochilodus</i> <i>lineatus</i> Valenciennes.....	26
5 ARTIGO II	33
Biomarcadores Bioquímicos, Fisiológicos e Histológicos do Peixe Neotropical <i>Prochilodus lineatus</i> Exposto à Fração Solúvel do Óleo Diesel.....	34
6 CONCLUSÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 POLUIÇÃO POR DERIVADOS DE PETRÓLEO

De todos os problemas causados pelo excesso de poluição ambiental, um dos mais importantes é a contaminação das águas e a consequente escassez dos recursos hídricos de boa qualidade. Dentre os diferentes tipos de poluentes, os derivados de petróleo são um dos mais relevantes para a ecotoxicologia aquática (Pacheco e Santos, 2001a) e têm causado bastante preocupação, tanto pela frequência dos eventos de contaminação como pelo elevado potencial poluidor dos seus compostos. A contaminação de águas subterrâneas por esses compostos orgânicos também representa sérios riscos à saúde pública e aos ecossistemas (Tiburtius et al., 2004).

A entrada de petróleo e derivados no ambiente aquático é atribuída principalmente a acidentes com tanques de armazenamento, a grandes derramamentos e descargas de resíduos municipais e industriais. Consequentemente, os componentes do petróleo e de seus derivados podem atingir os rios e outros ecossistemas aquáticos, por isso a investigação dos efeitos tóxicos desses contaminantes em organismos aquáticos é de extrema importância (Pacheco e Santos, 2001b).

A contaminação dos solos e águas subterrâneas por compostos orgânicos do petróleo e seus derivados tem sido destaque nas últimas décadas, principalmente em função da frequência com que episódios de contaminação são verificados e da gravidade com que o meio ambiente é afetado. Embora grandes vazamentos de petróleo sejam preocupantes e ocupem grande espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por petróleo e seus derivados deva-se a pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis em postos de distribuição, favorecidos pelo envelhecimento dos tanques de combustíveis (Tiburtius et al., 2005).

No Brasil, de acordo com a Resolução nº. 273 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2000), toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis, configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais.

No Estado de São Paulo, no período 1984 a 2001, os vazamentos em postos de combustíveis foram responsáveis por cerca de 10% de todas as emergências ambientais

atendidas. Sobre as causas desses acidentes constatou-se que 25% estava relacionado a vazamentos em tanques, 20% a vazamentos nas tubulações e em 10% de casos a causa do atendimento foi devida a uma contaminação de solo ou água subterrânea remanescente de outros eventos. Entretanto, cabe ressaltar que esses números não refletem a realidade dos vazamentos ocorridos, pois muitos casos não são comunicados à Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2005).

Casos de acidentes ambientais envolvendo vazamentos de derivados do petróleo também vêm se acumulando nos últimos anos no Estado do Paraná. Em julho de 2000, o vazamento de mais de 4 milhões de litros de óleo cru a partir dos ductos de transporte pertencentes à refinaria de Petróleo Presidente Getúlio Vargas, localizada em Araucária (PR), afetou diretamente a bacia hidrográfica do rio Barigüi, um dos principais afluentes do rio Iguaçu. Em março de 2002, o ribeirão Lindóia, localizado em Londrina (PR), recebeu a descarga de cerca de 100 mil litros de óleo diesel provinda do vazamento de um “pool” de combustível (Simonato et al., 2004).

No Brasil o óleo diesel é utilizado em motores empregados nas mais diversas aplicações, tais como: automóveis, ônibus, caminhões, pequenas embarcações, máquinas de grande porte, locomotivas e navios. As frações básicas para a produção deste combustível, denominadas de óleo diesel leve e pesado, são obtidas pelo processo inicial de destilação durante o refino do petróleo. A estas frações podem ser agregadas outras frações, como a nafta e o querosene entre outros, resultando no produto conhecido como óleo diesel. O atual modelo energético brasileiro se apóia no transporte de cargas com motores a diesel, por via rodoviária. Isso faz com que o óleo diesel seja o derivado propulsor do refino em nosso país, correspondendo a 34% do volume do barril de petróleo. Na maioria dos outros países do mundo, esta demanda situa-se entre 15 e 25% do volume do barril de petróleo (Portal BR, 2005).

O óleo diesel automotivo é dividido em subgrupos que permitem sua adequação às necessidades ambientais e dos usuários; no Brasil são utilizados os seguintes tipos: tipo “B”, com no máximo 0,35% de enxofre, e tipo “D”, com no máximo 0,2% de enxofre. Os menores teores de enxofre no diesel tipo “D” representam uma redução na emissão de particulados e de óxidos de enxofre, que são formados pela combustão do óleo diesel podem ser descarregados para a atmosfera. O óleo diesel tipo “D” é utilizado nas grandes capitais e regiões metropolitanas, que possuem as maiores frotas em circulação e condições climáticas adversas à dispersão dos gases resultantes da sua combustão, nas demais regiões do país é utilizado o óleo diesel Tipo “B” (Portal BR, 2005).

O petróleo e seus derivados podem promover sérios distúrbios nos ecossistemas aquáticos uma vez que suas frações solúveis em água (FSA) podem alcançar águas naturais, tornando-se biologicamente disponíveis aos organismos aquáticos. Componentes presentes nas FSA do petróleo e seus derivados, como os hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etil benzeno e xileno) e os hidrocarbonetos poliaromáticos ou policíclicos (PAHs), são tóxicos e potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos (Khan, 1998; Teles et al., 2003). Sendo assim, são necessários estudos para a avaliação dos efeitos da poluição por esses compostos (Zhang et al., 2003).

1.2 A ECOTOXICOLOGIA E OS BIOMARCADORES

Refletindo a crescente preocupação sobre os efeitos de substâncias químicas no ambiente em outras espécies, além da espécie humana, surgiu a ecotoxicologia, que identifica uma área de estudo preocupada com os efeitos de agentes químicos dentro do contexto da ecologia (Martinez e Cólus, 2002). Assim, a ecotoxicologia pode ser definida como o estudo dos efeitos prejudiciais de substâncias químicas no ecossistema, incluindo o comportamento e as transformações desses agentes químicos no ambiente, assim como seus efeitos sobre os organismos vivos (Walker et al., 1996).

Os efeitos adversos dos contaminantes nos organismos incluem os efeitos letais e aqueles subletais, como alterações no comportamento, crescimento, desenvolvimento, reprodução e na estrutura dos tecidos. Efeitos adversos no nível celular incluem indução ou inibição de enzimas e ou sistemas de enzimas e suas funções associadas (Rand et al., 1995).

Como normalmente a poluição aquática ocorre de forma crônica, com concentrações subletais de poluentes, identificam-se mais comumente alterações estruturais e funcionais nos peixes do que mortalidade em massa dos organismos (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994). Essas alterações morfo-funcionais têm sido muito utilizadas como biomarcadores para indicar tanto a exposição quanto os efeitos de poluentes ambientais (Martinez e Souza, 2002; Almeida et al., 2005).

Por definição, os biomarcadores são alterações biológicas que podem estar relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de compostos químicos do ambiente (Peakall, 1994; Van Gestel e Van Brummelen, 1996). A importância destes biomarcadores é que eles

representam medidas de alterações biológicas que podem indicar a presença de contaminantes e fornecer um meio de interpretar níveis ambientais de poluentes em termos biológicos (Walker et al., 1996).

Os contaminantes podem manifestar seus efeitos nos peixes em vários níveis de organização, como alterações estruturais em órgãos e tecidos, disfunções fisiológicas e modificações que podem prejudicar o crescimento e a reprodução. Um grande número de biomarcadores relacionados à exposição a poluentes tem sido proposto para avaliar a saúde dos peixes (Adams et al., 1990; Van der Oost et al., 2003) como, por exemplo, biomarcadores bioquímicos, endócrinos, metabólicos, hematológicos, iônicos e histopatológicos que serão descritos a seguir.

1.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Eventos moleculares e bioquímicos decorrentes da exposição a agentes tóxicos tendem a ser mais sensíveis, menos variáveis e mais altamente conservados do que parâmetros determinados ao nível orgânico (Adams et al., 1990). Assim, vários parâmetros bioquímicos de peixes têm sido utilizados como biomarcadores devido às suas respostas a substâncias tóxicas. Dentre os biomarcadores bioquímicos, os mais extensivamente investigados são as enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, ou seja, as enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante (Van der Oost et al., 2003).

Como principal órgão metabólico, o fígado desempenha funções importantes na tomada, acúmulo, biotransformação e excreção de xenobióticos nos peixes (Jimenez e Stegeman, 1990). As reações envolvidas no metabolismo ou biotransformação destas substâncias incluem duas fases. A fase inicial ou fase I, freqüentemente oxidativa, ocorre quando um grupamento funcional polar (ex: OH) é introduzido no contaminante lipofílico, tornando-o mais hidrofílico. Na fase II os metabólitos produzidos na fase I são conjugados com compostos endógenos de ocorrência comum nas células, formando um metabólito secundário. Um importante aspecto desta reação é a conversão de compostos lipofílicos em compostos hidrofílicos, que assim se tornam metabólitos excretáveis. No entanto, os metabólitos produzidos na fase I, podem gerar espécies reativas de oxigênio

(ERO) extremamente tóxicas ao organismo (Di Giulio et al., 1995; Landis e Yu, 1995; Van der Oost et al., 2003).

A glutathione-S-transferase (GST) é uma família de enzimas multifuncionais relacionada com a conjugação e excreção de compostos tóxicos (fase II) e o fígado é a sua principal fonte. A GST está envolvida na detoxificação de contaminantes lipofílicos, pela ativação das reações de conjugação com substratos endógenos, no caso o tripeptídeo glutathione, que resultam no aumento da solubilidade dos xenobióticos na água e nas suas taxas de eliminação, reduzindo a probabilidade destes compostos se ligarem a outras macromoléculas celulares como o DNA. A toxicidade de muitos xenobióticos pode ser modulada pela indução das GSTs (Van der Oost et al., 2003).

Enzimas de detoxificação, como a GST, podem apresentar sua atividade alterada na presença de compostos derivados do petróleo, como os hidrocarbonetos poliaromáticos (Stien et al., 1998). No douradinho (*Carassius auratus*) a atividade hepática da GST aumentou após quatro dias de exposição à fração solúvel do óleo diesel em água (Zhang et al., 2004). No entanto, Zhang e colaboradores (2003 e 2004) constataram uma inibição da atividade desta enzima a partir de 40 dias de exposição à mesma fração solúvel. Esses resultados mostram que a resposta deste biomarcador bioquímico pode variar em função do tempo de exposição ao xenobiótico.

Em sistemas biológicos algumas reações geram espécies reativas de oxigênio (ERO), que são produtos da redução da molécula de oxigênio (O_2), como o anion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}). Estas ERO, geradas tanto a partir de reações fisiológicas normais como a partir do metabolismo de xenobióticos, podem ser removidas pelo sistema de defesa antioxidante, que é um importante sistema de remoção dos oxirradicais nos organismos aeróbicos. Entretanto, se as defesas antioxidantes forem suplantadas pelas forças pró-oxidantes uma situação de estresse oxidativo pode se estabelecer, resultando em danos oxidativos, tais como peroxidação lipídica, inativação de enzimas, quebra da molécula de DNA e até morte celular. Desta forma, as enzimas antioxidantes desempenham um papel crucial na manutenção das homeostase celular (Di Giulio et al., 1995; Van der Oost et al., 2003).

Os efeitos mediados pelas ERO com potencial para biomarcadores incluem tanto as respostas adaptativas, como o aumento da atividade das enzimas antioxidantes e a concentração de antioxidantes não enzimáticos, como as próprias manifestações de danos oxidativos (Van der Oost et al., 2003).

Como todas as células, os hepatócitos são dependentes de enzimas antioxidantes para proteção contra estas espécies reativas de oxigênio, produzidas durante a biotransformação. As enzimas que fazem parte deste sistema de defesa contra os oxirradicais são a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx). Também fazem parte da defesa antioxidante compostos endógenos não enzimáticos como o tripeptídeo glutathione (GSH) e as vitaminas E e C (Landis e Yu, 1995).

A exposição de peixes ao petróleo ou derivados pode provocar alterações na atividade das enzimas de defesa antioxidante e/ou a ocorrência de danos oxidativos. Por exemplo, Achuba e Osakwe (2003) verificaram alterações dose-dependente na atividade da catalase e da superóxido dismutase e na peroxidação lipídica, em vários tecidos do bagre africano (*Clarias gariepinus*) após 14, 21 e 28 dias de exposição ao petróleo cru. Zhang e colaboradores (2003) submeteram douradinhos (*Carassius auratus*) à diferentes concentrações de óleo diesel durante 40 dias e observaram que o diesel, dependendo da concentração testada, induziu o aumento da atividade hepática da glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase. Esses resultados mostraram que o petróleo e o diesel são mediadores na geração de radicais livres em peixes. O aumento da atividade das enzimas antioxidantes pode representar uma resposta adaptativa para proteger os peixes das espécies reativas de oxigênio após a exposição a estes poluentes (Achuba e Osakwe, 2003).

1.4 BIOMARCADORES ENDÓCRINOS

O estresse é uma condição na qual o equilíbrio dinâmico do organismo é ameaçado ou prejudicado como resultado das ações de estímulos extrínsecos ou intrínsecos, comumente definidos como agentes estressores (Wendelaar Bonga, 1997). O estressor pode apresentar diversas origens, como química, física e até o próprio manuseio (Val et al., 2004), e o petróleo e seus derivados podem ser considerados estressores químicos.

Nos peixes, os agentes estressores desencadeiam uma série de respostas fisiológicas e comportamentais, coletivamente denominadas resposta de estresse, que podem funcionar como biomarcadores. Estas respostas neuro-endócrinas são controladas pelo eixo hipotálamo – sistema nervoso simpático – células cromafins (HSC) e pelo eixo hipotálamo – hipófise – células interrenais (HHI). Pelo eixo HSC os estímulos estressores, via hipotálamo, estimulam as fibras do sistema nervoso simpático, que estimulam o tecido cromafim,

localizado no rim cefálico, a liberar catecolaminas. Pelo eixo HHI, os estímulos estressores que atuam sobre o hipotálamo promovem o aumento dos níveis de CRH (hormônio liberador de corticotrofina) e conseqüente liberação de ACTH (corticotrofina) pela hipófise, que por sua vez estimula o tecido interrenal, também localizado no rim cefálico, a liberar cortisol (Urbinati e Carneiro, 2004).

A liberação dos hormônios catecolaminas e cortisol, que resulta da estimulação dos eixos HSC e HHI, é considerada como resposta primária de estresse e desencadeia uma resposta secundária, caracterizada por um conjunto de diferentes mecanismos, responsáveis pela adaptação fisiológica do peixe à situação estressora (Urbinati e Carneiro, 2004).

A resposta de estresse tem como objetivo a manutenção ou o restabelecimento da homeostase face às mudanças físicas e/ou químicas que estejam comprometendo a sobrevivência do organismo em determinado local (Val et al., 2004). Mas, se por um lado, essa resposta estimula mecanismos adaptativos durante um período curto de exposição ao agente estressor, a ameaça crônica pode resultar em danos ao sistema de defesa, crescimento e capacidade reprodutiva dos peixes (Wendelaar Bonga, 1997).

O cortisol é um hormônio que desempenha um papel importante na resposta fisiológica de animais expostos a agentes estressores (Hontela, 1997; Wendelaar Bonga, 1997) e sua concentração plasmática é um parâmetro amplamente utilizado como biomarcador endócrino. Esse hormônio é responsável por alterações em parâmetros metabólicos, parâmetros hematológicos e alterações hidrominerais entre outros efeitos (Wendelaar Bonga, 1997).

Alguns estudos mostram que a exposição de peixes a fração solúvel em água (FSA) do petróleo promove elevações nas concentrações plasmáticas do cortisol (Alkindi et al., 1996; Pacheco e Santos, 2001b), indicando uma resposta ao estresse. Por exemplo, linguados (*Pleuronectes flesus*) expostos à FSA do óleo cru apresentaram elevação da concentração de cortisol plasmático a partir de 3 horas de exposição (Alkindi et al., 1996). Pacheco e Santos (2001b) também observaram um aumento do cortisol plasmático em enguias (*Anguilla anguilla*) expostas à fração solúvel do diesel após 3h. No entanto, Pacheco e Santos (2001a) notaram um decréscimo nas concentrações plasmáticas de cortisol em enguias (*A. anguilla*) expostas à fração solúvel do diesel durante 2 e 3 dias. Segundo os autores, esta falha na resposta do cortisol pode ser decorrente da exaustão do sistema endócrino de controle produção do cortisol, possivelmente como resultado da prolongada

hiperatividade da hipófise, ou de problemas relacionados à síntese ou liberação de cortisol a partir das células interrenais.

1.5 BIOMARCADORES METABÓLICOS

A resposta endócrina representada pela liberação de catecolaminas e cortisol, resulta em rápida mobilização de reservas energéticas, como alterações na glicemia, proteínas plasmáticas e glicogênio hepático, que permitem ao organismo atender ao aumento na demanda energética durante a exposição a fatores estressantes (Martinez e Cólus, 2002). Normalmente, após o aumento das concentrações dos hormônios liberados como resposta primária ao estresse, há um aumento significativo da concentração de glicose. Esse aumento da glicose representa um substrato energético para imediata utilização (Val et al., 2004) e é amplamente utilizado como biomarcador.

Alkindi e colaboradores (1996) observaram em linguados (*Pleuronectes flesus*) concentrações plasmáticas de glicose significativamente elevadas após 3h de exposição à FSA do óleo cru e um aumento de mais de 50% após 48h. Pacheco e Santos (2001a) em estudo com enguias (*Anguilla anguilla*) expostas à fração solúvel do diesel durante 6h, também encontraram concentrações plasmáticas elevadas de glicose e lactato. Essas alterações são consideradas típicas respostas ao estresse, como um mecanismo adaptativo que disponibiliza energia ao organismo para responder a fatores estressantes (Wendelaar Bonga, 1997).

1.6 BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS

A exposição a poluentes químicos ambientais pode induzir alterações nos parâmetros hematológicos, tais como: concentração de hemoglobina ou o tamanho e/ou o número de seus eritrócitos, que, portanto podem ser empregados como biomarcadores. Algumas alterações nos valores dos parâmetros hematológicos podem ser devido a uma resposta desencadeada pela estimulação adrenérgica, que causa contração esplênica e liberação de eritrócitos a partir do baço para a circulação. Aumentos ou decréscimos de

parâmetros hematológicos, em resposta a estressores, também podem ocorrer em consequência de perda ou ganho de água (Martinez e Cólus, 2002). Assim, como as alterações hematológicas de peixes refletem qualquer mudança ambiental, estes parâmetros podem ser bons indicadores da saúde de animais aquáticos expostos a contaminantes (Davison et al., 1993).

Peixes expostos ao petróleo ou seus derivados podem apresentaram alterações em parâmetros hematológicos. Por exemplo, linguados (*Pleuronectes flesus*) expostos durante 3h à FSA do óleo cru, apresentaram um aumento no hematócrito e no conteúdo de hemoglobina, provavelmente devido a uma resposta adrenérgica (Alkindi et al, 1996). Entretanto, após 24h e 48h de exposição à FSA do óleo cru, esses parâmetros apresentaram uma drástica diminuição, a qual os autores relacionaram com uma provável hemólise de eritrócitos e/ou hemorragia, provocada pelos hidrocarbonetos do petróleo (Alkindi et al, 1996). Por outro lado, Davison e colaboradores (1992 e 1993) observaram que exemplares do peixe antártico *Pagothenia borchgrevinki* expostos à fração solúvel do diesel, tanto em testes agudos como crônicos, apresentaram aumento no hematócrito e na concentração de hemoglobina. Assim, fica claro que a interpretação das eventuais variações nos parâmetros hematológicos é difícil e outras informações, como por exemplo, concentrações iônicas, osmolaridade e capacidade de oxigênio do sangue, são necessárias para a correta análise destas alterações (Camargo e Martinez, 2006).

1.7 BIOMARCADORES OSMO-IÔNICOS

A manutenção das concentrações iônicas internas constantes e compatíveis com as funções celulares é essencial, e requer regulação ativa das taxas de fluxo de água e de íons (Martinez e Cólus, 2002). Distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica são aspectos característicos de estresse em peixes. Isto ocorre devido à íntima relação entre os fluidos corpóreos nas brânquias e o ambiente aquático (Wendelaar Bonga, 1997). Assim, a osmolaridade plasmática, as concentrações individuais dos íons sódio, cloreto e potássio, são exemplos de variáveis fisiológicas utilizadas como indicadores de efeitos subletais de poluentes em peixes (Abel, 1989)

Distúrbios nas concentrações plasmáticas de íons e/ou distúrbios na osmolaridade do plasma já foram observadas em várias espécies de peixes expostas a altas

concentrações de hidrocarbonetos de petróleo (Engelhardt et al., 1981). No entanto, em um estudo com o peixe Antártico (*Pagothenia borchgrevinki*), exposto por 7 dias à fração solúvel do diesel, não foram encontradas diferenças significativas no cloreto e osmolaridade plasmáticos quando comparados com os grupos controle (Davison et al., 1993).

As concentrações plasmáticas do sódio e cloreto e a osmolaridade do linguado *Pleuronectes flesus* também não foram afetadas pela exposição à FSA do óleo cru, no entanto, a concentração do potássio plasmático foi progressivamente maior nos animais expostos ao contaminante. Essa elevação do K^+ pode estar relacionada ao aumento na fragilidade dos eritrócitos, resultando na hemólise destes, induzido pelos hidrocarbonetos do petróleo, particularmente após 24h de exposição (Alkindi et al., 1996).

1.8 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS

A histopatologia tem sido uma técnica fundamental para ajudar na identificação da toxicidade de diversas substâncias em órgãos alvo e os mecanismos de ação dos contaminantes (Schwaiger et al., 1997; Wester et al., 2002); e as alterações histológicas decorrentes da exposição à xenobióticos podem ser utilizadas como biomarcadores no monitoramento ambiental (Heath, 1995; Schwaiger et al., 1997; Martinez e Cólus, 2002; Wester et al., 2002)

Muitos estressores afetam a estrutura branquial e, direta ou indiretamente, as trocas gasosas e o balanço hidromineral, que constituem as principais razões para a vulnerabilidade destes animais em águas poluídas (Wendelaar Bonga, 1997). Sendo as brânquias extremamente importantes para a respiração, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de nitrogênio (Heath, 1995), a análise de sua morfologia pode ser muito útil como parâmetro para o monitoramento ambiental (Schwaiger et al., 1997).

Além das brânquias, o fígado também pode ser considerado um órgão-alvo em ambientes degradados devido a sua grande importância no metabolismo de xenobióticos e sua alta sensibilidade a esses compostos. Portanto, alterações na estrutura hepática podem ser significativas na avaliação do estresse no peixe (Heath, 1995).

Considerando-se que as brânquias estão em contato direto com o ambiente e o fígado apresenta sensibilidade aos xenobióticos, vários trabalhos estão sendo realizados para avaliar os efeitos de contaminantes, dentre eles o petróleo e seus derivados, na estrutura e

função desses órgãos. Em trutas arco-íris (*Salmo gairdneri*) expostas à emulsão de petróleo, as brânquias apresentaram anormalidades no epitélio lamelar, no sistema de células pilares e a presença de gotas de óleo entre as lamelas. Houve também evidências de fusão lamelar e vacuolização das células de cloreto (Engelhardt et al., 1981).

Exemplares de linguado (*Pleuronectes vetulus*) mantidos em sedimento contaminado com PAHs, revelaram metabólitos desses compostos na bile e a ocorrência de lesões hepáticas (Myers et al., 1998). Khan (1998) coletou espécimes do linguado *Pleuronectes americanus* próximo a uma refinaria de petróleo e observou necrose nas nadadeiras, fígado com hepatócitos com manchas basófilas, agregados de melanomacrófagos e focos de vacuolização. Nas brânquias encontrou hiperplasia na lamela e no espaço interlamelar e descolamento epitelial. Segundo este autor, as lesões internas e externas observadas nestes linguados sugerem uma conexão entre derramamentos de petróleo e as anormalidades encontradas. Em outro trabalho, Khan (2003) também relatou a ocorrência de lesões no fígado de linguados coletados próximo ao terminal da refinaria, tais como hipertrofia nuclear, necrose e fibrose. Hepatócitos vacuolizados, com núcleos dispersos e a presença de corpos hialinos também foram reportados.

Conforme exposto acima, fica claro que os derivados de petróleo podem promover alterações significativas em parâmetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos de peixes e que estas alterações podem ser utilizadas como biomarcadores na análise e monitoramento da qualidade da água de locais impactados por estes contaminantes. Entretanto, a maioria dos estudos apresentados refere-se a espécies marinhas, e os efeitos destes contaminantes em peixes dulcícolas ainda são escassos (Pollino e Holdway, 2003). Além disso, poucas pesquisas têm sido realizadas sobre o efeito de contaminantes em espécies Neotropicais e muito pouco é conhecido sobre a sensibilidade destas espécies aos contaminantes potencialmente presentes nos ecossistemas aquáticos tropicais (Martinez et al., 2004, Almeida et al., 2005).

A espécie *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), popularmente conhecida como curimba, é uma espécie nativa das regiões Sul e Sudeste do Brasil, muito utilizada para consumo humano. Trata-se de uma espécie detritívora, desta forma, encontra-se em contato direto com poluentes eventualmente depositados no sedimento. Alguns trabalhos realizados têm demonstrado que essa espécie é muito sensível a contaminantes e por isso é considerada como um potencial bioindicador para monitoramentos

ambientais (Mazon e Fernandes, 1999; Martinez e Souza, 2002; Martinez et al, 2004; Almeida et al, 2005; Camargo e Martinez, 2006).

Assim, considerando-se o elevado número de acidentes com petróleo e seus derivados que vem ocorrendo atualmente no Brasil e a escassez de trabalhos sobre os efeitos destes contaminantes nos organismos aquáticos, testes de toxicidade voltados para a avaliação dos efeitos destes poluentes em espécies de peixes de ambientes neotropicais são necessários e urgentes. Estes testes constituem ferramentas importantes para detectar e avaliar o potencial efeito toxicológico dos poluentes nos organismos aquáticos, fornecendo uma base de dados que pode ser utilizada para avaliar o risco associado com a situação na qual o agente poluidor, o organismo e as condições de exposição são definidos (Rand et al., 1995).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Realizar testes de toxicidade com espécie de peixe neotropical (*Prochilodus lineatus*) exposta à simulação de derrames de óleo diesel comercial;
- Caracterizar os padrões de respostas destes peixes expostos à fração solúvel do diesel em vários níveis organizacionais: bioquímico, morfológico e fisiológico.
- Padronizar biomarcadores que forneçam informações relevantes para o monitoramento de ambientes impactados pelo derrame de derivados de petróleo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes agudos (6, 24, 48 e 96h) e sub-crônicos (15 dias) com *P. lineatus*, submetidos à fração solúvel do óleo diesel;
- Determinar a atividade hepática das enzimas catalase, glutatona-S-transferase de *P. lineatus*, expostos à fração solúvel do diesel;
- Avaliar parâmetros hematológicos (hematócrito e conteúdo de hemoglobina), endócrinos (cortisol), metabólicos (concentração plasmática de glicose e proteínas totais) e osmo-iônicos (osmolaridade plasmática e concentração plasmática de Na^+ , K^+ e Cl^-) de *P. lineatus*, expostos a fração solúvel do diesel;
- Verificar a ocorrência de alterações histológicas em brânquias e fígado de *P. lineatus* expostos à fração solúvel do diesel.

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para atender aos objetivos propostos, no presente trabalho peixes jovens da espécie neotropical *Prochilodus lineatus* foram expostos à fração solúvel em água de óleo diesel, em testes de toxicidade agudo e sub-crônico. Para o preparo da fração solúvel do diesel em água (FSD) o óleo diesel automotivo comercial foi adicionado à água (1:4) e a mistura foi exposta à radiação solar direta, simulando um derrame de diesel em ambiente tropical; após, a fração solúvel foi coletada e diluída em água de poço artesiano em duas diferentes proporções, de acordo com a série experimental. Numa primeira série experimental os peixes foram expostos à FSD diluída para 40% durante 24, 48, 96 horas e 15 dias. Para avaliação dos efeitos da FSD foram analisados os seguintes parâmetros: atividade das enzimas hepáticas catalase e glutatona, conteúdo de hemoglobina, concentrações plasmáticas de glicose, proteínas totais, dos íons cloreto e sódio e osmolaridade. Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados no artigo I. Numa segunda série experimental, os peixes foram expostos a uma solução mais concentrada de óleo diesel, utilizando-se a FSD diluída para 50%, durante 6, 24 e 96 horas e 15 dias. Nesse segundo trabalho, para ampliar a avaliação dos efeitos da FSD, foram incluídos os seguintes parâmetros de análise: conteúdo de hemoglobina, hematócrito, concentrações plasmáticas de cortisol e potássio e análise de ocorrência de alterações histológicas branquiais e hepáticas, além dos parâmetros analisados anteriormente. Os resultados deste trabalho estão apresentados no artigo II.

ARTIGO I**Efeitos da Fração Solúvel em Água do Óleo Diesel Combustível em Alguns Parâmetros Funcionais do Peixe de Água Doce Neotropical *Prochilodus lineatus* Valenciennes**

J. D. Simonato, A. C. Albinati, C. B. R. Martinez

Artigo aceito para a publicação na revista Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes

J. D. Simonato, A. C. Albinati, C. B. R. Martinez

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001, CEP: 86051-990. Londrina, Paraná, Brasil.

Currently, leakage of oil transport pipelines and storage tanks are important contributors to the pollution of inland waters. Also, leakages of engine fuel, such as Diesel oil, from underground bulk storage tanks frequently constitutes a source of groundwater contamination, reaching the rivers and other aquatic ecosystems, producing serious pollution problems (Pacheco and Santos 2001a). However, little research has been done on the impact of petroleum hydrocarbons on freshwater ecosystems and their aquatic biota. The majority of studies examining the toxicity of petroleum hydrocarbons and its products have focused on marine species, and the toxic effects of petroleum hydrocarbons on freshwater species are relatively unknown (Pollino and Holdway 2003). Several laboratory experiments, with different organisms, have been carried out on the toxicity of diesel oil, but only a few concern fish (Pacheco and Santos 2001b). Among them, just some reports have been published concerning the effects of diesel oil exposure on morphological and physiological parameters in freshwater fish (Zhang et al. 2003) and there is a real lack of data concerning the effects of toxic agents on tropical freshwater fish species.

The neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) represents a well suited species to toxicity tests because this fish has been shown to be sensitive to toxicants (Mazon and Fernandes 1999; Martinez and Souza 2002; Da Silva et al. 2004; Martinez et al. 2004; Almeida et al. 2005) and is considered a potential vertebrate for environmental monitoring (Cerqueira and Fernandes 2002; Camargo and Martinez 2006).

In this study, a suite of biological parameters was used to evaluate acute and subchronic induced effects/responses in *P. lineatus* exposed to the diesel water soluble fraction (DWSF). The following parameters were examined: a biotransformation enzyme (liver GST), an antioxidant enzyme (liver catalase), a hematological parameter (Hb content), metabolic parameters (blood glucose and proteins) and osmo-ionic parameters (blood Na⁺, Cl⁻ and osmolality). These assays were designed to detect sublethal biochemical and physiological changes in freshwater fish exposed to DWSF. The utility of these methods lies in their ability to provide an early warning of diesel effects before community and ecosystem responses can be detected.

Correspondence to: C. B. R. Martinez. Phone: +55.43.33714650 Fax: +55.43.33714207 E-mail: cbueno@uel.br

MATERIALS AND METHODS

Static toxicity tests were carried out to evaluate DWSF effects to juveniles of *P. lineatus* (9.14 ± 1.32 g, mean ± SD, n=48). To obtain the DWSF one part of commercial diesel oil was added to 4 parts water in a glass container. The mixture was then exposed to sunlight for four days, simulating a diesel spill in tropical conditions. After that the upper insoluble phase was

discarded and the remaining water phase was collected and diluted to 40% DWSF with well water. Experiments were performed in 100L glass aquaria with continuously aerated well water. Fish were divided in eight groups (6 fish in each), four groups were exposed to DWSF while the other four groups were exposed only to clean water, without diesel (control group). Water temperature, dissolved oxygen, pH and conductivity were continuously monitored. One experimental group plus one control group were terminally sampled at one of the following intervals: 24, 48, 96 h (acute exposure) and 15 days (subchronic exposure). During the subchronic experiment water (in control group) or water plus DWSF (in experimental group) was renewed after 7 days. Blood samples were taken from the caudal vein by means of heparinized plastic syringes and subsequently fish were killed by cervical section and the livers were immediately removed. Livers were stored frozen at -80°C .

A small amount of blood was used for hemoglobin determination by the cyanmethemoglobin method. Blood samples were then centrifuged (5 min, 12,000 g) and plasma samples were stored frozen (-20°C) until chemical analyses. Plasma sodium concentration was measured by flame photometry. Plasma osmolality was measured by freezing point depression. Plasma chloride concentration was determined by the thiocyanate method using a commercial kit (Analisa, Brazil). Plasma glucose was analysed using a colorimetric commercial kit (Glucos 500 - Doles Reagentes, Brazil) based on the glucose-oxidase reaction.

Fish livers were homogenized in ten volumes (w/v) of ice-cold 0.1M K-phosphate buffer (pH 7.0) and centrifuged (14000 X g) for 20 min at 4°C , to obtain the supernatant for glutathione-S-transferase (GST) and catalase analyses. GST activity was determined as described by Keen et al. (1976) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as the substrate. The change in absorbance was recorded at 340 nm and enzyme activity was calculated as nM CDNB conjugate formed. $\text{min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ using a molar extinction coefficient of $9.6 \text{ mM}.\text{cm}^{-1}$. Catalase activity was estimated from the rate of consumption of hydrogen peroxide levels (Beutler 1975). Change in absorbance was recorded at 240 nm and enzyme activity was expressed as $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ consumed. $\text{min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$. Total plasma and liver proteins were measured by the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as standard. All samples were analyzed in duplicate.

For each parameter analysed differences between the control group and the DWSF group, for each exposure period, were tested for significance by Student-t test. Means were considered significantly different where $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

All fish exposed to DWSF survived the 15 days exposure and no significant differences were observed between control and DWSF-exposed fish among the following parameters: catalase liver activity, hemoglobin content and plasma concentrations of ions and proteins (Table 1). This water soluble fraction contains polar and low-molecular mass compounds, namely, aromatic hydrocarbons included in two toxicologically relevant groups: BTEX compounds (benzene, toluene, ethyl benzene and xylene isomers) and small polyaromatic hydrocarbons (PAH), in particular naphthalenes (Pacheco and Santos 2001a).

Table 1. Catalase liver activity, hemoglobin content (Hb), plasma concentrations of total proteins and ions (Na^+ and Cl^-) of *Prochilodus lineatus* exposed to clean water (CTR) or diesel water soluble fraction (DWSF) during different periods.

Parameter	Group	Experimental Periods			
		24h	48h	96h	15 days
Liver CAT ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$)	Control	38.4 \pm 2.8	38.3 \pm 3.2	54.1 \pm 6.2	46.8 \pm 4.1
	DWSF	40.6 \pm 3.9	33.6 \pm 2.5	42.4 \pm 2.9	54.7 \pm 8.1
Hb (g.dL ⁻¹)	Control	5.7 \pm 0.2	7.7 \pm 0.6	5.6 \pm 0.3	5.5 \pm 0.3
	DWSF	4.9 \pm 0.3	6.5 \pm 0.5	5.3 \pm 0.4	5.1 \pm 0.2
Proteins (mg.mL ⁻¹)	Control	32.9 \pm 7.1	27.5 \pm 5.3	27.8 \pm 3.6	29.8 \pm 4.6
	DWSF	29.9 \pm 5.1	21.9 \pm 6.9	23.9 \pm 2.7	28.5 \pm 3.6
Na^+ (mM)	Control	159.6 \pm 5.9	141.7 \pm 6.4	144.7 \pm 4.3	154.2 \pm 8.3
	DWSF	156.8 \pm 13.7	137.8 \pm 7.5	144.2 \pm 5.4	160.3 \pm 5.2
Cl^- (mM)	Control	108.2 \pm 5.4	125.8 \pm 4.2	115.0 \pm 3.1	104.3 \pm 2.1
	DWSF	102.2 \pm 6.1	115.9 \pm 1.7	115.0 \pm 5.1	104.3 \pm 2.7

All data are expressed as mean \pm SD. N = 5 - 6.

Glutathione-S-transferases (GST) are a group of enzymes that catalyze the conjugation of reduced glutathione (GSH) with a variety of electrophilic metabolites, and are involved in the detoxification of both reactive intermediates and oxygen radicals (Van der Oost et al. 2003). In the present study liver GST activity was significantly increased only after 15 days exposure to DWSF (Fig.1). This GST induction observed after diesel exposure probably reflects a response to the chemical, resulting in a conjugation process, where diesel compounds or its metabolites are combined with endogenous molecules to form conjugates that could be more easily excreted. It has been demonstrated that the activity of this enzyme may be enhanced in the presence of polycyclic and polychlorinated hydrocarbons (Zhang et al. 1990) and even low level organic contamination can lead to increased hepatic GST activity (Machala et al. 1997).

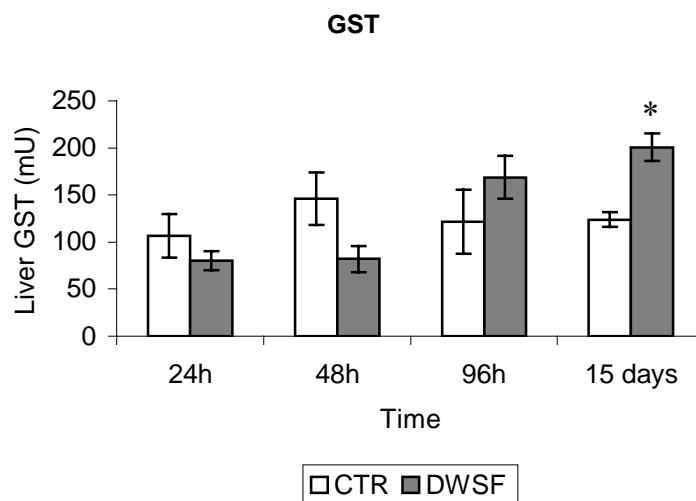


Figure 1. Liver activity of Glutathione-S-Transferase of *Prochilodus lineatus* exposed to clean water (CTR) or the diesel water soluble fraction (DWSF) during different experimental periods. The bars indicate mean and the vertical lines SE. * indicates difference in relation to control ($P < 0.05$).

Glucose concentrations for fish acutely exposed to DWSF were significantly higher than those measured for control fish (Fig.2), indicating a stress-induced mobilization of energy reserves. This elevation in blood glucose increases the amount of energy-sources available to the organism, to satisfy the extra demand caused by the stressor (Bracewell et al. 2004). This stress-related hyperglycemia, reported in many species of teleosts, is mediated mainly by the effects of catecholamines on glucose release from the liver and glycogenolysis is the main process accounting for this glucose release (Wendelaar Bonga 1997). Conversely, in fish sub-chronically exposed to DWSF no significant alteration in blood glucose was observed. The impaired ability to keep increased blood glucose after 15 days of exposure to DWSF may reflect the depletion of glycogen reserves or a reduced capacity to respond to stress after a longer exposure to DWSF, making the organism incapable of responding and consequently less able to survive (Wendelaar Bonga 1997; Martinez et al. 2004).

P. lineatus exposed to DWSF maintained good osmotic balance throughout the 96h study period once plasma osmolality, sodium and chloride concentrations were stable. However, after 15 days of exposure, plasma osmolality was increased significantly (Fig.3). Clearly more work is required to understand the significance of this rise in view of stable monovalent ions and total proteins.

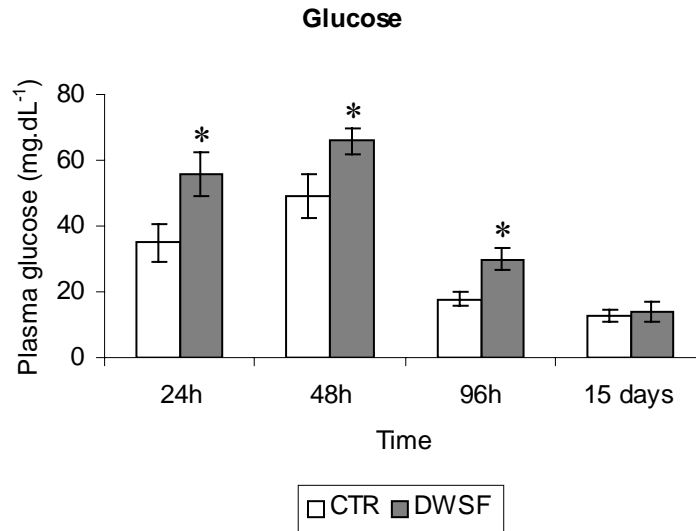


Figure 2. Plasma glucose concentrations of *Prochilodus lineatus* exposed to clean water (CTR) or the diesel water soluble fraction (DWSF) during different experimental periods. The bars indicate mean and the vertical lines SE. * indicates difference in relation to control ($P < 0.05$).

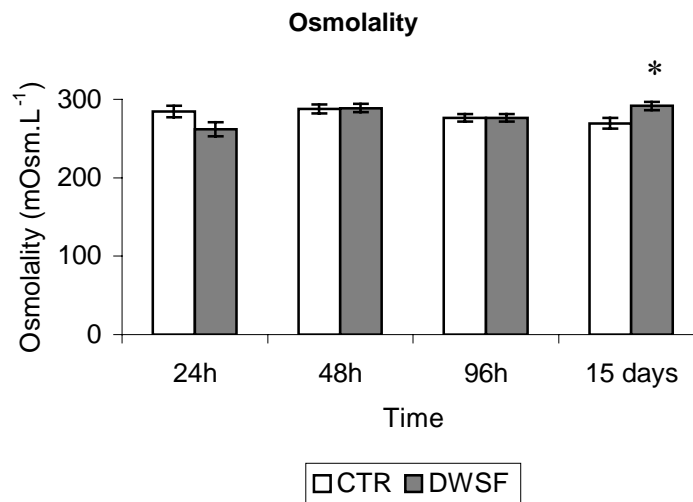


Figure 3. Plasma osmolality of *Prochilodus lineatus* exposed to clean water (CTR) or the diesel water soluble fraction (DWSF) during different experimental periods. The bars indicate mean and the vertical lines SE. * indicates difference in relation to control ($P < 0.05$).

In summary, this study shows that acute exposure of *P. lineatus* to DWSF caused significant physiological stress, resulting in elevated blood glucose levels. In the longer term (15 days) DWSF induced GST liver activity. Additional investigations, including more biochemical, physiological and morphological parameters, are necessary to better define DWSF effects to *Prochilodus lineatus* and their suitability as biomarkers in ecotoxicological studies.

Acknowledgements. The authors thank the Universidade Estadual de Londrina hatchery station (EPUEL) for the supply of fish. Special thanks to Dr. Carmen L.B. Guedes for the preparation of the diesel water soluble fraction. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CT-Petro/CNPq 502238/2003-8). J.D.Simonato thanks CAPES for the scholarship.

REFERENCES

- Almeida JS, Meletti PC, Martinez, CBR (2005) Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol* 140C:356–363
- Beutler E (1975) Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. Grune & Straton, New York
- Bracewell P, Cowx IG, Uglow RF (2004) Effects of handling electrofishing on plasma glucose and whole blood lactate of *Leuciscus cephalus*. *J Fish Biol* 64:65-71
- Camargo MMP, Martinez CBR (2006) Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ Toxicol Pharmacol* 21:61-69
- Cerqueira CCC, Fernandes MN (2002) Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol Environ Saf* 52:83-91
- Da Silva MEF, Silva JA, Marangoni S, Novello JC, Meirelles, NC (2004) A new method to purify hepatic CYP1A of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian freshwater fish. *Comp Biochem Physiol* 138C:67-74
- Keen JH, Habig WH, Jakoby WB (1976) Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J Biol Chem* 20:6183-6188
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Machala M, Petřivalský M, Nezveda K, Ulrich R, Dušek L, Piačka V, Svobodová Z (1997) Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants – A field study. *Environ Toxicol Chem* 16:1410-1416
- Martinez CBR, Souza MM (2002) Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp Biochem Physiol* 133A: 151-160
- Martinez CBR, Nagae MY, Zaia CTBV, Zaia DAM (2004) Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz J Biol* 64:797-807
- Mazon AF, Fernandes MN (1999) Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Bull Environ Contam Toxicol* 63:797-804
- Pacheco M, Santos MA (2001a) Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 49:64-75
- Pacheco M, Santos MA (2001b) Tissue distribution and temperature-dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. *Environ Int* 26:149-155
- Pollino CA, Holdway DA (2003) Hydrocarbon-induced changes to metabolic and detoxification enzymes of the Australian crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Environ Toxicol* 18:21-28
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57-149
- Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77: 591-625

- Zhang JF, Shen H, Xu TL, Wang R, Li WM, Gu YF (2003) Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. *Bull Environ Contam Toxicol* 71:234-239
- Zhang YS, Andersson T, Förlin L (1990) Induction of hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in rainbow trout by β -naphthoflanone. Time-course studies. *Comp Biochem Physiol* 95B:24-253

ARTIGO II

**Biomarcadores Bioquímicos, Fisiológicos e Histológicos do Peixe
Neotropical *Prochilodus lineatus* Exposto à Fração Solúvel do Óleo
Diesel**

Juliana Delatim Simonato e Cláudia B. R. Martinez

**Biomarcadores Bioquímicos, Fisiológicos e Histológicos do Peixe Neotropical
Prochilodus lineatus Exposto à Fração Solúvel do Óleo Diesel**

Juliana Delatim Simonato e Cláudia B. R. Martinez*

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina. Paraná. C.P.
6001. CEP 86051-990.

* Corresponding author. Tel.: +55-43-33714650; fax: +55-43-33714207; E-mail address:
cbueno@uel.br (C. B. R. Martinez).

RESUMO

No presente estudo foram avaliadas as alterações em parâmetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do óleo diesel. Foram realizados testes de toxicidade simulando um vazamento de óleo diesel em ambiente tropical. Para o preparo da fração solúvel do diesel em água (FSD) o óleo diesel automotivo comercial foi adicionado a água (1:4) e a mistura recebeu radiação solar direta durante 6 horas. Após, a fração solúvel foi coletada e diluída para 50%. Os peixes foram expostos à FSD ou apenas à água (controle) em testes estáticos agudos de 6h, 24h e 96h e sub-crônico de 15 dias. Foram analisados os seguintes parâmetros: hematócrito, conteúdo de hemoglobina, concentrações plasmáticas de cortisol, glicose, proteínas totais, sódio, cloreto, potássio e osmolaridade, além da atividade hepática das enzimas catalase e glutatona-S-transferase (GST) e a ocorrência de alterações histológicas nas brânquias e fígado. Foi observada diminuição do conteúdo de hemoglobina e do hematócrito nos dois últimos tempos experimentais. Estes resultados hematológicos associados ao aumento do potássio observado nos mesmos períodos, indicam a ocorrência de hemólise devido a exposição à FSD. A liberação de cortisol parece ter sido inibida pelo diesel, como indicada pela redução significativa de sua concentração após 15 dias, em relação ao grupo controle. A hiperglicemia encontrada após 24h e 96h de exposição e a diminuição da concentração plasmática de proteínas totais após 15 dias, refletem uma mobilização energética necessária para manter o equilíbrio homeostático. Os peixes apresentaram ativação da GST hepática após 96h e 15 dias de exposição, indicando a estimulação das reações de biotransformação associadas ao metabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos presentes na FSD. O fato de não ter havido indução da catalase hepática não exclui a possibilidade de ter ocorrido aumento na geração de oxirradicais após a exposição à FSD, pois outras enzimas podem ter atuado na metabolização dos hidroperóxidos. Os parâmetros osmo-iônicos dos animais expostos à FSD, com exceção do potássio, mantiveram-se estáveis, indicando que o diesel não interferiu na manutenção da homeostase osmô-iônica desses peixes. Os animais expostos à FSD apresentaram alterações histológicas moderadas nas brânquias e danos mais severos no fígado, que devem interferir diretamente em processos fundamentais para a manutenção da homeostase desses peixes.

Palavras-chave: óleo diesel, *Prochilodus lineatus*, biomarcadores bioquímicos, resposta de estresse, histopatologia.

1. Introdução

De todos os problemas causados pelo excesso de poluição ambiental, um dos mais preocupantes é a contaminação das águas e a conseqüente escassez dos recursos hídricos de boa qualidade. Dentre os diferentes tipos de poluentes, os derivados de petróleo estão dentre os mais relevantes para a ecotoxicologia aquática (Pacheco e Santos, 2001a). Embora grandes vazamentos de petróleo sejam preocupantes e ocupem grande espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por petróleo e seus derivados seja decorrente de pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis em postos de distribuição, favorecidos pelo envelhecimento dos tanques de combustíveis (Tiburtius et al, 2005) atingindo assim águas subterrâneas e posteriormente os rios. O petróleo e seus derivados podem promover sérios distúrbios nos ecossistemas aquáticos uma vez que suas frações solúveis em água (FSA) podem alcançar águas naturais, tornando-se biologicamente disponíveis aos organismos aquáticos. Sendo assim, a avaliação dos efeitos da poluição por esses compostos é um trabalho importante e urgente (Zhang et al, 2003).

A exposição ao petróleo cru e derivados pode induzir uma variedade de sintomas tóxicos em animais experimentais. Os hidrocarbonetos do petróleo são conhecidos como um potente mediador na geração de radicais livres em peixe (Achuba e Osakwe, 2003). Trabalhos com o peixinho dourado *Carassius auratus* já mostraram o aumento das defesas antioxidantes destes animais após exposição a diferentes concentrações da fração solúvel do diesel em vários tempos experimentais (Zhang et al, 2003 e 2004). Outros estudos também indicaram que a exposição de peixes à fração solúvel de derivados de petróleo promove alterações nas concentrações plasmáticas do cortisol (Alkindi et al, 1996; Pacheco e Santos, 2001b), sugerindo que estes contaminantes promovem uma resposta ao estresse.

Alguns autores relacionaram a exposição aos hidrocarbonetos do petróleo à hemólise de eritrócitos e/ou hemorragia (Alkindi et al, 1996), entretanto, outros autores observaram aumento no hematócrito de peixes exposto à fração solúvel do diesel (Davison et al, 1992). Vários trabalhos também relacionaram danos estruturais em órgãos e tecidos devido à exposição dos peixes aos derivados de petróleo (Engelhardt et al, 1981; Khan, 1998 e 2003).

Apesar de vários experimentos de laboratórios, com diferentes tipos de organismos, já terem sido realizados para avaliar a toxicidade do óleo diesel, ainda são poucos os experimentos com peixes (Pacheco e Santos, 2001b), especialmente aqueles de ambientes dulcícolas (Pollino e Holdway, 2003), e mais escassos ainda são os trabalhos com espécies de peixes neotropicais. A espécie *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae),

popularmente conhecida como curimba, é uma espécie nativa das regiões Sul e Sudeste do Brasil, muito utilizada para consumo humano. Trata-se de uma espécie detritívora, desta forma, encontra-se em contato direto com poluentes eventualmente depositados no sedimento. Alguns trabalhos realizados têm demonstrado que essa espécie é muito sensível a contaminantes e por isso é considerada como um potencial bioindicador para monitoramentos ambientais (Mazon e Fernandes, 1999; Martinez e Souza, 2002; Martinez et al, 2004; Almeida et al, 2005; Camargo e Martinez, 2006).

Desta forma, considerando-se que casos de acidentes ambientais envolvendo vazamentos de petróleo e derivados em águas continentais vêm se acumulando nos últimos anos no Brasil, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do óleo diesel na espécie de peixe Neotropical *Prochilodus lineatus* (curimba), após exposição aguda e sub-crônica à fração solúvel de óleo diesel, utilizando biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e histopatológicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Exemplares jovens de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847), com peso de $29,1 \pm 14,7$ g (média \pm DP, n=114), fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), foram aclimatados às condições do laboratório durante, no mínimo sete dias, em tanque de 600 L, preenchido com água ($21,3$ °C; pH 7,35; OD $7,79$ mgO₂.L⁻¹; condutividade 110 μ S.cm⁻¹; Na⁺ $0,086$ mM.L⁻¹, K⁺ $0,030$ mM.L⁻¹; Cl⁻ $0,103$ mM.L⁻¹; dureza 80 mg. L⁻¹ CaCO₃). Durante esse período os peixes foram alimentados com ração peletizada a cada 48h.

2.2. Preparação da Fração Solúvel do Óleo Diesel

No presente estudo foi utilizado o óleo diesel automotivo do tipo "B", com no máximo 0,35% de enxofre, adquirido em posto comercial de abastecimento de combustíveis. A simulação de derrame foi realizada em escala de laboratório de acordo com a metodologia de Nicodem et al (1998). No derrame uma parte de diesel foi adicionada a 4 partes de água, em aquário de vidro e a solução foi exposta por 6 horas à luz solar intensa, iniciando a etapa da reação fotoquímica, onde os componentes fotodegradados do combustível foram incorporados à água. Em seguida, a fração superior insolúvel foi descartada e a fração solúvel (FSD) restante foi coletada e armazenada em recipientes opacos, em câmara fria, por no máximo

cinco dias, até o momento dos experimentos. Para cada grupo experimental, a FSD foi diluída para 50% com água tratada e decolorada e distribuída em aquários com capacidade de 100L. A FSD (antes e após a diluição) foi qualificada em espectrofluorímetro quanto à presença de hidrocarbonetos mono e poliaromáticos.

2.3. Testes de toxicidade aguda e sub-crônica

Após a aclimação, os peixes foram submetidos a testes de toxicidade estáticos, agudos (6h, 24h e 96h) e sub-crônico (15 dias), de acordo com a metodologia padronizada no Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos (SEMA, 1988). Os testes foram realizados em aquários de vidro de 100 L, contendo 8 peixes cada. Um grupo controle, constituído de 8 animais expostos apenas à água (a mesma utilizada na aclimação), foi amostrado em cada intervalo experimental, simultaneamente aos grupos expostos a água contaminada. Para cada tempo experimental foi realizada uma réplica.

2.4. Análise química da água

Os parâmetros temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água utilizada nos testes de toxicidade foram monitorados continuamente.

2.5. Obtenção das amostras

Imediatamente após a retirada dos curimbas dos aquários, estes foram anestesiados com benzocaína ($0,1\text{g.L}^{-1}$) e o sangue foi extraído da veia caudal com seringa heparinizada. Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados por secção medular, medidos (comprimento total e padrão) e pesados, e as brânquias e o fígado foram retirados, com auxílio de material de dissecação. O sangue foi então centrifugado, durante 5 minutos a 3000 g e o plasma obtido foi congelado (-20°C) até o momento das análises. Uma parte do fígado dos peixes foi mantida resfriada e congelada a 80°C negativos. A outra parte do fígado e as brânquias foram fixadas para análises histológicas.

2.6 Análise de parâmetros sanguíneos

Do sangue coletado, uma alíquota foi usada para a determinação do hematócrito (Hcto) e do conteúdo de hemoglobina (Hb). Para a determinação do Hcto amostras de sangue foram centrifugadas por 5 minutos em capilares de microhematócrito heparinizados e as leituras foram feitas com auxílio de uma cartela padronizada para esse fim. O conteúdo de Hb (Kit comercial Labtest, Brasil) foi determinado pelo método da cianometahemoglobina, em

espectrofotômetro em 540 nm. Os resultados foram comparados com uma solução padrão de concentração conhecida (10g.dL^{-1}). Em seguida, o sangue foi centrifugado por 5 min a 5000 g e o plasma obtido foi mantido congelado a -20°C até o momento das dosagens. Para a análise do cortisol (Kit comercial – Diagnostic System, EUA) foi utilizado ensaio imunoenzimático e as leituras foram feitas em uma leitora de microplacas (Dynex MRXTC) em 450 nm. A glicemia (Kit comercial Labtest, Brasil) foi medida por meio do método enzimático da glicose-oxidase; a concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com Lowry et al (1951), usando albumina de soro bovino (BSA) para a curva-padrão. As concentrações plasmáticas de sódio e potássio foram determinadas em fotômetro de chama (Analyser-900) e de cloreto (Kit comercial Labtest, Brasil) por método colorimétrico, utilizando-se a reação com tiocianato de mercúrio em 470 nm. A osmolaridade foi determinada por congelamento em osmômetro (Gonotc – Osmomat 030).

2.7. Análise de parâmetros bioquímicos

Para as análises das enzimas foram utilizadas as amostras de fígado que foram mantidas congeladas (-80°C) até o momento dos ensaios. Os órgãos foram pesados, homogeneizados em tampão fosfato 0,1M e $\text{pH}=7,0$ (10X o volume), e então foram centrifugados, durante 20 minutos, a 14700 g (4°C) e o sobrenadante foi separado para as determinações enzimáticas. A atividade da catalase foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo-se a velocidade de decomposição da H_2O_2 , por meio do decréscimo de absorbância em 240 nm, e foi expressa em $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína hepática⁻¹. A atividade da glutathiona-S-transferase (GST) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Keen et al (1976), seguindo-se a complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm e foi expressa em $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína hepática⁻¹. A concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada de acordo com o método de Lowry et al (1951).

2.8. Análises Histológicas

Para as análises histológicas, o fígado e as brânquias foram fixados em solução contendo álcool, formol e ácido acético (ALFAC) por 16 horas, depois a solução foi substituída por álcool 70%. Os órgãos foram desidratados em série alcoólica crescente, diafanizados em xilol (PA), impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo, em cortes de 5 μm de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina

e eosina (HE). Os cortes foram analisados em microscópio de luz e fotografados utilizando-se uma câmara digital. Para análise semi-quantitativa utilizou-se o Índice de Alterações Histológicas (IAH), proposto por Poleksić e Mitrović-Tutundžić (1994) e que se baseia na severidade das lesões observadas. Para isso, cada alteração, branquial e hepática, foi classificada em graus progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais: grau I, alterações que não comprometem o funcionamento do órgão; grau II para alterações mais severas que comprometem o funcionamento do órgão, mas são reversíveis; e grau III, para as alterações mais graves que comprometem de forma irreversível o funcionamento do órgão. Um valor de IAH branquial e hepático foi calculado para cada animal, de acordo com a fórmula: $IAH = 1.\sum I + 10.\sum II + 100.\sum III$, onde I, II e III correspondem ao número de alterações de estágio I, II e III respectivamente. Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do tecido; entre 11 e 20 indicam danos leves ao órgão; entre 21 e 50 indicam danos moderados; de 50 a 99, danos severos e maiores que 100 indicam danos irreversíveis no tecido (modificado de Poleksić e Mitrović-Tutundžić, 1994).

2.9. Análise estatística

Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram comparados com seu respectivo grupo controle utilizando-se o teste paramétrico t de student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados. Foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1 Análise da água

A qualificação da FSD por espectrofluorimetria evidenciou a presença de hidrocarbonetos monoaromáticos e poliaromáticos em todos os tempos de exposição. Os picos de emissão de fluorescência evidenciados indicaram uma predominância de benzeno, tolueno, xileno, naftaleno, fluoreno e fenantreno. As características físico-químicas da água para todos os períodos experimentais mantiveram-se estáveis e os valores médios obtidos para os grupos experimentais foram (média \pm EP): temperatura $22,43 \pm 0,14^\circ\text{C}$; pH $6,96 \pm 0,04$; OD $6,52 \pm 0,12 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$; condutividade $107,89 \pm 3,22 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e dos grupos controle os

valores obtidos foram: temperatura $22,82 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$; pH $6,98 \pm 0,04$; OD $6,65 \pm 0,12 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$; condutividade $116,24 \pm 3,36 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.2 Hematócrito e conteúdo de hemoglobina

Os valores de hematócrito e conteúdo de hemoglobina dos peixes expostos a FSD, durante 96h e 15 dias, foram significativamente menores em relação aos respectivos grupos controle (Fig.1).

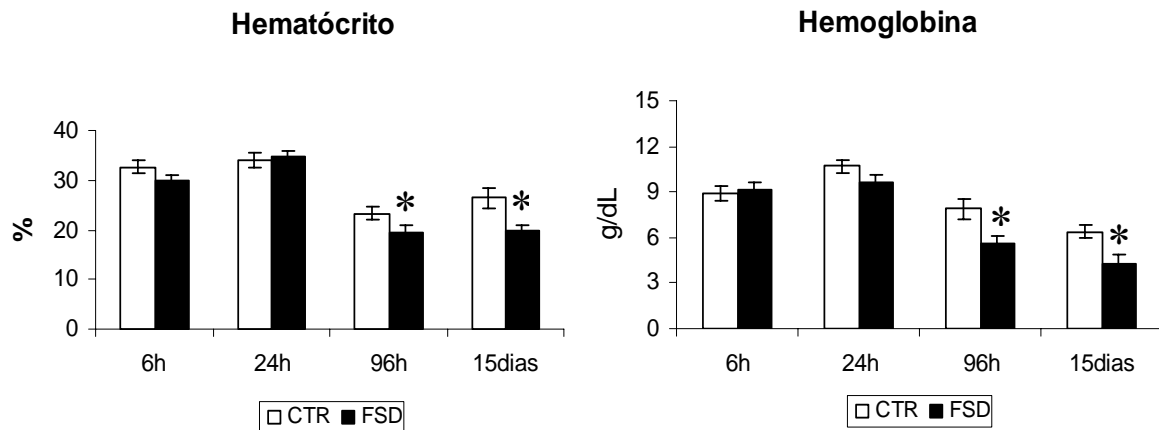


Figura 1. Valores de hematócrito (%) e conteúdo de hemoglobina ($\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel de diesel (FSD) ou apenas à água (CTR) durante diferentes períodos experimentais. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP. * indica valor significativamente diferente do controle, para o mesmo período experimental.

3.3. Cortisol e glicose

Os animais expostos a FSD durante 15 dias apresentaram redução significativa na concentração de cortisol plasmático, em relação ao respectivo controle. Já a glicose plasmática dos peixes expostos a FSD durante 24 e 96h foi significativamente maior em relação aos respectivos grupos controles (Fig. 2).

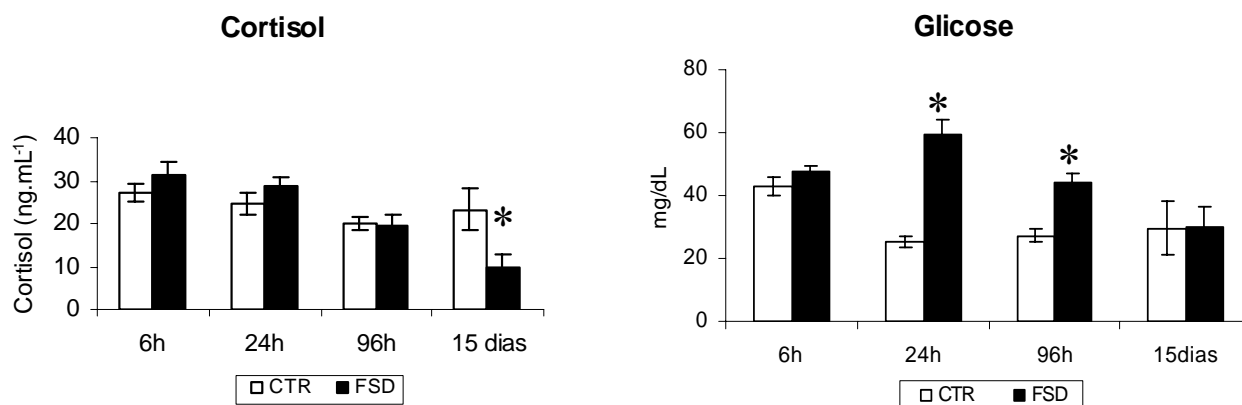


Figura 2. Concentrações plasmáticas de cortisol (ng.mL⁻¹) e glicose (mg.dL⁻¹) de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel de diesel (FSD) ou apenas à água (CTR) durante diferentes períodos experimentais. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP. * indica valor significativamente diferente do controle, para o mesmo período experimental.

3.4. Atividade hepática das enzimas catalase e GST

A atividade da catalase hepática não variou significativamente nos grupos expostos à FSD em relação aos seus respectivos grupos controles. Por outro lado, a GST hepática foi significativamente maior nos peixes expostos a FSD, durante 96h e 15 dias, em relação aos respectivos grupos controle (Fig.3).

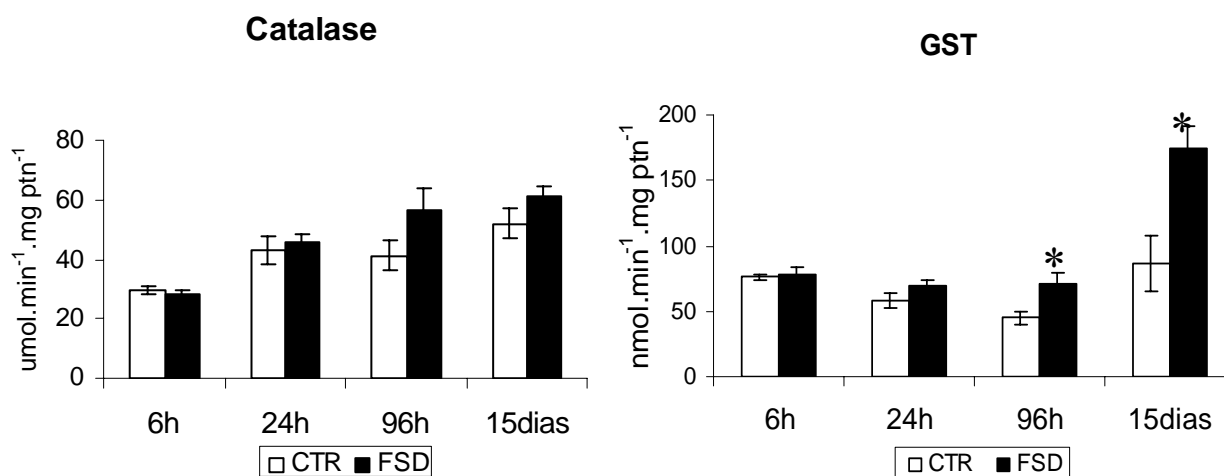


Figura 3. Atividade hepática da catalase e glutationa-S-transferase (GST) de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel de diesel (FSD) ou apenas à água (CTR) durante diferentes períodos experimentais. As barras representam as médias e as linhas verticais o EP. * indica valor significativamente diferente do controle, para o mesmo período experimental.

3.5. Parâmetros metabólicos e osmo-iônicos

Os valores de proteínas plasmáticas totais dos peixes expostos à FSD durante 15 dias apresentaram redução significativa em relação ao grupo controle. Nos animais expostos à

FSD, durante 6h, a concentração plasmática de sódio foi significativamente menor em relação ao respectivo controle. Já para o potássio, os animais expostos à FSD, durante 6h, 96h e 15 dias, apresentaram valores significativamente maiores quando comparados com os respectivos controles. Não foram constatadas alterações significativas na osmolaridade e na concentração plasmática de cloreto (Tabela 1).

Tabela 1. Valores das concentrações plasmáticas de proteínas totais, osmolaridade, Na⁺, Cl⁻ e K⁺ de *P. lineatus* expostos à FSD ou apenas à água (CTR) durante diferentes períodos.

Parâmetros	G	6h	24h	96h	15dias
Proteínas (mg.mL ⁻¹)	CTR	23,3±0,4(7)	19,4±0,6(11)	21,0±0,7(12)	30,1±1,6(4)
	FSD	23,8±0,4(6)	20,0±0,6(12)	20,4±0,9(15)	22,6±1,2(6)*
Osmolaridade (mOsm.L.H ₂ O ⁻¹) 1)	CTR	306,3±3,2(16)	263,6±4,2(11)	299,0±5,4(12)	278,7±25,2(3)
	FSD	320,4±10,9(16)	264,7±6,1(11)	307,1±5,3(14)	298,7±20,1(7)
Na ⁺ (mM.L ⁻¹)	CTR	137,0±2,7(16)	140,0±2,7(11)	130,3±3,1(12)	132,0±2,2(4)
	FSD	128,1±2,1(16)*	137,2±2,0(11)	129,0±3,0(14)	133,7±4,2(8)
Cl ⁻ (mM. L ⁻¹)	CTR	99,0±1,7(8)	104,9±1,5(10)	102,9±2,4(12)	101,6±5,8(3)
	FSD	94,92±1,56(8)	106,4±1,7(11)	107,9±2,4(14)	104,2±5,5(5)
K ⁺ (mM. L ⁻¹)	CTR	1,7±0,3 (6)	2,1±0,4(6)	2,3±0,2(8)	2,8±0,4(4)
	FSD	3,22±0,3(8) *	2,20±0,37(6)	3,0±0,2(8)*	5,1±0,2(8)*

Os valores representam a média ± EP(n) * indica valor significativamente diferente do controle, para o mesmo período experimental.

3.6. Análises histopatológicas

Os peixes expostos à FSD apresentaram uma série de alterações histológicas nas brânquias (Tabela 2) e no fígado (Tabela 3). As alterações branquiais mais relevantes foram: descolamento epitelial (Fig. 4 A), hiperplasia com descolamento epitelial (Fig. 4B) e aneurisma (Fig. 5). Os valores de IAH determinados para as brânquias de *P. lineatus* expostos à FSD durante 24 e 96 horas e 15 dias foram significativamente maiores que aqueles dos respectivos grupos controle (Fig. 6), com valores médios de IAH de 42, indicando danos moderados nas brânquias.

Tabela 2. Alterações histológicas branquiais com seus respectivos graus de comprometimento funcional (I e II) e a frequência dessas alterações em *P. lineatus* expostos à FSD (E) e apenas à água (C).

Alterações	Grau	Tempo de Exposição							
		6h		24h		96h		15 dias	
		C	E	C	E	C	E	C	E
Congestão vascular	I	+	++++	+	+++	+	+++	+	+++
Constrição do seio	I	+	+++	++	++++	++	+++	+	+++
Desarranjo lamelar	I	+	+++	++	++++	++	+++	+	+++
Dilatação do canal marginal	I	++	++	++	++	+0	++	+	++
Aumento do espaço entre as células pilares	I	+	++	++	+	+	+	+0	++
Descolamento Epitelial	I	++	++++	++	+++	+	+++	++	+++
Fusão completa de várias lamelas	I	+	++	+	++	+0	+	+0	++
Fusão incompleta de várias lamelas	I	+	+	++	++	++	+++	++	+
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	++	++	++	++	++	+++	++	++
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	0	+0	+0	+++	0	+	+0	+
Aneurisma	II	0	+0	0	+	0	+	0	+
Fusão completa de todas as lamelas	II	+0	+	0	+0	0	0	+0	+0
Hemorragia com ruptura do epitélio	II	0	+	+0	++	+0	+	+0	+
Rompimento das células pilares	II	++	+++	++	+++	++	+++	+	++
Ruptura do epitélio lamelar	II	+	++	++	++	+	++	+	++

Nota: 0 = ausente; +0 = raramente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente; ++++ = extremamente freqüente.

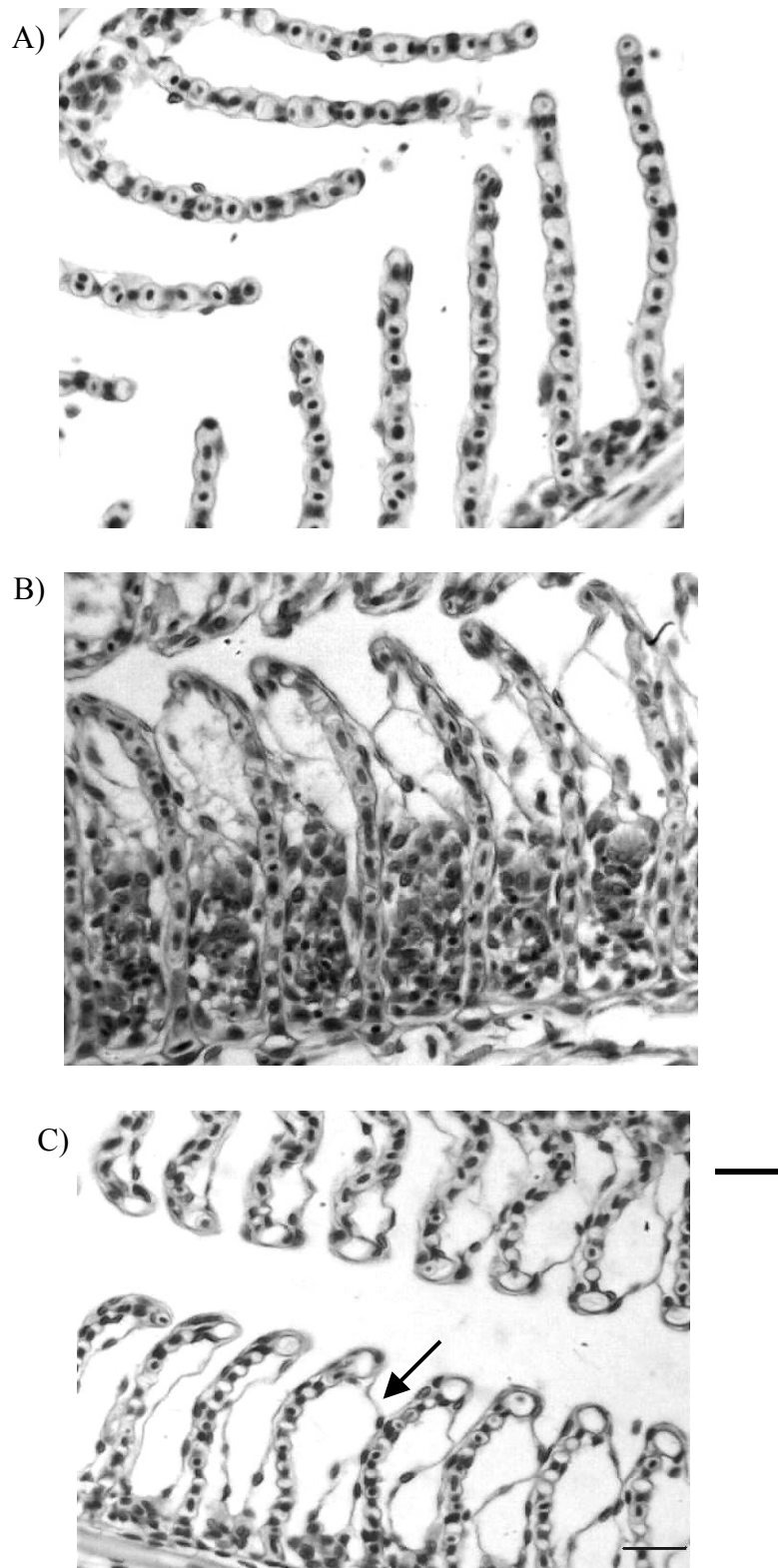


Figura 4. Fotomicrografia de brânquia de *Prochilodus lineatus*. A) animal exposto somente à água (controle); B) animal do grupo exposto à FSD após 6h, mostrando hiperplasia do epitélio (seta) e descolamento epitelial; C) animal exposto à FSD durante 15 dias, mostrando a ampla ocorrência de descolamento epitelial (seta). HE. A barra de escala corresponde a 50 μ m.

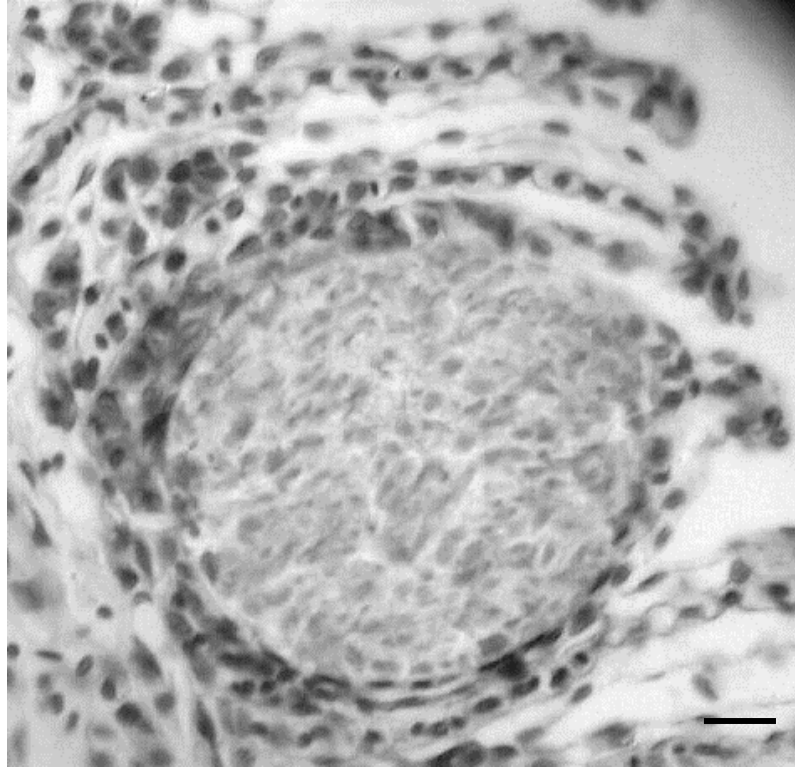


Figura 5. Fotomicrografia de brânquia de *Prochilodus lineatus*, expostos à FSD durante 6h, mostrando um aneurisma. HE. A barra de escala corresponde a 50µm.

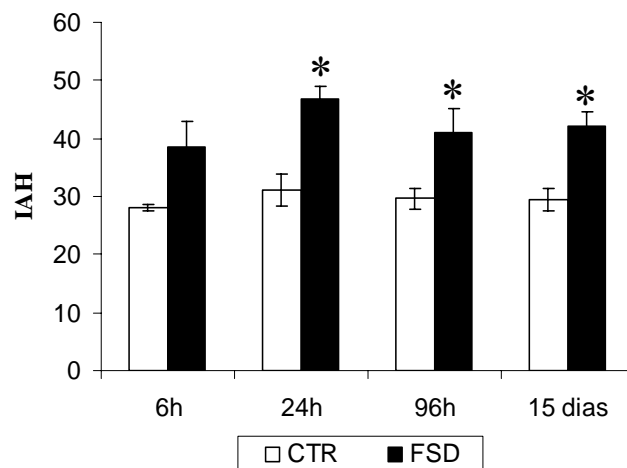


Figura 6. Índice de alterações histológicas (IAH) para brânquias dos animais expostos à FSD e seus respectivos grupos controle (CTR). As barras representam as médias e as linhas verticais o EP. * indica valor significativamente diferente do controle, para o mesmo período experimental ($P < 0,05$).

Tabela 3. Alterações histológicas hepáticas com seus respectivos graus de comprometimento funcional (I e II) e a frequência dessas alterações em *P. lineatus* expostos à FSD (E) e somente à água (C).

Alterações	Grau	Tempo de Exposição							
		6h		24h		96h		15 dias	
		C	E	C	E	C	E	C	E
Agregado de melanomacrófago	I	++	++	+	0	+	+	+	++
Atrofia celular	I	0	+	0	+++	+	++	+	+
Atrofia nuclear	I	+	+++	+	+++	++	+++	+	++
Aumento do volume celular	I	+	++	+	++	+0	++	+0	+++
Aumento do volume nuclear	I	+	+++	+	+++	0	+++	+0	++++
Deformação do contorno celular	I	+	++	++	+++	+	+	++	+++
Deformação do contorno nuclear	I	++	+++	++	++++	+	++	++	+++
Núcleos na periferia da célula	I	0	0	+	++	+0	0	+	++
Vacuolização citoplasmática	I	+	++	+++	+	++	+	+++	++
Vacuolização nuclear	II	+	+++	++	+++	+0	+++	+	+++
Degeneração citoplasmática	II	++	++++	++	++++	++	+++	+	++++
Degeneração nuclear	II	++	++++	++	++++	++	++++	++	++++
Estagnação biliar	II	++++	++++	+++	++	++++	++++	+++	++++
Hiperemia	II	+	++	+	++	+	+	+0	+
Núcleos picnóticos	II	0	++	0	++	0	++	0	++
Rompimento celular	II	+	+++	+	+++	+0	+++	+	+++
Rompimento de vaso	II	0	+	0	+0	0	+0	+0	+

Nota: 0 = ausente; +0 = raramente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente; ++++ = extremamente freqüente.

As alterações histológicas mais relevantes observadas no fígado dos peixes expostos à FSD foram: estagnação biliar, degeneração nuclear e celular (Fig. 7). A estagnação biliar foi encontrada em todos os animais analisados, inclusive nos animais dos grupos controle (Tabela 3). O IAH determinado para o fígado dos animais expostos à FSD foi significativamente maior, em relação ao respectivo grupo controle, em todos os tempos experimentais (Fig. 8). O valor médio de IAH dos grupos expostos à FSD foi de 73, indicando danos severos no fígado com provável comprometimento da função hepática.

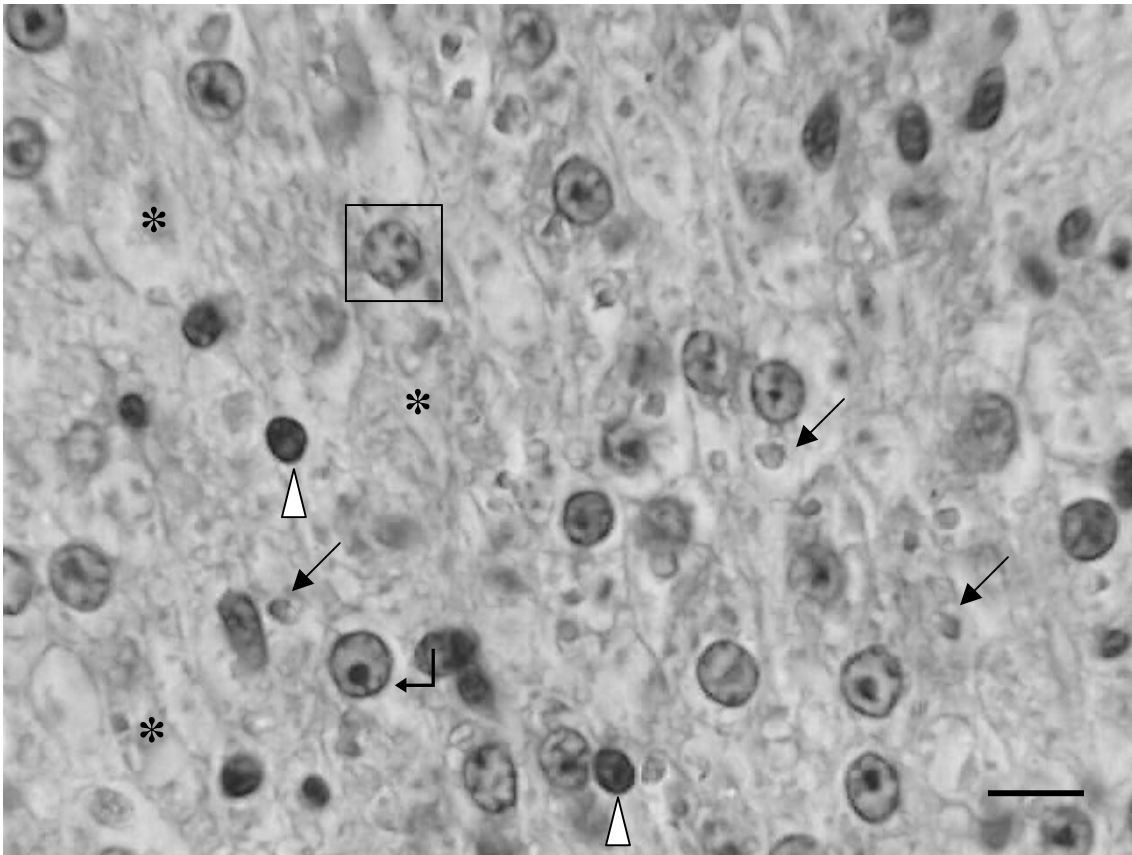


Figura 7. Fotomicrografia de fígado de *Prochilodus lineatus* exposto à FSD durante 15 dias, mostrando estagnação biliar (seta), núcleos picnóticos (cabeça de seta), degeneração celular (*), degeneração nuclear (□), aumento do volume nuclear (↕). HE. A barra de escala corresponde a 50µm.

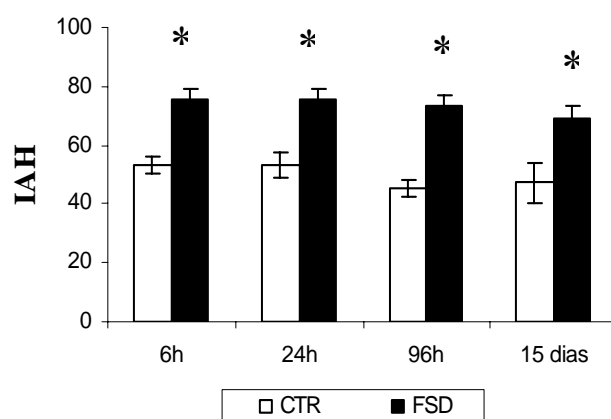


Figura.8. Índice de alterações histológicas (IAH) para fígado dos animais expostos à FSD e seus respectivos grupos controle (CTR). As barras representam as médias e as linhas verticais o EP. * indica valor significativamente diferente do controle, para o mesmo período experimental ($P < 0,05$).

4. Discussão

O óleo diesel, assim como outros produtos destilados do petróleo, apresenta baixa solubilidade na água e, portanto, as investigações em laboratório sobre seus efeitos envolvem a preparação de frações solúveis em água. No presente trabalho, os peixes foram expostos a uma solução experimental contendo 50% de fração solúvel do diesel (FSD). As análises realizadas mostraram que esta FSD continha compostos polares de baixo peso molecular, isto é, hidrocarbonetos aromáticos de dois grupos toxicologicamente relevantes: BTX (benzeno, tolueno e xileno) e pequenos hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) como o naftaleno, fluoreno e fenantreno. Composição da FS de diesel semelhante já foi reportada em outros trabalhos (Anderson et al, 1974; Pacheco e Santos, 2001a).

A exposição dos peixes à FSD durante 96h e 15 dias promoveu uma redução no hematócrito e no conteúdo de hemoglobina, que coincidiu com um aumento nos valores de K^+ plasmáticos. Em conjunto, estes resultados indicam que o aumento do K^+ deva ter ocorrido como resultado da hemólise dos eritrócitos, que por sua vez levou ao decréscimo nos valores de hematócrito e conteúdo de hemoglobina. Portanto, pode-se sugerir que em exposições prolongadas, com mais de 96 horas, os hidrocarbonetos presentes na FSD induziram à hemólise dos eritrócitos de *P. lineatus*. Efeitos semelhantes foram encontrados em linguados (*Pleuronectes flesus*) após 24h e 48h de exposição FSA do óleo cru, com redução de hematócrito e hemoglobina acompanhada pelo aumento na concentração do potássio plasmático, sem que as concentrações plasmáticas do sódio e cloreto e a osmolaridade fossem afetadas (Alkindi et al, 1996).

Entretanto, resultados diferentes foram relatados para o peixe antártico *Pagothenia borchgrevinki*, que apresentou aumento no hematócrito e no conteúdo de hemoglobina também após a exposição aguda à fração solúvel do diesel (Davison et al, 1992 e 1993). Assim, fica claro que a exposição a um mesmo agente químico pode induzir diferentes alterações (aumento ou decréscimo) nos parâmetros hematológicos (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004), que podem indicar respostas adaptativas para o agente estressor ou os efeitos diretos destes contaminantes sobre os eritrócitos ou sua produção.

Normalmente, após a exposição a um agente estressor, ocorre um aumento significativo da glicemia. No presente estudo os animais apresentaram uma resposta hiperglicêmica após 24h e 96h de exposição à FSD, indicando a disponibilização de reservas energéticas para sua imediata utilização (Val et al, 2004). Seguindo o mesmo padrão, Alkindi et al (1996) também observaram em linguados (*Pleuronectes flesus*) concentrações plasmáticas de glicose significativamente elevadas após 3h de exposição à FSA do óleo cru e um aumento de mais de 50% após 48h. Entretanto, Pacheco e Santos (2001b) não encontram diferenças significativas nos valores de glicemia de enguias (*Anguilla anguilla*) expostas à FSD, durante 3h e 4h, em relação aos grupos controle. Segundo estes autores a glicose pode não ser o mais importante combustível no metabolismo energético para esta espécie de enguia.

A resposta ao estresse compreende uma série de alterações fisiológicas e seus efeitos primários resultam em liberação de catecolaminas e corticosteróides no plasma (Wendelaar Bonga, 1997). Em peixes teleósteos a elevação plasmática do cortisol, produzido nas células interrenais do rim anterior (Hontela, 1997), é reconhecida como a principal resposta hormonal ao estresse (Wendelaar Bonga, 1997) e a elevação dos níveis plasmáticos desse hormônio é muito utilizada como biomarcador. Em linguados (*Pleuronectes flesus*) expostos FSA do óleo cru, durante 3, 24 e 48 horas, Alkindi et al (1996) verificaram a elevação da concentração de cortisol plasmático. Entretanto, no presente trabalho, os valores de cortisol plasmático só variaram após 15 dias de exposição à FSD, quando se observou uma diminuição significativa deste parâmetro. Seguindo este mesmo padrão, Pacheco e Santos (2001a) notaram um decréscimo nas concentrações plasmáticas de cortisol em enguias (*Anguilla anguilla*) expostas à FSD durante 3h, 4h, 2 dias e 3 dias, e relacionaram esta redução a uma possível ação citotóxica direta da FSD nas células interrenais, provavelmente nas enzimas envolvidas na esteroidogênese. Sendo assim pode-se supor que compostos presentes na FSD de alguma forma interferem na liberação de cortisol. No entanto, em outro trabalho com a mesma espécie exposta à FSD, Pacheco e Santos (2001b) observaram um aumento do cortisol

plasmático após 3h. Isso mostra que a resposta do cortisol, além de ocorrer de modo diferente em espécies distintas, também pode variar dentro de uma mesma espécie. O controle endócrino da secreção do cortisol em peixes teleósteos é muito complexo (Wendelaar Bonga, 1997) e por isso, diferentes tipos de estressores agudos podem provocar respostas distintas (Martins et al, 2000). Neste trabalho, uma vez que a liberação do cortisol parece ter sido bloqueada, o aumento da glicemia em 24h e 96h deve ter ocorrido pela via das catecolaminas e o estado hiperglicêmico não foi mantido na exposição sub-crônica em virtude da falha na resposta do cortisol.

O metabolismo de proteínas pode fornecer informações sobre mobilização energética geral do animal e relacionar os efeitos dos contaminantes nesses organismos (Adams et al, 1990). No presente estudo, os peixes expostos à FSD após 15 dias, apresentaram uma redução significativa na concentração de proteína plasmática em relação ao grupo controle. É sabido que a liberação de catecolaminas e cortisol disparam uma variedade de alterações fisiológicas e bioquímicas, incluindo hiperglicemia, depleção de glicogênio, catabolismo de proteínas plasmáticas, entre outras. Essas respostas podem ser consideradas processos adaptativo, que permitem ao organismo um aumento na demanda energética durante a exposição a fatores estressante (Martinez e Cólus, 2002). Como visto anteriormente, os animais expostos à FSD após 15 dias, não apresentaram variação da glicemia em relação ao grupo controle. Isto pode refletir o esgotamento das reservas de carboidratos, em função de uma maior demanda energética deste grupo de animais, que passaram a metabolizar proteínas em resposta ao agente estressor.

Os líquidos corporais dos peixes de água doce são hiperosmóticos em relação ao meio aquático que os rodeiam, assim esses animais precisam evitar o ganho de água e a perda de sais pela urina, e os contaminantes presentes na água podem interferir neste balanço osmótico (Heath, 1995). Distúrbios nas concentrações plasmáticas de íons e/ou da osmolaridade já foram encontrados em várias espécies de peixes expostas à concentrações elevadas de hidrocarbonetos do petróleo (Engelhardt et al, 1981). Entretanto, no presente trabalho os animais expostos à FSD não apresentaram alterações significativas na osmolaridade e tão pouco na concentração plasmática de cloreto. Davison et al (1993) também não encontraram alterações significativas no cloreto e osmolaridade plasmáticas após a exposição de *Pagothenia borchgrevinki* à fração solúvel do diesel, durante 7 dias, em relação ao grupo controle. Por outro lado, os curimbas expostos à FSD durante 6h apresentaram redução do

Na⁺ plasmático, que se restabeleceu a após 24h de exposição, indicando uma alteração iônica transitória sem maiores implicações para a homeostase osmo-iônica destes peixes.

O fígado nos peixes é um órgão que desempenha diversas funções associadas ao metabolismo de xenobióticos (Jimenez e Stgegeman, 1990). Os hepatócitos assim como as demais células são dependentes de enzimas antioxidantes para proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidas durante a biotransformação de xenobióticos (Landis e Yu, 1995). Dentre as enzimas que fazem parte deste sistema de defesa temos a catalase, responsável pela remoção de peróxido de hidrogênio (H₂ O₂) que é metabolizado em O₂ e água (Van der Oost et al, 2003). Aumentos dose-dependentes na atividade da catalase do fígado e de outros órgãos foram constatados após 14, 21 e 28 dias em bagres africanos (*Clarias gariepinus*) expostos ao petróleo cru (Achuba e Osakwe, 2003). Isso mostra que os hidrocarbonetos do petróleo são potentes mediadores na geração de radicais livres em peixes e o aumento na atividade catalase em todos os tecidos examinados pode representar uma resposta adaptativa para proteger o peixe da toxicidade dos radicais livres induzidos por esses hidrocarbonetos. Zhang et al (2003) expuseram o douradinho (*Carassius auratus*) a diferentes concentrações do óleo diesel por 40 dias e a catalase também apresentou aumento significativo em uma das concentrações testadas. No entanto, no presente trabalho os animais expostos ao diesel não apresentaram alterações significativas na atividade hepática da catalase em relação ao grupo controle, apesar de ter existido uma tendência para o aumento da atividade dessa enzima nos períodos experimentais mais longos. O fato de não ter ocorrido indução da catalase hepática não exclui a possibilidade de ter havido aumento na geração de ERO após a exposição à FSD, pois outras enzimas, como a glutathiona peroxidase podem ter atuado na metabolização dos hidroperóxidos. Isso indica a necessidade de se incluir mais parâmetros anti-oxidantes para se analisar os possíveis efeitos da FSD na geração de oxiradicais e estresse oxidativo. Além disso, uma vez que as catalases estão localizadas nos peroxissomos de muitas células e estão envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, mudanças na sua atividade podem, muitas vezes, serem difíceis de interpretar. Em geral a catalase não é considerada um biomarcador válido para avaliação de risco ambiental, visto que tanto a sua indução como a sua inibição podem ser observadas após exposições à ambientes poluídos (Van der Oost et al, 2003).

Um rico suplemento de enzimas não específicas, como as glutathionas transferases, habilita o fígado para metabolizar um grande espectro de substâncias orgânicas (Landis e Yu, 1995). No presente estudo, a atividade da glutathiona-S-transferase (GST) nos *P. lineatus*

expostos à FSD apresentou aumento significativo após 96h e dobrou seu valor após 15 dias de exposição. Esse aumento também foi constatado após a exposição de *Carassius auratus* à fração solúvel do óleo diesel (Zhang et al, 2004). Outros autores também já verificaram que enzimas de detoxificação, como a glutathione-S-transferase, têm sua atividade aumentada na presença de hidrocarbonetos policíclicos (Stien, 1998, Van der Oost et al, 2003). Assim, o aumento da GST verificado no presente trabalho reforça o importante papel desta enzima na biotransformação dos compostos presentes na FSD e mostra que a atividade da GST pode ser um bom biomarcador para contaminação por derivados de petróleo.

Como as brânquias são extremamente importantes na respiração, osmorregulação, balanço ácido-básico e excreção de nitrogênio em peixes (Heath, 1995) e constituem a maior área de contato do animal com o ambiente externo, a análise de sua morfologia pode ser muito útil como parâmetro para o monitoramento ambiental (Schwaiger et al, 1997). No presente trabalho, as brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos à FSD apresentaram a ocorrência de alterações histológicas. Algumas dessas alterações podem ser consideradas adaptativas, pois protegem o organismo da entrada dos xenobióticos, como é o caso do descolamento epitelial. O aneurisma, por outro lado, já representa uma lesão que pode resultar do rompimento das células pilares e, portanto, corresponde a um efeito deletério do xenobiótico sobre o tecido branquial (Martinez et al, 2004). A análise semi-quantitativa das lesões mostrou que as brânquias dos animais expostos à FSD foram mais afetadas, com valores de IAH indicando a ocorrência de danos moderados. Esses resultados mostram que o óleo diesel provoca lesões branquiais em *Prochilodus lineatus*, que apesar de não terem afetado a homeostase osmôica, podem comprometer outras de suas várias funções e assim causar distúrbios funcionais nestes peixes. Khan, (1998) também encontrou nas brânquias de linguados (*Pleuronectes americanus*) coletados próximos a uma refinaria de petróleo, hiperplasia nas lamelas e no espaço inter-lamelar, bem como descolamento epitelial, e sugeriu uma conexão entre derramamentos de petróleo e as anormalidades encontradas. Em outro trabalho, com linguados coletados em local contaminado com PAHs, as brânquias apresentaram alterações como, hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar culminando em fusão e um aumento na produção de muco (Khan, 2003). Trutas arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) expostas a dois tipos de petróleo também apresentaram brânquias com anomalias no epitélio lamelar e gotas de óleo foram encontradas entre as lamelas (Engelhardt et al, 1981).

O fígado pode ser considerado um órgão-alvo e de grande importância para os peixes, já que participa de processos como biotransformação e excreção de xenobióticos e por isso

pode ser utilizado em monitoramento ambiental devido a sua alta sensibilidade a contaminantes (Thophon et al, 2003). Portanto, alterações em sua estrutura podem ser significativas na avaliação da saúde dos peixes (Myers et al, 1998). A estagnação biliar, observada indistintamente, tanto no fígado dos peixes expostos à FSD quanto nos animais do grupo controle, corresponde a um acúmulo de bile dentro dos hepatócitos, sendo evidenciada pelo aparecimento de grânulos amarelados intra-citoplasmáticos (Pacheco e Santos, 2001a; Fanta et al, 2003). Esta alteração consiste na manifestação de uma condição fisiopatológica, causada por uma falha no metabolismo e excreção da bile (Pacheco e Santos, 2001a), na qual a bile secretada pelos hepatócitos permanece dentro das células, não sendo liberada para o trato digestivo (Fanta et al., 2003). No presente trabalho, a ocorrência desta alteração não está associada à presença do xenobiótico, pois foi observada também no grupo controle, e deve refletir algum problema de ordem nutricional decorrente da alimentação dos peixes no cativeiro.

No presente trabalho, os peixes expostos à FSD apresentaram diversas alterações histológicas hepáticas, sendo que algumas dessas alterações, como o aumento do volume celular e nuclear, podem ser consideradas respostas ao agente estressor, pois indicam a ativação funcional deste órgão. Outras, como a degeneração celular e nuclear, representam lesões que podem culminar no comprometimento do órgão, portanto, correspondem aos danos causados pela exposição ao xenobiótico sobre o tecido. A análise quantitativa das lesões hepáticas mostrou que, nos animais expostos à FSD em todos os tempos experimentais, o fígado foi extremamente afetado, com valores médios indicando danos severos ao órgão. Um estudo com linguados (*Pleuronectes vetulus*) mantidos em sedimento contaminado com PAHs, também revelou a presença de lesões hepáticas severas, além de metabólitos desses compostos na bile (Myers et al, 1998). Linguados (*Pleuronectes americanus*) coletados próximo a uma refinaria de petróleo também apresentaram várias lesões histológicas no fígado que foram consideradas indicativas do impacto do petróleo na saúde desses peixes (Khan, 1998 e 2003).

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho mostram claramente que a fração solúvel do diesel promove alterações importantes em *Prochilodus lineatus*, desde o nível bioquímico até o tecidual. No nível bioquímico observou-se a ativação das vias de biotransformação de xenobióticos, pela ativação da GST. Pôde-se constatar também que a FSD promove a redução do hematócrito e conteúdo de hemoglobina, muito provavelmente em virtude da hemólise dos eritrócitos. Foi observado ainda um aumento dos níveis glicêmicos após a exposição aguda à FSD, provavelmente mediado pelas catecolaminas. Uma possível

falha na resposta do cortisol também pode ser associada à FSD, já que se observou redução do cortisol plasmático nos peixes expostos ao derivado de petróleo durante 15 dias; efeito esse que pode vir a comprometer as respostas adaptativas ao estresse. Além disso, a ocorrência de lesões nas brânquias, e ainda mais severas no fígado, deve acarretar prejuízos funcionais para ambos os órgãos, interferindo assim diretamente em processos fundamentais para a manutenção da homeostase desses peixes.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao Programa de Mestrado da Universidade Estadual de Londrina. À Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) pelo suplemento de peixes. Especialmente à Dr. Carmen L.B. Guedes pela preparação e análise da fração solúvel do diesel. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (CT-Petro/CNPq 502238/2003-8). J.D.Simonato agradece a CAPES pela bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achuba, F.I.; Osakwe, S.A. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 2003; 29: 97-103.
- Adams, S.M.; Shugart, L.R.; Southworth, G.R.; Hinton, D.E. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McARTHUR, J.F.; SHUGART, L.R. (Eds.). **Biomarkers of Environmental Contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1990; c.19: 333-353.
- Alkindi, A.Y.A.; Brown, J.A.; Waring, C.P.; Collins, J.E. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. **Journal of Fish Biology**, 1996; 49: 1291-1305.
- Almeida, J.S.; Meletti, P.C.; Martinez, C.B.R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2005; 140C: 356-363
- Anderson, J.W.; Neff, J.M.; Cox, B.A.; Tatem, H.E., Hightower, G.M. Characteristics of dispersions and water soluble toxicity to estuarine crustaceans and fish. **Marine Biology**, 1974; 27: 75-88

- Beutler, E. **Red Cell Metabolism**: A manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, 1975.
- Camargo, M. M. P.; Martinez, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2006; 21: 61-69
- Davison, W., Franklin, C.E., McKenzie, J.C., Dougan, M.C.R. The effects of acute exposure to the water soluble fraction of fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1992; 102C: 185-188
- Davison, W., Franklin, G.E., McKenzie, J.C., Carey, P.W. The effects of chronic exposure to the water soluble fraction of fuel oil on an Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1993; 104C: 67-70
- Engelhardt, F.R.; Wong, M.P.; Duey, M.E. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water as affected by petroleum exposure. **Aquatic Toxicology**, 1981; 1: 175-186.
- Fanta, E; Rios, F. S.; Romão, S.; Vianna, A. C. C.; Freiburger, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2003; 54: 119-130.
- Heath, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2nd ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995.
- Hontela, A. Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroid hormones. **Reviews in Toxicology**, 1997; 1:159-206.
- Jimenez, B.D.; Stegeman, J.J. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: ADAMS, S.M. (Ed). **Biological indicators of stress in fish**. Bethesda: American Fisheries Symposium 8, 1990; c.6, p. 67-79.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, 1976; 20: 6183-6188.
- Khan, R.A. Influence of petroleum at a refinery terminal on winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 1998; 61: 770-777.

- Khan, R.A. Health of Flatfish from Localities in Placentia Bay, Newfoundland, Contaminated with Petroleum and PCBs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 2003; 44: 485-492.
- Landis, W.G.; Yu, M.H. **Introduction to Environmental Toxicology**: Impacts of chemicals upon ecological system. Lewis publishers, USA, 1995.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 1951; 193: 265 - 275.
- Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: Medri, M.E. Bianchini, E.; Shibatta, O.A.; Pimenta, J.A (Eds.). **A Bacia do Rio Tibagi**, Londrina, Paraná, 2002; c 29, p. 551-577.
- Martinez, C.B.R., Souza, M.M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2002; 133A: 151-160.
- Martinez, C.B.R.; Nagae, M.Y.; Zaia, C.T.B.V.; Zaia, D.A.M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, 2004; 64: 797-807.
- Martins, M.L., Moraes, F.R., Moraes, J.R.E., Malheiros, E.B. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Caracidae). **Acta Scientiarum**, 2000; 22: 545-552.
- Mazon, A.F., Fernandes, M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 1999; 63: 797-804
- Myers, M.S.; Johnson, L.L.; Olson, O.P.; Stehr, C.M.; Horness, B.H.; Collier, T.K.; McCain, B.B. Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the northeast and Pacific Coast, USA. **Marine Pollution Bulletin**, 1998; 37: 92-113.
- Nicodem, D.E., Guedes, C.L.B., Correa, R.J. Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a Brazilian intermediate crude oil. **Marine Chemistry**, 1998; 63:93-104.
- Pacheco, M.; Santos, M.A. Biotransformation, genotoxic and histopatological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2001a; 53: 331-347.

- Pacheco, M.; Santos, M.A. Tissue distribution and temperature-dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. **Environment International**. 2001b; 26: 149-155.
- Poleksić, V.; Mitrović-Tutundžić, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R.; Lloyd, R. **Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, 1994; c 30, p. 339-352.
- Pollino, C.A.; Holdway, D.A. Hydrocarbon-induced changes to metabolic and detoxification enzymes of the Australian Crimson-Spotted rainbowfish (*Melanotania fluviatilis*). **Environmental Toxicology**, 2003; 18: 21-28.
- Ranzani-Paiva, M.J.T.; Silva-Souza, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.A.P. (Eds), **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Livraria Varela, São Paulo, 2004; p. 89-120.
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 1997; 6: 75-86.
- SEMA. **Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos**. Secretaria Especial do Meio Ambiente, Brasília, 1988.
- Stien, X.; Percic, P. Barelli-Gnassia, M.; Romeo, M.; Lafaurie, M. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of NW Mediterranean Sea. **Environmental Pollution**, 1998; 99: 339-345,
- Thophon, S.; Kruatrachue, M.; Upatham, E.S.; Pokethitiyook, P.; Sahaphong, S.; Jaritkhuan, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, 2003; 121: 307-320.
- Tiburtius, E.R.L.; Peralta-Zamora, P.; Emmet, A.; Leal, E.S. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. **Química Nova**, 2005; 28: 61-64.
- Val, A.L., Silva, M.N.P., Almeida e Val, V.M.F., 2004. **Estresse em peixe – ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos**. In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.A.P. (Eds), **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Livraria Varela, São Paulo, 2004; p. 75-88.

- Van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2003; 13: 57-149.
- Wendelaar Bonga, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, 1997; 77: 591-625.
- Zang, J.F.; Shen, H.; Xu, T.L.; Wang, X.R.; Li, W.M.; Gu, Y.F. Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2003, 71: 234-239.
- Zang, J.F.; Wang, X.R.; Guo, H.I.; Wu, J.C.; Xue, Y.Q. Effects of water-soluble fraction of diesel oil on the antioxidant defense of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2004, 58: 110-116.

6 CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados apresentados nos artigos I e II deixam claro que a fração solúvel do diesel promove alterações importantes em *Prochilodus lineatus*. No nível bioquímico observou-se a ativação das vias de biotransformação de xenobióticos, constatado pelo aumento da atividade da GST. Esta enzima mostrou ser um excelente parâmetro para monitoramento de áreas contaminadas por óleo diesel. No entanto, a catalase não demonstrou ser um bom biomarcador para a contaminação com diesel, pois os peixes expostos à FSD não apresentaram alterações significativas na atividade desta enzima. Os parâmetros hematológicos, em conjunto com os resultados de potássio plasmático, mostraram que a FSD promove a hemólise dos eritrócitos, com conseqüente redução no hematócrito e conteúdo de hemoglobina. A hiperglicemia observada nas exposições agudas à FSD indicou uma típica resposta ao estresse, provavelmente mediada pelas catecolaminas, pois parece ter havido uma falha na resposta do cortisol associada à exposição dos animais ao óleo diesel. As análises histológicas nas brânquias e no fígado indicaram a ocorrência de lesões histopatológicas que podem prejudicar o funcionamento de ambos os órgãos e assim interferir diretamente em processos fundamentais para a manutenção da homeostase desses peixes. Portanto, fica claro que o óleo diesel promove alterações significativas em alguns parâmetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos de *Prochilodus lineatus* e dentre estes parâmetros os melhores candidatos a biomarcadores para o monitoramento de locais contaminados com diesel seriam: atividade da GST hepática, o conteúdo de hemoglobina e hematócrito, associados ao potássio plasmático, concentração plasmática de cortisol, níveis glicêmicos e a ocorrência de lesões histológicas na brânquia e no fígado.

REFERÊNCIAS

- ABEL, P. D. 1989 **Water Pollution**. Chichester: Ellis Horwood Limited.
- ACHUBA, F.I.; OSAKWE, S.A. 2003 Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 29: 97-103.
- ADAMS, S.M.; SHUGART, L.R.; SOUTHWORTH, G.R.; HINTON, D.E. 1990 Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Eds.). **Biomarkers of Environmental Contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers. c19, p: 333-353.
- ALKINDI, A.Y.A.; BROWN, J.A.; WARING, C.P.; COLLINS, J.E. 1996 Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. **Journal of Fish Biology**, 49: 1291-1305.
- ALMEIDA, J.S.; MELETTI, P.C.; MARTINEZ, C.B.R. 2005 Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 140C: 356–363
- ANDERSON, J.W.; NEFF, J.M.; COX, B.A.; TATEM, H.E.; HIGHTOWER, G.M. 1974 Characteristics of dispersions and water soluble toxicity to estuarine crustaceans and fish. **Marine Biology**, 27: 75-88
- BEUTLER, E. 1975 **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Straton.
- BRACEWELL, P.; COWX, I.G.; UGLOW, R.F. 2004 Effects of handling electrofishing on plasma glucose and whole blood lactate of *Leuciscus cephalus*. **Journal of Fish Biology**, 64: 65-71
- CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. 2006 Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 21: 61-69.
- CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. 2002 Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 52: 83-91
- CETESB 2005 **Site oficial**. São Paulo/SP. Disponível em <http://www.cetesb.sp.br>; acesso em 15 de outubro de 2005.

CONAMA 2000 Conselho Nacional do Meio Ambiente, **Resolução N° 273**, de 29 de novembro de 2000. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/>; acesso em 10 de setembro de 2005.

COONEY, J.D. 1995 Freshwater tests. In: RAND, G.M. (Ed.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 2nd ed. Washington: Taylor & Francis. c2, p: 71-102.

DA SILVA, M.E.F.; SILVA, J.A.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MEIRELLES, N.C. 2004 A new method to purify hepatic CYP1A of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian freshwater fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 138C: 67-74

DAVISON, W.; FRANKLIN, C.E.; MCKENZIE, J.C.; DOUGAN, M.C.R. 1992 The effects of acute exposure to the water soluble fraction of fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 102C: 185-188.

DAVISON, W.; FRANKLIN, G.E.; MCKENZIE, J.C.; CAREY, P.W. 1993 The effects of chronic exposure to the water soluble fraction of fuel oil on an Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 104C: 67-70

DIGIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. 1995 Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: RAND, G.M. (Ed.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 2nd ed. Washington: Taylor & Francis. c11, p: 345-370.

ENGELHARDT, F.R.; WONG, M.P.; DUEY, M.E. 1981 Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water as affected by petroleum exposure. **Aquatic Toxicology**, 1: 175-186.

FANTA, E; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. 2003 Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 54: 119-130.

GAGNON, M.M.; HOLDWAY, D.A. 1999 Metabolic enzyme activities in fish gills biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 44: 92-99

HEATH, A.G. 1995 **Water Pollution and Fish Physiology**. 2nd ed. Boca Raton: Lewis Publishers.

HONTELA, A. 1997 Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroid hormones. **Reviews in Toxicology**, 1: 159-206.

JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. 1990 Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: ADAMS, S.M. (Ed). **Biological Indicators of Stress in Fish**. Bethesda: American Fisheries Symposium 8. c6, p: 67-79.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. 1976 Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, 20: 6183-6188.

KHAN, R.A. 1998 Influence of petroleum at a refinery terminal on winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 61: 770-777.

KHAN, R.A. 2003 Health of flatfish from localities in Placentia Bay, Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 44: 485-492.

LANDIS, W.G.; YU, M.G. 1995 **Introduction to Environmental Toxicology**. Boca Raton: Lewis publishers.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951 Protein measurements with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193: 265 - 275.

MACHALA, M.; PETŘIVALSKÝ, M.; NEZVEDA, K.; ULRICH, R.; DUŠEK, L.; PIAČKA, V.; SVOBODOVÁ, Z. 1997 Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants – A field study. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 16:1410-1416

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. 2002 Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina: Edição dos Editores. c29, p: 551-577.

MARTINEZ, C.B.R.; SOUZA, M.M. 2002 Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 133A: 151-160.

MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. 2004 Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, 64: 797-807.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B. 2000 Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Caracidae). **Acta Scientiarum**, 22:545-552.

MAZON, A.F.; FERNANDES, M.N. 1999 Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 63: 797-804.

MYERS, M.S.; JOHNSON, L.L.; OLSON, O.P.; STEHR, C.M.; HORNESS, B.H.; COLLIER, T.K.; MCCAIN, B.B. 1998 Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the northeast and Pacific Coast, USA. **Marine Pollution Bulletin**, 37: 92-113.

NICODEM, D.E., GUEDES, C.L.B., CORREA, R.J. 1998 Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a Brazilian intermediate crude oil. **Marine Chemistry**, 63: 93-104.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. 2001a Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 53: 331-347.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. 2001b Tissue distribution and temperature-dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. **Environmental International**, 26: 149-155.

PEAKALL, D.B. 1994 The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology**, 3: 157-160.

POLEKSIĆ, V.; MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. 1994 Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. (Eds.) **Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish**. Oxford: Fishing News Books. c30, p: 339-352.

POLLINO, C.A.; HOLDWAY, D.A. 2003 Hydrocarbon-induced changes to metabolic and detoxification enzymes of the Australian Crimson-Spotted rainbowfish (*Melanotania fluviatilis*). **Environmental Toxicology**, 18: 21-28.

PORTAL BR 2005 **Petrobrás Distribuidora**. Disponível em <http://www.br.com.br/portalbr/>; acesso em 15 de outubro 2005.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. 1995 Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. (Ed.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 2nd ed. Washington: Taylor & Francis. c1, p: 03-70.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. 2000 **Fisiologia Animal – Mecanismos e Adaptações**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. 2004 Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T., TAKEMOTO, R.M., LIZAMA, M.A.P. (Eds), **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Editora Livraria Varela, p. 89-120.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. 1997 The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 6: 75-86.

SEMA 1988. **Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos**. Brasília: Secretaria Especial do Meio Ambiente.

SIMONATO, J.D.; ALBINATI, A.C.L.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. 2004 The effects of diesel oil on some morphological and functional parameters of *Prochilodus lineatus* during acute and chronic exposure. In: SLOMAN, K.; WOOD, C.; MACKINLAY, D.(Eds.) **Behaviour, Physiology and Toxicology Interactions in Fish**. Manaus: VI International Congress on the Biology of Fish. p: 41-45.

STIEN, X.; PERCIC, P. BARELLI-GNASSIA, M.; ROMEO, M.; LAFAURIE, M. 1998 Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of NW Mediterranean Sea. **Environmental Pollution**, 99: 339-345.

TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. 2003 *Anguilla anguilla* L. ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and 1-β-naphthoflavone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 55: 98-107.

THOPHON, S.; KRUAETRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. 2003 Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, 121: 307-320.

TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E.S. 2004 Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, 27: 441-446.

TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMET, A.; LEAL, E.S. 2005 Degradação de BTXs *via* processos oxidativos avançados. **Química Nova**, 28: 61-64.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. 2004 Prática de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M.; CASTAGNOLI, N. (Eds.) **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. c6, p: 171-195.

VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA E VAL, V.M.F. 2004 Estresse em peixe – ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Editora Livraria Varela. p: 75-88.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. 2003 Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13: 57-149.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. 1994 Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, 5: 217-225.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. 1996 **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor Francis.

WENDELAAR BONGA, S.E. 1997 The stress response in fish. **Physiological Reviews**, 77: 591-625.

WESTER, P.W.; VAN DER VEN, L.T.M.; VETHAAK, A.D.; GRINWIS, G.C.M.; VOS, J.G. 2002 Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 11: 289-295.

ZHANG, J.F.; SHEN, H.; XU, T.L.; WANG, X.R.; LI, W.M.; GU, Y.F. 2003 Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 71: 234-239.

ZHANG, J.F.; WANG, X.R.; GUO, H.I.; WU, J.C.; XUE, Y.Q. 2004 Effects of water-soluble fraction of diesel oil on the antioxidant defense of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, 58: 110-116.

ZHANG, Y.S.; ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L. 1990 Induction of hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in rainbow trout by β -naphthoflanone. Time-course studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 95B: 24-253