

Bruno Henrique Bedin

Avaliação de biomarcadores bioquímicos em  
tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostos a  
óleo diesel e biodiesel.

São José do Rio Preto  
2013

Bruno Henrique Bedin

Avaliação de biomarcadores bioquímicos em  
tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostos a  
óleo diesel e biodiesel.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Ecotoxicologia Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto

Bedin, Bruno Henrique.

Avaliação de biomarcadores bioquímicos em tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a diesel e biodiesel / Bruno Henrique Bedin. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2013.

54 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Toxicologia ambiental. 2. Biodiesel - Toxicologia. 3. Combustíveis diesel - Toxicologia. 4. Tilápia (Peixe) - Efeito da poluição da água. 5. Marcadores biológicos. I. Almeida, Eduardo Alves de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 574.64

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Bruno Henrique Bedin

Avaliação de biomarcadores bioquímicos em  
tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostos a  
óleo diesel e biodiesel.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Ecotoxicologia Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Castiglioni  
UNIRP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
22 de maio de 2013

## RESUMO

Dentre os contaminantes ambientais mais produzidos no mundo estão os derivados do petróleo, que atingem e contaminam os ambientes aquáticos. Sendo o petróleo uma forma de energia não renovável, alternativas renováveis e menos poluentes como o biodiesel vêm sendo pesquisadas. Entretanto, apesar de ser considerado menos poluente, mais biodegradável e produzir menos gases de efeito estufa durante a queima, pouco se sabe ainda sobre os potenciais efeitos tóxicos do biodiesel para a biota aquática. Estes efeitos podem ser avaliados por meio da análise de biomarcadores de contaminação, tais como alterações metabólicas na atividade de enzimas de biotransformação e em parâmetros de estresse. Neste trabalho foram analisados os efeitos de duas concentrações (0,1 e 0,01 mL/L, com manutenção do tratamento a cada 5 dias) do biodiesel puro (B100) e da mistura de 20% de biodiesel com diesel de petróleo (B20), em comparação com os efeitos do diesel de petróleo contendo 5% de biodiesel (B5) e animais não expostos a nenhum dos combustíveis, em fígado e brânquias de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas por 15 e 30 dias. Foram avaliadas as atividades das enzimas de biotransformação etóxiresorufina-O-deetilase (EROD) e glutatona S-transferase (GST), das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) glutatona peroxidase (GPx) e níveis de peroxidação lipídica por meio da quantificação do produto malondialdeído. Testes de toxicidade foram também realizados para se estabelecer valores de LC50 para cada contaminante, de forma a melhor compararmos os efeitos dos contaminantes, os quais mostraram que o B5 foi o composto mais tóxico, seguido do B20 e em seguida o B100. Animais expostos ao B5 e ao B20 por 15 dias tiveram a atividade da EROD aumentada e suas enzimas antioxidantes significativamente inibidas, efeito não observado nos animais expostos ao B100. Não obstante, apesar das inibições observadas nas defesas antioxidantes, os níveis de lesões oxidativas em membranas não aumentaram. Apesar da ausência de efeito na atividade da EROD, enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica nos animais expostos ao B100, esses animais apresentaram significativo aumento da GST quando expostos à maior concentração, indicando que apesar de ser o composto que menos causou efeitos nos animais, foi também responsável por alterações em marcadores bioquímicos. Os animais expostos aos contaminantes por 30 dias não apresentaram alterações em nenhum dos parâmetros, sugerindo uma adaptação dos parâmetros bioquímicos após exposições prolongadas. Entretanto, animais expostos às maiores concentrações do B5 e B20 não sobreviveram aos tratamentos, ainda que os animais expostos ao B100 nas maiores concentrações não morreram, corroborando os dados dos testes de toxicidade. Em suma, conclui-se que a toxicidade e os efeitos em biomarcadores bioquímicos aumentam à medida que se aumenta a proporção de diesel de petróleo na mistura. Mas apesar de o B100 ser o menos tóxico dos contaminantes, ressalta-se que foi responsável por alterações na atividade da GST.

Palavras-chave: Diesel, Biodiesel, tilápia, estresse oxidativo, biomarcadores

## ABSTRACT

*Among the environmental contaminants most produced in the world are derived from petroleum, which reach and contaminate aquatic environments. Because oil is a form of non-renewable energy, renewable and less polluting alternatives such as biodiesel have been researched. However, despite being considered less polluting, more biodegradable and produce less greenhouse gases during the burning, little is known about the potential toxic effects of biodiesel on aquatic biota. These effects can be evaluated through the analysis of biomarkers of contamination, such as changes in metabolic activity of biotransformation enzymes and stress parameters. In this study, we analyzed the effects of two concentrations (0.1 and 0.01 mL / L, with maintenance treatment every 5 days) of pure biodiesel (B100) and the mixture of 20% biodiesel with petroleum diesel (B20), compared with the effects of diesel oil containing 5% biodiesel (B5) and animals not exposed to any fuel in liver and gills of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed for 15 and 30 days. We evaluated the activities of biotransformation enzymes *etóxiresorufina-O-deetilase*-(EROD) and glutathione S-transferase (GST), of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and lipid peroxidation levels through quantifying the product malondialdehyde. Toxicity tests were also conducted to establish LC50 values for each contaminant in order to better compare the effects of contaminants, which showed that B5 was the most toxic compound, followed by B20 and then B100. Animals exposed to B5 and B20 for 15 days had increased EROD activity of and their antioxidant enzymes significantly inhibited, which was not observed in animals exposed to B100. Nevertheless, despite the inhibition observed in the antioxidant defenses, the levels of oxidative lesions in membranes not increased. Despite the absence of effect on EROD activity, antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in animals exposed to B100, these animals showed a significant increase in GST when exposed to higher concentrations, indicating that despite being the compound caused less effect in animals, was also responsible for changes in biochemical markers. Animals exposed to contaminants for 30 days showed no changes in any of the parameters, suggesting an adaptation of biochemical parameters after prolonged exposure. However, animals exposed to higher concentrations of B5 and B20 did not survive the treatments, although the animals exposed to B100 in higher concentrations did not die, corroborates the data toxicity tests. In summary, it is concluded that the toxicity and effects on biochemical biomarkers that increase as one increases the proportion of diesel oil in the mixture. But although the B100 to be the least toxic contaminants, it is emphasized that it was responsible for changes in the activity of GST.*

*Keywords: Diesel, Biodiesel, tilapia, oxidative stress, biomarkers*

*“Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter. O Espírito encarnado sofre constantes transformações por fora, a fim de acrisolar-se e engrandecer-se por dentro.”*

*Chico Xavier*

## ***Agradecimentos***

*Amplio meus agradecimentos:*

- *A Deus, primeiramente, pela reencarnação maravilhosa que me foi concedida.*
- *Ao Professor Doutor Eduardo Alves de Almeida, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho, concedendo apoio científico e abrindo as portas do seu laboratório desde minha Iniciação Científica, mas principalmente pelos momentos de saber escutar e entender minhas dificuldades durante este período.*
- *Aos meus pais Marcos e Islaine (Isa) por ter me dado apoio e ensinamentos morais desde sempre, sempre estando do meu lado e aguentando minhas tremedeiras, né Isa? Rss*
- *A minha namorada Dani, que sem ela este trabalho seria muuuito diferente, sempre me ajudando em qualquer hora, mas principalmente por ser uma pessoa muito especial, que já garantiu um lugar cativo na minha vida!*
- *A todos meus amigos do laboratório, que sempre estavam dispostos a ajudar e a conversar, distrair nas horas em que nada dava certo. Mando aqui um agradecimento especial para meus parceiros Kexu e Furto, pela parceria de sempre.*
- *Aos meus parceiros de Rep. JAnelas, onde conheci uma nova família e passei 6 anos inesquecíveis.*
- *A empresa Fertibom, pela concessão do biodiesel utilizado neste trabalho.*
- *Ao Departamento de Pesca da Associação dos Funcionários Rurais da cidade de Catanduva/SP, pelos peixes concedidos.*
- *A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter financiado este trabalho e ter me concedido a bolsa de auxílio acadêmico.*
  
- *A mim mesmo por ter realizado este trabalho.*



## Sumário

Lista de Figuras.....	pág. 10
Lista de Tabelas.....	pág. 11
Lista de abreviaturas e siglas.....	pág. 12
1. Introdução.....	pág. 13
1.1 Contaminação aquática, Diesel e Biodiesel .....	pág. 13
1.2 Biomarcadores de contaminação .....	pág. 15
1.3 Biotransformação dos contaminantes.....	pág. 16
1.3.1 FASE I .....	pág. 17
1.3.2 FASE II .....	pág. 18
1.4 Estresse Oxidativo .....	pág. 19
1.5 <i>Oreochromis niloticus</i> como organismos de estudo de contaminação	
Aquática .....	pág. 25
2. Objetivos.....	pág. 26
2.1 Objetivo Geral.....	pág. 26
2.2 Objetivos Específicos .....	pág. 26
3. Materiais e Métodos.....	pág. 27
3.1 Animais, diesel e biodiesel .....	pág. 27
3.2 Teste de toxicidade .....	pág. 27
3.3 Exposição controlada a diesel e biodiesel .....	pág. 28
3.4 Preparo das amostras para análises das enzimas EROD, GST, SOD, CAT e GPx.....	pág. 29
3.5 Preparo das amostras para avaliação da peroxidação lipídica .....	pág. 29
3.6 Análise da 7-etoxirresorufina- <i>O</i> -deetilase (EROD) .....	pág. 30
3.7 Análise da Glutathione S-transferase (GST) .....	pág. 30
3.8 Análise da Superóxido Dismutase (SOD) .....	pág. 30
3.9 Análise da Catalase (CAT) .....	pág. 30
3.10 Análise da Glutathione Peroxidase (GPx) .....	pág. 31

3.11	Quantificação de Proteínas .....	pág. 31
3.12	Avaliação da Peroxidação Lipídica .....	pág. 31
3.13	Análise Estatística .....	pág. 31
4.	Resultados.....	pág. 32
4.1	Teste de Toxicidade .....	pág. 32
4.2	Exposição controlada a diesel e biodiesel .....	pág. 33
4.3	Análise da 7-etoxirresorufina- <i>O</i> -deetilase (EROD) .....	pág. 35
4.4	Análise da Glutathione S-transferase (GST) .....	pág. 36
4.5	Análise da Superóxido Dismutase (SOD) .....	pág. 37
4.6	Análise da Catalase (CAT) .....	pág. 38
4.7	Análise da Glutathione Peroxidase (GPx) .....	pág. 39
4.8	Avaliação da Peroxidação Lipídica .....	pág. 40
5.	Discussão.....	pág. 42
6.	Conclusões.....	pág. 46
7.	Referências.....	pág. 47

## Lista de Figuras

1. Esquema simplificado das fases do metabolismo de destoxificação..... pág. 17
2. Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB..... pág. 19
3. Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB..... pág. 20
4. Processo de peroxidação lipídica .....pág. 21
5. Esquema mostrando a atividade antioxidante da GPx sobre o peróxido de hidrogênio..... pág. 23
6. Integração dos sistemas de defesa enzimático..... pág. 24
7. Representação ilustrativa da espécie *Oreochromis niloticus* ..... pág. 27
8. Esquema mostrando a disposição dos peixes nos aquários durante o período de exposição ..... pág. 28
9. Representação dos valores de LC50 encontrados ..... pág. 33
10. Gráfico da atividade da EROD de brânquia de *Oreochromis niloticus*.. pág. 35
11. Gráfico da atividade da EROD de fígado de *Oreochromis niloticus* .... pág. 35
12. Gráfico da atividade da GST de brânquia de *Oreochromis niloticus* ..... pág. 36
13. Gráfico da atividade da GST de fígado de *Oreochromis niloticus* ..... pág. 36
14. Gráfico da atividade da SOD de brânquia de *Oreochromis niloticus* .... pág. 37
15. Gráfico da atividade da SOD de fígado de *Oreochromis niloticus* ..... pág. 37
16. Gráfico da atividade da CAT de brânquia de *Oreochromis niloticus* .... pág. 38
17. Gráfico da atividade da CAT de fígado de *Oreochromis niloticus* ..... pág. 38
18. Gráfico da atividade da GPx de brânquia de *Oreochromis niloticus* ..... pág. 39
19. Gráfico da atividade da GPx de fígado de *Oreochromis niloticus* ..... pág. 39
20. Gráfico da concentração de MDA em brânquia de *Oreochromis niloticus*..... pág. 40
21. Gráfico da concentração de MDA em fígado de *Oreochromis niloticus*..... pág. 41

## **Lista de Tabelas**

1. Teste de toxicidade para B5, concentrações utilizadas e mortes observadas.....  
..... pág.  
32
2. Teste de toxicidade para B20, concentrações utilizadas e mortes observadas.....  
..... pág.  
32
3. Teste de toxicidade para B100, concentrações utilizadas e mortes observadas.....  
..... pág.  
32
4. Representação do número de réplicas verdadeiras após os períodos de exposição dos  
animais aos contaminantes..... pág. 34

## Lista de abreviaturas

ANP	Agência Nacional do Petróleo
B100	Biodiesel
B20	Diesel com 20% de biodiesel
B5	Diesel com 5% de biodiesel
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CYP1A	Isoforma 1A do citocromo P450
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Environmental Protection Agency
EROD	7-etoxirresorufina- <i>O</i> -deetilase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GST	Glutaciona-S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPLC	High performance liquid chromatography
KCl	Cloreto de Potássio
LD50	Dose Letal 50%
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PCB	Policloreto de Bifenilo
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido tiobarbicúrico

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Contaminação Aquática, Diesel e Biodiesel**

Uma vez que todos os organismos dependem de água pra sua sobrevivência, os ambientes aquáticos são de grande importância. Além das demais atividades desenvolvidas a partir desses ambientes, como geração de energia, irrigação de agriculturas, transporte fluvial e marítimo, entre outras (MORAES; JORDÃO, 2002). Porém, apesar de toda importância, os ambientes aquáticos vêm sendo cada vez mais atingidos pela poluição decorrente do crescimento populacional, desenvolvimento industrial, produção, consumo e eliminação de produtos e resíduos (JHA, 2004).

Define-se poluição aquática como uma alteração química e/ou física de um corpo d'água decorrente do despejo de substâncias, chamadas de contaminantes, que impossibilitam a utilização da água (PEREIRA, 2004). Dentre os contaminantes produzidos pelo homem destacam-se: lixo, metais, petróleo, agrotóxicos e elementos radioativos (NIENCHESKI, 2000). Dessa maneira, percebe-se que a contaminação aquática está intimamente ligada á industrialização (GOEL, 2006).

Derramamentos de petróleo e seus derivados são geradores de impactos ambientais de grandes proporções, uma vez que a remediação deste problema é cara e difícil. A grande maioria dos casos de contaminação de áreas aquáticas por petróleo e seus derivados origina-se a partir de falhas no transporte marítimo e rompimentos em dutos de transportes (SIMONATO; ALBINATI; MARTINEZ, 2006). No Brasil, alguns acidentes com petróleo e seus derivados vêm ocorrendo nos últimos anos, como por exemplo, o derramamento de 1,3 milhão de litros de petróleo na Baía da Guanabara (RJ), em janeiro de 2000, e, em julho do mesmo ano, o vazamento de quatro milhões de litros de óleo nos rios Barigui e Iguaçu (PR) (MENICOM et al., 2002), afetando vários animais aquáticos presentes na região. Em escala mundial, destaca-se o rompimento do tanque Prestige na costa da Espanha em 2002 derramando mais de 60.000 toneladas de óleo, cujos efeitos mais dramáticos foram observados na região da Galícia, afetando também a costa inglesa (CAJARAVILLE et al., 2006; CARRO; COBAS; MANEIRO, 2006; SORIANO et al., 2006). Em todos estes eventos foram observados impactos em diversos ecossistemas (MENICOM et al., 2002; FILHO, 2006).

Exposições crônicas e agudas de organismos ao petróleo e seus derivados levam a alterações na reprodução e crescimento dos animais aquáticos, refletindo as consequências em todo o ecossistema local (ZIOLLI, 2002). Estima-se que todos os anos 6.000 toneladas de petróleo bruto são derramados no ambiente aquático (TIBURTIUS et al., 2004).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem a maior parte do petróleo e são compostos orgânicos que apresentam dois ou mais anéis aromáticos fundidos. Assim, a poluição originada por vazamentos de derivados de petróleo nos ecossistemas aquáticos pode resultar na deposição de grandes quantidades de HPAs (HAMOUTEN et al., 2002), conhecidos por seus efeitos carcinogênicos (PACHECO e SANTOS, 2001). Vale salientar que os HPAs de origem petrolífera são uma das classes de poluentes mais frequentemente encontradas nos ambientes aquáticos (KETTRUP; MARTH, 1998).

Devido à sua natureza lipofílica, os HPAs podem penetrar facilmente nas membranas biológicas e se acumular nos organismos vivos (TUVIKENE, 1995), sendo que, a taxa de HPAs acumulados nos organismos aquáticos é altamente específica (NORTON, et al., 1985). Entretanto, animais como mamíferos, aves, peixes e vários macroinvertebrados são capazes de metabolizar muitos dos hidrocarbonetos ingeridos (ALBERS, 1995).

Dentre os derivados do petróleo, o óleo diesel merece destaque em termos de risco ambiental por ser continuamente lançado nos ambientes costeiros em função de seu uso como combustível de embarcações, veículos rodoviários e máquinas em geral (KENNISH, 1992; FILHO, 2006). No Brasil, o óleo diesel é o derivado propulsor do refino e corresponde 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).

A dispersão na água de sua fração insolúvel causa danos diretos aos peixes, visto que, faz contato com suas superfícies corpóreas, incluindo as brânquias (PACHECO; SANTOS, 2001). Já a fração solúvel em água, composta por muitos HPAs, está relacionada a efeitos genotóxicos que levam a formação de neoplasias em fígado de peixes bentônicos (BAUMANN, 1998), e a efeitos toxicológicos, como por exemplo, ao estresse oxidativo (ACHUBA; OSAKWE, 2003; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ZHANG et al., 2004).

Estudos realizados em peixes *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do óleo diesel em água mostrou a ocorrência de lesões em brânquias e fígado, redução na hemoglobina e anormalidades nos eritrócitos como micronúcleos e quebras no DNA (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008; VANZELLA; MARTINEZ; COLUS, 2007). Um outro estudo realizado com peixes da espécie *Carassius auratus* expostos a fração acomodada em água do óleo diesel, mostrou um aumento nas defesas antioxidantes (ZHANG et al., 2004).

A fim de minimizar os impactos ambientais, busca-se cada vez mais a implantação de energia limpa e renovável, tendo como alternativa o biodiesel, que é caracterizado como éster metílico ou etílico derivado de óleos vegetais, gordura animal ou óleo residual. Estima-se que a produção de biodiesel, que em 2012 está em 9,5 bilhões de litros, chegue a 100 bilhões de litros em 2035, já que há grande incentivo, como a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que dispõe que todo o diesel comercializado em território nacional contenha 5% de biodiesel (ANP, 2012).

Sheehan et al. 1998 relata que emissões globais de CO<sub>2</sub> são mais baixos para o biodiesel do que para 100% de diesel de petróleo, mostrando assim que biodiesel é uma fonte menos poluidora que óleo diesel quando se trata de emissão de CO<sub>2</sub>. Porém, poucos são ainda os trabalhos realizados a fim de elucidar a toxicidade do biodiesel no ambiente aquático. Nogueira et al. (2011) expôs *Oreochromis niloticus* à diesel, misturas diesel/biodiesel e biodiesel puro em diferentes concentrações (0,01 e 0,1mL/L) e relata estresse oxidativo e alterações enzimáticas tanto para diesel quanto para biodiesel. Já Khan et al. (2007) relata menor toxicidade aguda para biodiesel em microcrustáceos (*Daphnia magna*) e alevinos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) que o óleo diesel.

Como são poucos os estudos sobre estes compostos, se faz necessário novos trabalhos para conhecer melhor os impactos que estes causam no ambiente aquático.

## **1.2 Biomarcadores de Contaminação**

Diferentes estratégias podem ser adotadas para se avaliar o nível de contaminação do meio aquático como, por exemplo, a identificação e quantificação dos poluentes presentes na água, em sedimentos e nos organismos (GESTEL; BRUMMELEN, 1996). Desde a década de 1970, pesquisadores e gestores de recursos hídricos argumentam que as metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físico-químicas e análises quantitativas de poluentes não são



suficientes para a avaliação da qualidade da água, sendo necessária também uma avaliação dos efeitos biológicos e de suas propriedades sobre os organismos vivos (CAIRNS; PRATT, 1993).

Atualmente, as análises ambientais se constituem em ensaios ecotoxicológicos. Em nível da organização biológica, as ferramentas de análise são chamadas de biomarcadores, os quais possibilitam a correlação da intensidade da exposição com o efeito biológico da substância (MAGALHÃES E FERRÃO FILHO, 2008).

Define-se biomarcador como qualquer resposta biológica a um poluente ambiental, medida em tecidos corpóreos de um organismo (GESTEL; BRUMMELEN, 1996). Os biomarcadores podem indicar tanto a exposição dos organismos aos contaminantes (biomarcadores de exposição), como a magnitude da perturbação causada em resposta a poluentes (biomarcadores de efeito) (CAJARAVILLE et al., 2000). Várias são as vantagens do uso de biomarcadores nos estudos de monitoramento ambiental, tais como detectarem as primeiras alterações nas respostas biológicas, evitando que os efeitos da intoxicação dos organismos cheguem a um ponto irreversível (VAN DER OOST et al., 2003).

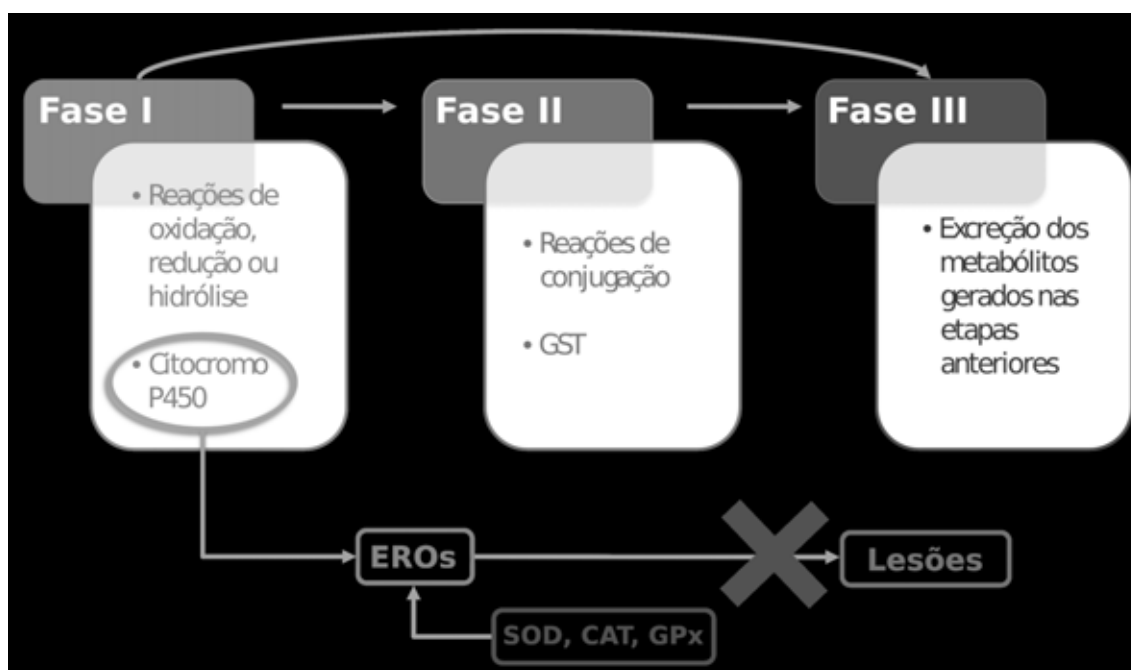
Entre os biomarcadores mais utilizados e recomendados estão as enzimas envolvidas na metabolização de compostos tóxicos e os sistemas de defesa antioxidante, pois estas fornecem informações importantes a respeito da capacidade de defesa dos organismos, bem como da capacidade de biotransformação dos compostos tóxicos (BURGEOT et al., 1996). A Norwegian Oil Industry Association (OLF, 2005) sugere o uso de biomarcadores bioquímicos na determinação dos efeitos biológicos em organismos aquáticos expostos a derivados de petróleo. Dentre alguns biomarcadores relacionados aos sistemas de defesa antioxidante destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já com relação às enzimas de metabolização de xenobióticos destacam-se a enzima de fase I 7-etoxirresorufina-O-deetilase (EROD) e de fase II glutathione S-transferase (GST).

### **1.3 Biotransformação dos Contaminantes**

Tem-se comprovado que os vertebrados, como peixes, aves e mamíferos possuem um sistema de enzimas metabolizadoras de contaminantes (monooxigenases de função mista - MFOs) altamente desenvolvidas (INZUNZA et al. 2006). Este sistema apresenta importante papel na biotransformação de poluentes orgânicos (DEN BESTEN

et al. 1990), sendo capazes de transformar compostos mais apolares, como HPAs e dioxinas em produtos hidrofílicos, facilitando sua excreção (COLLIER & VARANASI, 1991).

A metabolização dos compostos xenobióticos ocorre em três fases: as fases I e II correspondem a biotransformação desses compostos e a fase III corresponde à excreção dos produtos resultantes da biotransformação (VAN DER OOST, BAYER, VERMEULEN, 2003), como demonstra a **Figura 1**.



**Figura 1:** Esquema simplificado das fases do metabolismo de detoxificação. Quando as reações não estão bem acopladas, pode-se gerar EROs. Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) presentes nas células impedem que as EROs provoquem lesões em macromoléculas. (Nogueira et al., 2011)

### 1.3.1 Fase I

A fase I envolve reações de oxidação, redução e hidrólise que expõe ou introduz grupos funcionais (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH) à molécula do xenobiótico fazendo com que esta se torne mais polar ou permitindo as reações de conjugação da fase II (VAN DER OOST, BAYER, VERMEULEN, 2003).

O principal grupo de enzima envolvida na fase I são as monooxigenases, como o citocromo P450 (STEGEMAN & HAHN, 1994), que são hemoproteínas ligadas à membrana, localizadas predominantemente no retículo endoplasmático de células hepáticas. Essa família desempenha uma grande variedade de reações de oxigenação e outras transformações bioquímicas sobre inúmeros xenobióticos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Uma reação frequentemente catalisada pelo citocromo P450 é a reação monooxigenase, onde ocorre a inserção de um átomo de oxigênio no substrato (RH) e produção de uma molécula de água a partir da redução do oxigênio, com doação de dois elétrons e dois prótons para o ferro heme P450, conforme equação abaixo:



A subfamília P450 1A (CYP1A), dentre os citocromos P450, é o biomarcador de contaminação aquática mais estudado (VAN DER OOST et al., 2003) e tem atraído atenção especial devido seu papel na biotransformação de muitos compostos exógenos, como dioxinas, furanos, bifenilas policloradas (PCBs) e HPAs (PARKINSON, 1995). Assim, a indução do citocromo P450 CYP1A em fígado de peixes é geralmente reconhecida como um biomarcador útil em relação a exposição à diferentes tipos de poluentes, por exemplo os HPAs, que estão presentes nos compostos oriundos do petróleo, como o óleo diesel (WHYTE et al., 2000). A indução dessa enzima pode ser monitorada pela análise da atividade 7-etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) do CYP1A, ou seja, a atividade da isoforma 1A do citocromo P450 na conversão do substrato não fluorescente 7-etoxirresorufina em um produto fluorescente, a resorufina (WHYTE et al., 2000).

Collier et al. (1996) demonstraram em seus trabalhos que peixes coletados em regiões contaminadas por HPAs apresentam aumento na atividade da EROD. Diversos outros autores também já demonstraram que a indução da EROD é um potente biomarcador de exposição a HPAs (WHYTE et al., 2000; PACHECO; SANTOS, 2001; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Nogueira et al. (2011) relatou aumento da atividade da EROD quando *Oreochromis niloticus* foram expostos a 0,01 e 0,1mL/L de óleo diesel. Dessa maneira a EROD se classifica como um biomarcador de exposição altamente sensível ao poluente.

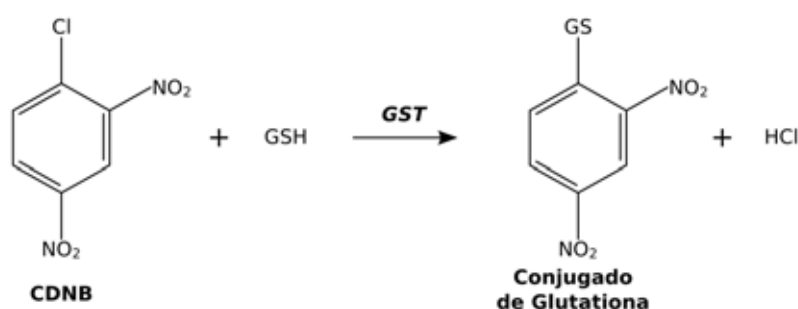
Muitas vezes, a biotransformação dos contaminantes pelas enzimas de FASE I pode resultar em compostos ainda mais tóxicos que se ligam a macromoléculas, como DNA e lipídios. Porém, esses compostos tóxicos podem ainda ser neutralizados através da ação de enzimas de biotransformação de FASE II (SILVA, 2004).

### **1.3.2 Fase II**

O metabolismo da fase II envolve a adição de um ligante endógeno, geralmente um grupo polar ao composto químico parental ou a seus metabólitos, para facilitar sua excreção (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), tendo uma importância crucial na conjugação e desintoxicação de compostos xenobióticos (GEORGE, 1994) e na prevenção de lesões celulares. As glutionas-*S*-transferases (GST) apresentam as funções supracitadas e catalisam a conjugação do tripeptídeo glutiona (GSH) com os

metabólitos da Fase I (HAYNES & PULFORD, 1995). Portanto, para que não haja um comprometimento deste mecanismo de detoxificação, é necessária a manutenção de níveis normais de GSH intracelular. Algumas enzimas participam da síntese de glutatona, enquanto outras auxiliam na reciclagem de glutatona oxidada, produzida fisiologicamente durante o metabolismo (TIMBRELL, 1991).

As análises laboratoriais que determinam a atividade de GST total utilizam o substrato artificial 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por ser substrato para a maioria das isoformas de GSTs (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), conforme **Figura 2**.



**Figura 2:** Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDBN. Nota-se que a GSH é introduzida na posição 1 no lugar do Cl, dando origem a um conjugado de glutaciona.

A atividade da GST é amplamente utilizada como biomarcador em estudos tanto com vertebrados quanto invertebrados (CASILLAS et al., 1983; LENARTOVA et al., 1997), uma vez que a atividade de GST é influenciada por várias classes de xenobióticos, inclusive derivados de petróleo (KOPECKA-PILARCZYK & CORREIA, 2009; (VALAVANIDIS et al., 2006).

Um estudo realizado por Gowland et al. (2002) mostrou que o aumento na atividade da GST na glândula digestiva de mexilhões estava relacionada à presença de HPAs no ambiente. Da mesma forma, Nogueira et al. (2011) relatou aumento da atividade da GST de *Oreochromis niloticus* expostos a 0,01 e 0,1mL/L de óleo diesel por 2 e 7 dias. Estes dados evidenciam a utilidade da GST como biomarcadora para exposição a HPAs.

## 1.4 Estresse Oxidativo

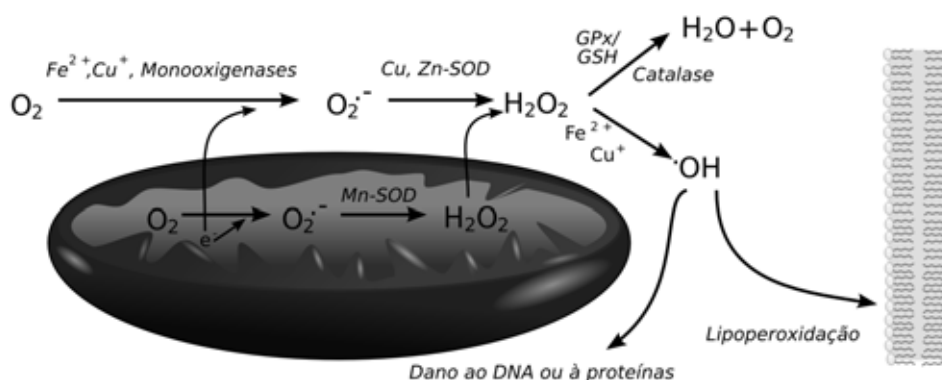
A biotransformação de xenobióticos é tipicamente acompanhada por uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são espécies químicas que

possuem elétron não pareado e são altamente reativos, levando os animais ao estresse oxidativo (VALAVANIDIS et al., 2006). A geração de EROs constitui um processo contínuo e fisiológico, obedecendo funções biológicas. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; ativação de genes e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos, bem como ao estresse oxidativo (SHAMI & MOREIRA, 2004).

A produção contínua de EROs durante os processos metabólicos ao longo da evolução dos seres vivos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência dos danos decorrentes (BIANCHI & ANTUNES, 1999; SHAMI & MOREIRA, 2004).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de EROs ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecido (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

As principais formas de EROs são o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é também importante nesse contexto, pois ele leva à formação do radical hidroxil. O mecanismo de formação e a ação das enzimas antioxidantes encontram-se exemplificados na **Figura 3**.

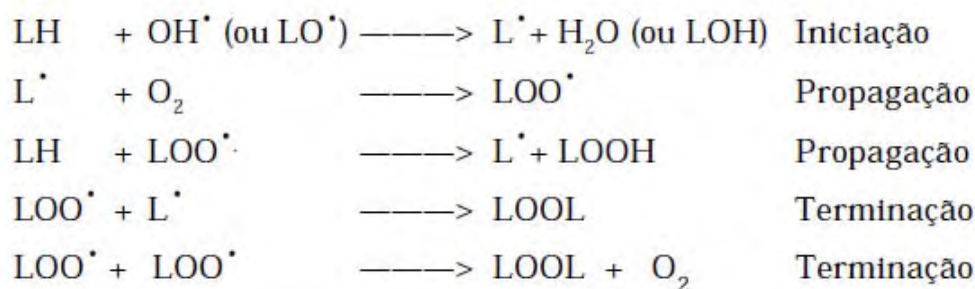


**Figura 3:** Esquema simplificado de sistemas oxidativos e antioxidantes dentro de uma célula. Ânion superóxido é produzido em quantidades significativas no citosol por mono-oxigenases,  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$  e na

mitocôndria pelo escape de elétrons provenientes da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido reagem espontaneamente ou via SODs, produzindo peróxido de hidrogênio, o que irá permitir o fluxo de EROs entre compartimentos celulares. O peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado à água e ao oxigênio molecular por diversos sistemas enzimáticos ou convertido a radical hidroxil, o qual é muito reativo, através de reações catalisadas por metais. Adaptado de Nordberg e Arner (2001) por Lilian Nogueira (2010).

As EROs têm capacidade de oxidar proteínas, DNA e lipídios, causando a peroxidação destes, sendo que o estado de estresse oxidativo pode produzir danos para os tecidos, inflamação e doenças degenerativas (VALAVANIDIS et al., 2006). Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (FILHO et al., 1983).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que se inicia quando um radical livre subtrai um hidrogênio do grupo metileno de ácidos graxos poli-insaturados da membrana, ocorrendo formação de um radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ). Na etapa de propagação, o  $L^{\bullet}$  reage rapidamente com o  $O_2$  formando o radical peroxil ( $LOO^{\bullet}$ ), sendo que este é capaz de capturar um hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado adjacente para formar o hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ), resultando um novo  $L^{\bullet}$  no ácido graxo poli-insaturado. A cadeia de peroxidação termina quando ocorre a reação entre dois radicais lipídicos ou quando esses radicais são decompostos em altas temperaturas ou na presença de íons metálicos, ou ainda quando os radicais reagem com um composto antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio, como mostra a **Figura 4**.



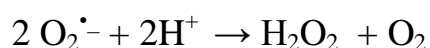
**Figura 4:** Processo deperoxidação lipídica (Adaptado de MOSIALOU, 1993). A abstração de átomos de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado leva à formação de um radical lipídico. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peroxil. Este radical pode continuar o ciclo de peroxidação lipídica através da abstração de átomos de hidrogênio de cadeias poliinsaturadas próximas, transformando-se em um peróxido lipídico.

A gravidade dos danos às membranas biológicas decorrentes a peroxidação lipídica pode variar, dependendo da natureza e concentração do oxidante, desde a

redução da fluidez da membrana até o rompimento da integridade da bicamada (HERMES-LIMA, 2004). Entre os produtos finais formados durante o processo de peroxidação lipídica, destacam-se hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, cetonas e aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxyononal (4-HNE) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007), sendo que o MDA tem sido usado como indicativo de estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Uma importante característica do MDA é sua capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico sob altas temperaturas e baixo pH, gerando um produto com cor que pode ser detectada facilmente em 532 nm (DRAPER & HADLEY, 1990), base para método de detecção de produtos finais de peroxidação lipídica.

A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelas EROs, uma vez que todas as biomoléculas são susceptíveis á oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Para vencer o desafio dos radicais livres, os seres aeróbicos desenvolveram uma bateria de mecanismos de proteção conhecida como defesas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GP<sub>x</sub>), assim como o tripeptídeo glutathione (GSH), que são importantes na conversão de radicais reativos em moléculas não reativas (ALMEIDA; BAINY, 2006).

A superóxido dismutase (SOD) foi a primeira enzima antioxidante descoberta (MCCORD E FRIDOVICH, 1969). Em células eucarióticas, a SOD é encontrada no citosol contendo cobre e zinco ligadas ao seu sítio ativo (Cu/Zn-SOD) e na matriz mitocondrial ligada com manganês (Mn-SOD) (FISHER, 1987). Em conjunto, as SOD são um grupo de metaloenzimas que catalisam a transformação de radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio (O<sub>2</sub>) (NORDBERG; ARNER, 2001). Na reação catalisada pela SOD, dois átomos de hidrogênio formam peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular e são, assim, uma fonte de peróxido de hidrogênio, conforme reação abaixo (NORDBERG & ARNÉR, 2001).



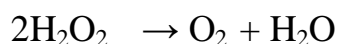
Tal reação pode acontecer espontaneamente em condições fisiológicas, porém quando catalisada pela SOD a velocidade de dismutação é 10<sup>4</sup> vezes maior (SHOUTORN & POWIS, 1988). A vantagem da utilização da SOD como biomarcador



é explicada pela tendência de aumento de sua atividade na presença de contaminantes e por essa alteração ocorrer em poucas horas e exposição (VAN DER OOST, 2003; VALAVANIDIS et al., 2006).

O peróxido de hidrogênio formado na reação da SOD participa de reações que levam à geração do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), que é altamente reativo. Dessa forma, outras duas enzimas antioxidantes podem catalizar a detoxificação do peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx).

A CAT é uma heme-enzima (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) encontrada dentro de peroxissomos e cataliza esse peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, conforme a reação abaixo.



Pelo fato de estar compartimentalizada nos peroxissomos, ela é mais importante em condições nas quais ocorrem altas concentrações de peróxido de hidrogênio (VANNUCCHI et al, 1998).

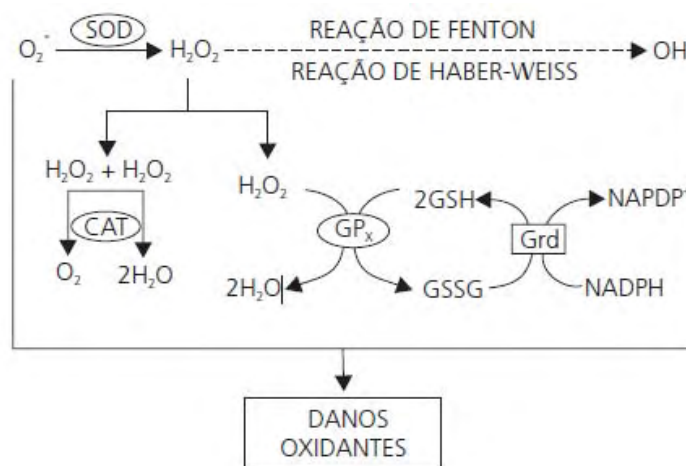
A (GPx) foi descoberta por Mills em 1959, em tecidos de mamíferos, não existindo em plantas ou bactérias, embora possa ser encontrada em algumas espécies de algas e fungos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985). Ao contrário da catalase, que é específica para a degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a GPx, uma selenoenzima, é capaz de reduzir diversos tipos de peróxidos através da oxidação da GSH e é a principal peroxidase presente nos peixes (VAN DER OOST et al., 2003). Outra diferença entre CAT e GPx é que esta pode ser encontrada no citosol ou na matriz mitocondrial, não ficando restrita sua atividade apenas nos peroxissomos (MARTINEZ, 2006).

A GPx utiliza a glutatona reduzida (GSH) como doadora de elétrons para a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a reação catalisada pela GPx está expressa na **Figura 5** (FARBER et al., 1990; KEELING & SMITH, 1982).



**Figura 5.** Esquema mostrando a atividade antioxidante da GPx sobre o peróxido de hidrogenio. O peróxido de hidrogênio é reduzido pela GPx através da oxidação de duas moléculas de GSH formando GSSG. Em seguida, a GSSG pode voltar ao estado reduzido sob ação da GR sob o consumo de NADPH. Adaptado de Nordberg & Arner (2001) por Lilian Nogueira.

Por meio da reação de dismutação, a superóxido dismutase (SOD) catalisa a geração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a partir do radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ). As enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) se integram para impedir o acúmulo de  $H_2O_2$  que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais. O acúmulo dessa espécie reativa ( $H_2O_2$ ) possibilita, por meio das reações de *Fenton* e *Haber-Weiss*, a geração do radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), contra o qual não existe defesa enzimática. A GPx reduz o  $H_2O_2$  à água, no entanto o faz à custa da conversão da glutaciona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), essa última que promove ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura. Assim, é de extrema importância a ação da glutaciona redutase (GR), responsável pela recuperação da glutaciona reduzida (GSH), possibilitando a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutaciona e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos (ROVER et al, 2001), demonstrado na **Figura 6** abaixo.



**Figura 6:** Integração dos sistemas de defesa enzimático.

A exposição de peixes ao petróleo e seus derivados, como o óleo diesel pode provocar alterações nas atividades das enzimas antioxidantes e/ou ocorrência de danos oxidativos. Por exemplo, Zhang et al. (2004) relatam que a atividade da SOD aumentou em peixes da espécie *Carassius auratus* quando expostos à 0,05mL/L e 0,1mL/L de óleo diesel e sugerem que esse aumento seja em função  $O_2^{\bullet}$ .

Achuba e Osakwe (2003) verificaram alterações dose-dependente na atividade da CAT, SOD e aumento de níveis de peroxidação lipídica (MDA) em vários tipos de bagre africano (*Clarias gariepinus*) após 14, 21 e 28 dias de exposição ao petróleo cru. Zhang et al (2004) submeteram peixes dourados (*Carassius auratus*) a diferentes concentrações de óleo diesel e verificaram que o diesel, dependendo da concentração testada, induziu o aumento da atividade da SOD, CAT e GPx. Esses resultados mostraram que esses compostos são mediadores na produção de EROs em peixes. O aumento da atividade das enzimas antioxidantes pode representar uma resposta adaptativa para proteger os peixes das EROS após a exposição a estes poluentes (ACHUBA E OSAKWE, 2003). Desta forma, as enzimas antioxidantes nos dão, geralmente, boas respostas quando animais são expostos aos xenobióticos e dessa forma são usadas como ferramenta em estudos de biomonitoramento ambiental (VAN DER OOST et al., 2003).

### **1.5 *Oreochromis niloticus* como organismos de estudos de contaminação aquática**

Por apresentar capacidade de metabolizar uma variedade de compostos, peixes são considerados bons organismos sentinela em estudos de monitoramento ambiental (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). Algumas espécies têm sido usadas como animais modelo em diversos estudos, por sua relevância ecológica e/ou econômica, ou por apresentarem grande distribuição e frequência em diferentes corpos d'água, o que facilita na comparação de dados de animais coletados em diferentes pontos amostrais.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) caracteriza-se por uma espécie natural das bacias de rios africanos e foi introduzida em várias bacias da América do Sul, sendo muito cultivada em pisciculturas e pesqueiros (GRACA & PAVANELLI, 2007), ocorrendo assim em águas de todo o território brasileiro.

Respostas relacionadas à exposição de vários compostos tóxicos têm sido caracterizadas para esta espécie (TRÍDICO et al., 2010). Por apresentar hábito nectônico, este peixe pode ser afetado tanto por partículas insolúveis na água quanto por compostos solúveis em água, sendo assim uma espécie muito utilizada em modelos experimentais de estudo de ecotoxicologia.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Comparar os efeitos tóxicos do óleo diesel comercializado em postos de combustível (B5), óleo diesel com 20% de biodiesel (B20) e do biodiesel puro (B100) em diferentes concentrações em tilápias (*Oreochromis niloticus*). Analisar enzimas de fase I e II da biotransformação, enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica na brânquia e no fígado da espécie supracitada.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Estabelecer valores de LC50 (96h) para o B5, B20 e B100.
- Avaliar os efeitos do B5, B20 e B100 na atividade da isoforma 1A do citocromo P450 (EROD, fase I da biotransformação), glutathione *S*-transferase (GST, fase II da biotransformação), enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e níveis de peroxidação lipídica (MDA) em brânquias e fígado dos peixes expostos por 15 e 30 dias.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais, Diesel e Biodiesel

O presente trabalho teve como organismo-teste a tilápia da espécie *Oreochromis niloticus* (**Figura 7**), que foi cedida pelo Departamento de Pesca da Associação dos Funcionários Rurais da cidade de Catanduva/SP. O Diesel foi comprado em um posto de gasolina da rede Petrobrás e o biodiesel cedido pela empresa Fertibom, localizada na cidade de Catanduva/SP, que produz biodiesel a partir de diversas oleaginosas utilizando álcool etílico.



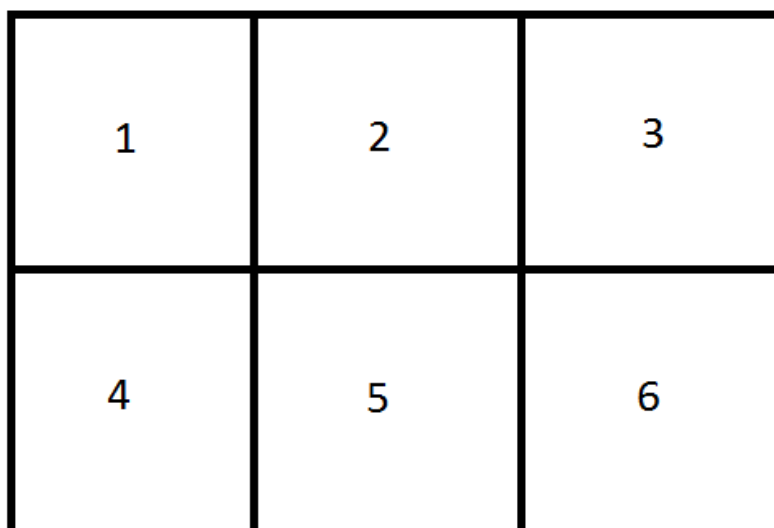
**Figura 7.** Representação ilustrativa da espécie *Oreochromis niloticus*

#### 3.2 Teste de Toxicidade

Os peixes foram mantidos em aquários de 50x80x60cm (aproximadamente 100L de água), dividido com divisórias de vidro em seis compartimentos de aproximadamente 17 litros, contendo um peixe por compartimento, permitindo assim que cada grupo experimental, aqui representado por 1 aquário, contenha seis réplicas verdadeiras de seu respectivo grupo, conforme visualizado na **Figura 8**. Os peixes utilizados no teste de toxicidade apresentavam  $95,2 \pm 21,5$ g e  $13,55 \pm 2,05$ cm de peso e tamanho respectivamente e foram usados animais de ambos os sexos. Os aquários foram mantidos sob aeração, pH 7,5 e temperatura constantes  $25^{\circ}\text{C}$  em um ciclo de claro-escuro de 12h, ficando os animais expostos aos contaminantes por 96h sem administração de alimento.

Os testes de toxicidade foram realizados separadamente para cada fração do diesel/biodiesel (B5, B20 e B100). Para cada teste, usou-se cinco aquários com seis peixes cada, sendo que em cada aquário, o composto foi adicionado em concentrações crescentes. Inicialmente, usou-se como maior concentração 1,5mL/L, e a partir dessa concentração, que foi considerada como 100%, foram calculadas as concentrações de

75, 50, 25 e 12,5% da dose maior, ou seja, foram usados 1,125; 0,75; 0,375 e 0,188mL/L), para B100 essas concentrações não levaram à letalidade nenhum indivíduo, sendo assim, foram usadas como doses 0,625 mL/L; 1,25; 2,5; 3,75 e 5,0 mL/L. Os resultados foram calculados representando os dados coletados em um gráfico concentração *versus* a mortalidade (%) em um gráfico, obtendo assim a LC50.



**Figura 8:** Esquema mostrando a disposição dos peixes nos aquários durante o período de exposição vista por cima, onde os números representam os peixes expostos.

Ao final destes experimentos, a água dos aquários contendo os contaminantes foi tratada antes de ser lançada em esgoto comum, passando por filtros UV com carvão ativado, ficando retidos os resíduos tóxicos. As sobras dos animais foram coletadas por uma empresa especializada em tratamento de resíduos biológicos.

### **3.3 Exposição controlada a diesel e biodiesel**

A exposição foi realizada utilizando sete aquários de 50x80x60cm (aproximadamente 100L de água), dividido com divisórias de vidro em seis compartimentos de aproximadamente 17 litros, contendo um peixe por compartimento, permitindo assim que cada grupo experimental, aqui representado por um aquário, continha seis réplicas verdadeiras de seu respectivo grupo. Um aquário permaneceu sem tratamento, dois aquários foram tratados com B5, um com uma concentração de 0,1mL/L e outro com 0,01mL/L, 2 aquários foram tratados com B20, idem B5 e 2 aquários foram destinados ao tratamento com B100, idem B5 e B20. Os aquários foram mantidos sob aeração e temperatura constantes em 24°C em um ciclo de claro-escuro de 12h, alimentados a cada dois dias e a cada cinco dias estes eram deslocados para outros

aquários contendo a mesma concentração anterior, a fim de não haver contaminação por nitrogênio amoniacal total, que é excretado pelos próprios animais.

Dois experimentos foram realizados, um com duração de 15 dias e outro com duração de 30 dias. Após o período de exposição, os peixes expostos a 15 dias mediam  $14,55 \pm 2,05$  cm e pesavam  $95,2 \pm 21,5$  g, já os peixes expostos a 30 dias mediam  $13,87 \pm 1,85$  cm e pesavam  $101,4 \pm 13,9$  g; Ao final das exposições, os peixes foram anestesiados com fenoxi-etanol na concentração de 2 mL/L em água e posteriormente tiveram seus tecidos (fígados e brânquias) coletados e armazenados no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . A escolha de tais tecidos se justifica pelo fato do fígado ser o principal sítio metabólico dos vertebrados, estando envolvido nos processos de detoxicação e as brânquias serem as primeiras estruturas que fazem contato com os contaminantes aquáticos, absorvendo-os para o interior do organismo. No total, 42 animais foram usados para a exposição a 15 dias e o mesmo número usados na exposição a 30 dias, não havendo distinção de sexo e a concentração de contaminante utilizada está baseada em estudos realizados pelo próprio grupo com tilápias expostas a 0,01 e 0,1 mL/L de tais contaminantes (NOGUEIRA et al., 2011).

Água, sobras de animais e resíduos químicos tiveram o mesmo procedimento de descarte dos testes de toxicidade.

### **3.4 Preparo das amostras para análises das enzimas EROD, GST, SOD, CAT e GPx**

Para as análises enzimáticas de tais enzimas, os tecidos foram homogeneizados (1:4 massa:volume) em tampão Tris HCl 20mM, pH 7,4 contendo sacarose 0,5M, KCl 0,15mM e 1mM de inibidor de protease (PMSF) e centrifugados a  $10.000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , a fração sobrenadante foi coletada e re-centrifugada a  $50000 \times g$  por 60 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fração sobrenadante foi novamente coletada para as análises das atividades da GST, SOD, CAT e GPx. Os peletes resultantes foram homogeneizados com 100 $\mu\text{L}$  de tampão Tris 100mM, pH 7,5 contendo EDTA 1mM, ditioneitol 1mM, KCl 100 mM e 20% de glicerol para a análise da EROD.

### **3.5 Preparo das amostras para a avaliação da peroxidação lipídica**

Os tecidos foram homogeneizados (1:3) em tampão Tris HCl 0,1M pH 8,0. Em seguida, foram adicionados 300 $\mu\text{L}$  de solução de 40mg de ácido 2-tiobarbúrico (TBA)

diluído em 10mL de HCl 0,2M. As amostras foram incubadas por 40 minutos a 90°C e após esse período o produto da reação foi extraído com 1mL de n-butanol.

### **3.6 Análise da 7-etoxirresorufina-O-deetilase (EROD)**

A EROD foi medida por método fluorimétrico, adaptado de Burke e Mayer (1974). O método fundamenta-se na formação de resorifina, que é fluorescente ( $\lambda_{\text{excit}}=537$  nm,  $\lambda_{\text{emiss}}=583$  nm). À cubeta foram adicionados 1940  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 80 mM pH 7,4, 20  $\mu\text{L}$  de solução de 7-etóxiresorufina 335  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{L}$  de NADPH 20 mM e 10  $\mu\text{L}$  de amostra previamente preparada. A reação foi observada por 3 minutos a 30 °C. A atividade da EROD foi expressa em pmol/mim/mg de proteína.

### **3.7 Análise da glutatona S-transferase (GST)**

A análise da atividade da GST foi realizada segundo o método de Keen et al. (1976). À amostra foi adicionada um meio de reação contendo 100mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 100mM de glutatona reduzida (GSH). O aumento da absorbância devido a formação do CDBN-SG foi acompanhado a 340nm por espectrofotômetro. Os dados foram expressos em U/mg de proteína.

### **3.8 Análise da Superóxido dismutase (SOD)**

A análise da atividade da SOD foi realizada segundo o método de McCord e Fridovich (1969), que é baseado na geração de superóxido (xantina/xantina oxidase) acoplado á redução do Citocromo C pelo radical ânion superóxido, provocando aumento de absorbância em 550nm a 25°C. A adição da amostra contendo a SOD promove uma inibição na velocidade de redução do Citocromo C, uma vez que a SOD compete com o Citocromo C pelo superóxido. Os dados foram expressos em U/mg de proteína.

### **3.9 Análise da Catalase (CAT)**

A análise da atividade da CAT foi determinada de acordo com o método de Beutler (1975) em comprimento de onda de 240 nm a 30°C, quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima. Os dados foram expressos em U/mg de proteína.



### **3.10 Análise da Glutathiona Peroxidase (GPx)**

A análise da atividade da GPx foi realizada de acordo com o método de Sies et al. (1979) que baseia-se na medida em 340 nm através do decréscimo de absorbância durante a redução da glutathiona dissulfeto (GSSG) que foi catalisada por glutathiona redutase (GR) na presença de NADPH a 30°C.

### **3.11 Quantificação de proteína**

A quantificação da concentração de proteína nos extratos foi realizada segundo o método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão e lidas em 595 nm em espectrofotômetro.

### **3.12 Avaliação da Peroxidação Lipídica**

Para se avaliar os níveis de peroxidação lipídica nos tecidos verificou-se a presença do produto formado entre o malondialdeído (MDA) e o ácido 3-tiobarbicúrico (TBA), via HPLC-UV/Vis em 532nm (ALMEIDA et al., 2003,2004). As amostras foram injetadas diretamente no HPLC e a fase móvel se constituiu de uma solução de fosfato de potássio monobásico 50mM pH 7,0 com 40% de metanol, bombeada isocriticamente. A quantificação foi feita com base na curva padrão, que se constituiu de padrões conhecidos de MDA obtidos pela hidrólise do tetrametoxipropano. Os dados foram expressos em nm/mg de tecido.

### **3.13 Análise estatística**

Os resultados das análises dos biomarcadores foram tratados com a ajuda do *software* Statistica 7.0. Para dados paramétricos ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes grupos, usou-se ANOVA, seguido do teste *post hoc* de Tukey. Para dados com variância desigual, de acordo com o teste de Levene, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos ( $p > 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Teste de toxicidade

Ao final de 96 horas de exposição ao teste de toxicidade, os animais mortos foram contabilizados conforme mostrado nas **Tabelas 1, 2 e 3**, para B5, B20 e B100, respectivamente.

**TABELA 1:** Teste de toxicidade para B5, concentrações utilizadas e mortes observadas.

Concentração B5 (mL/L)	Mortes (96h)	% de Mortes
0,188	1	16,7
0,375	3	50
0,75	5	83,5
1,125	6	100
1,5	6	100

**TABELA 2:** Teste de toxicidade para B20, concentrações utilizadas e mortes

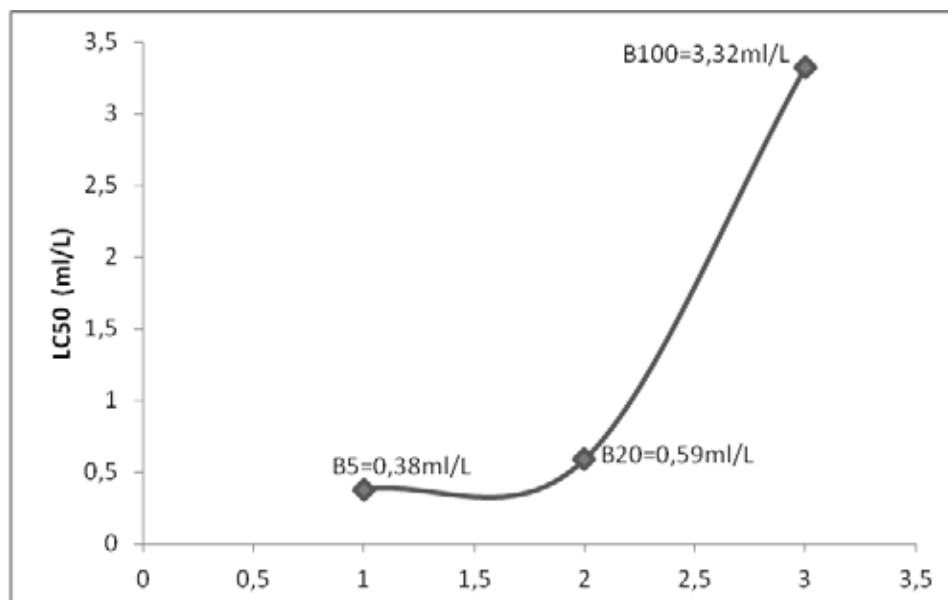
Concentração B20 (mL/L)	Mortes (96h)	% de Mortes
0,188	1	16,7
0,375	2	33,3
0,75	3	50
1,125	5	83,5
1,5	6	100

observadas.

**TABELA 3:** Teste de toxicidade para B100, concentrações utilizadas e mortes observadas.

Conc. B100 (mL/L)	Mortes (96h)	% de Mortes
0,625	0	0
1,25	0	0
2,50	1	16,7
3,75	3	50
5,0	6	100

Realizados tais testes, foram calculadas as LC50 (96h) do B5, B20 e B100, representadas na **Figura 9** abaixo.



**Figura 9:** Representação dos valores de LC50 encontrados: 0,38; 0,59 e 3,32ml/L para B5, B20 e B100, respectivamente.

## 4.2 Exposição controlada a diesel e biodiesel

A exposição por 15 dias foi realizada em setembro de 2011 e a exposição por 30 dias foi realizada em setembro de 2012, a fim de obter características semelhantes do clima e metabolismo dos animais, para posterior comparação dos resultados obtidos.

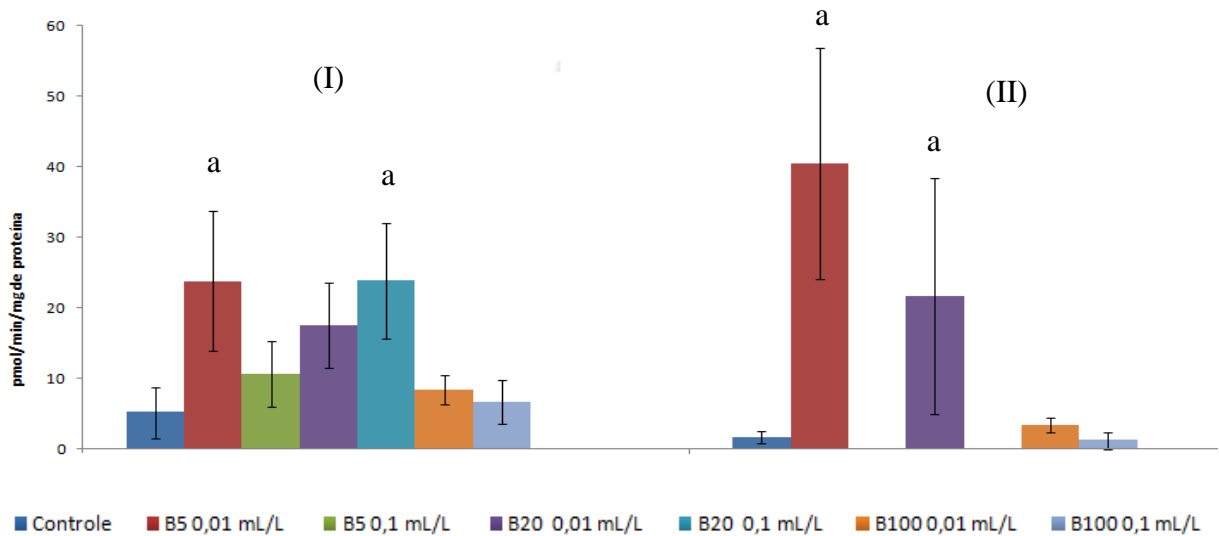
Nenhum peixe morreu nos experimentos de exposição por 15 dias, porém na exposição aos contaminantes por 30 dias alguns peixes morreram. A **Tabela 4** mostra o número de indivíduos nos quais foram avaliados os biomarcadores nesse trabalho, para cada experimento.

**TABELA 4:** Representação do número de réplicas verdadeiras após os períodos de exposição dos animais aos contaminantes.

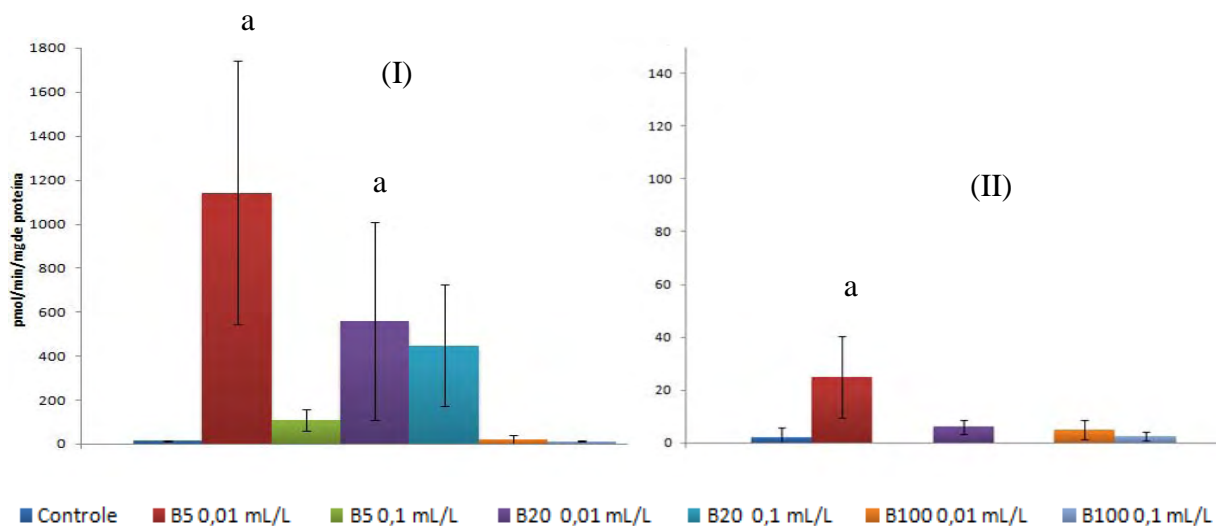
	15 dias	30 dias
Controle	6	6
B5 0,01 ml/L	6	4
B5 0,1 ml/L	6	0
B20 0,01 ml/L	6	5
B20 0,1 ml/L	6	0
B100 0,01 ml/L	6	5
B100 0,1 ml/L	6	5

### 4.3 Análise da 7-etoxirresorufina-O-deetilase (EROD)

Os resultados da análise de EROD de fígados e brânquias de *O. niloticus* estão expressos nas Figuras 10 e 11, onde observa-se indução significativa da enzima nos tratamentos com B5 0,01mL/L e em menor escala para B20 nas duas concentrações testadas quando comparados com o controle, para exposições de 15 e 30 dias. Para B100 nenhuma diferença foi observada em relação ao controle, nos diferentes tecidos e nos diferentes tempos de exposição.



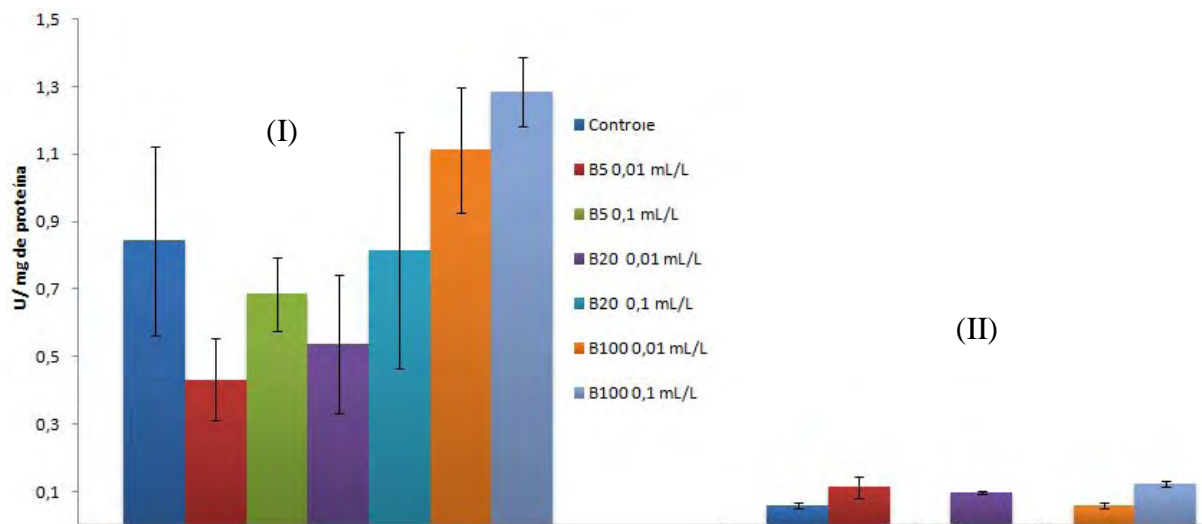
**Figura 10:** Atividade da EROD de brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. a: diferença com controle. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



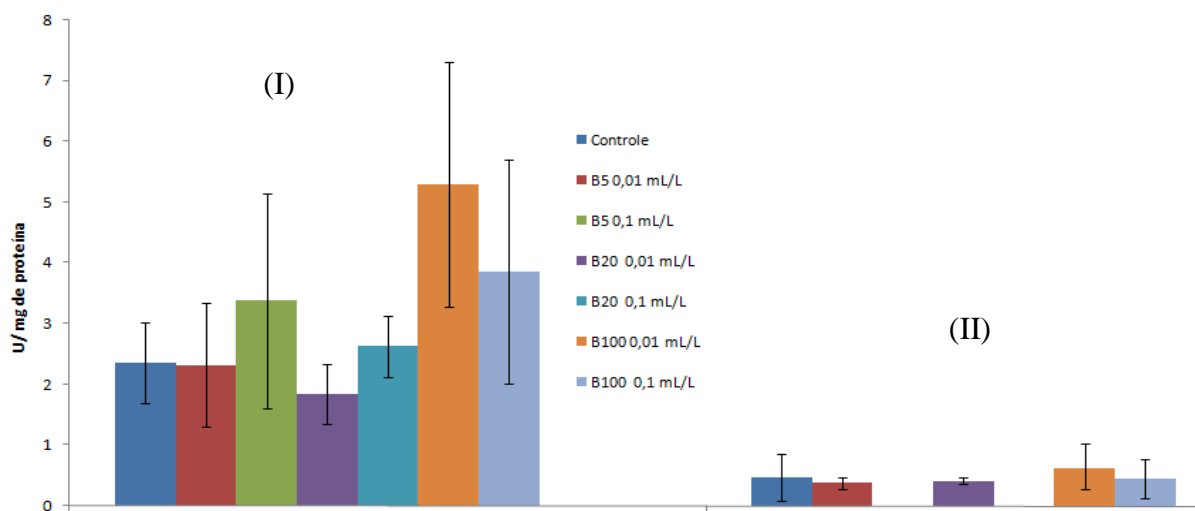
**Figura 11:** Atividade da EROD de fígado de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. a: diferença com controle. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 4.4 Análise da glutatona S-transferase (GST)

Os resultados das análises das atividades da GST de *O. niloticus* estão apresentados na **Figura 12** (brânquia) e **Figura 13** (fígado). Nota-se que as atividades das enzimas variaram bastante nos tratamentos de 15 e 30 dias, sendo que essa atividade foi muito maior em 15 dias. Nenhum tratamento causou alteração na atividade da GST.



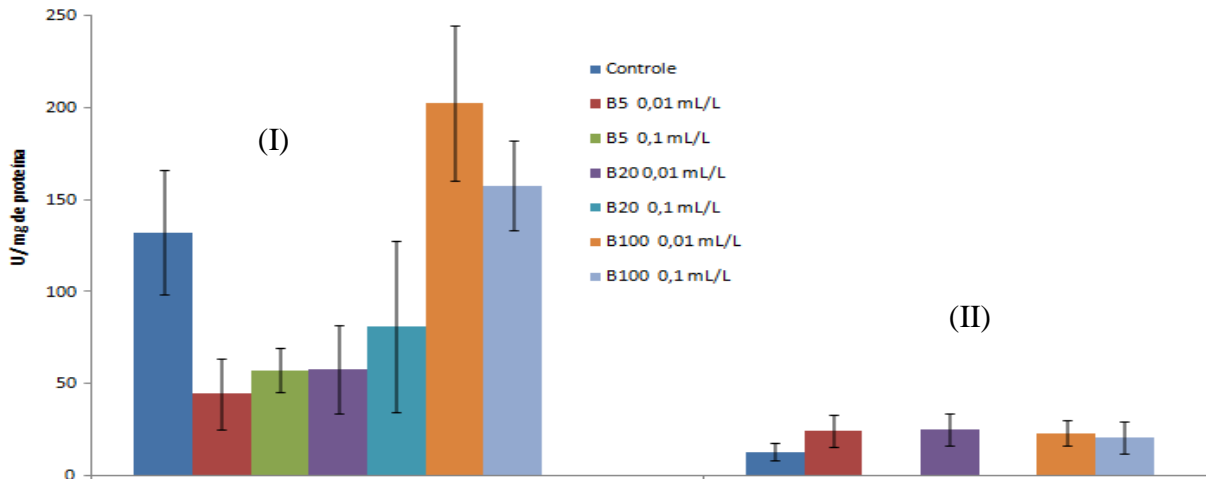
**Figura 12:** Atividade da GST em brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. a: diferença com controle; para  $p < 0,05$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



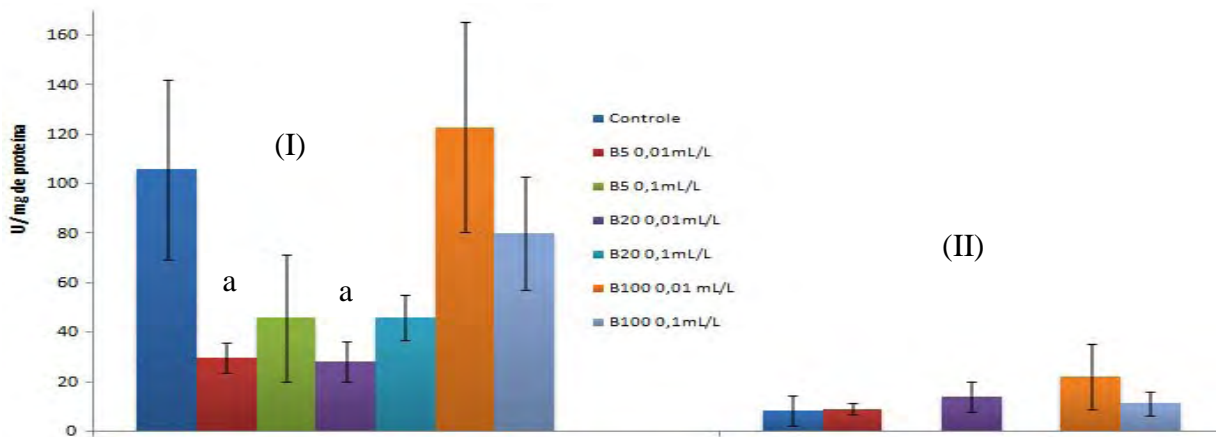
**Figura 13:** Atividade da GST em fígado de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.5 Análise da Superóxido dismutase (SOD)

Resultados de atividade da SOD em fígados e brânquias de *O. niloticus* estão apresentados na **Figura 14 e 15**, respectivamente. Foi observada inibição significativa de tal enzima por B5 0,01mL/L e B20 0,01mL/L quando comparados com controle e B100 0,01mL/L em fígados para tratamento de 15 dias, já para 30 dias nenhuma diferença foi notada. Os mesmos resultados notados para fígados foram obtidos para brânquias.



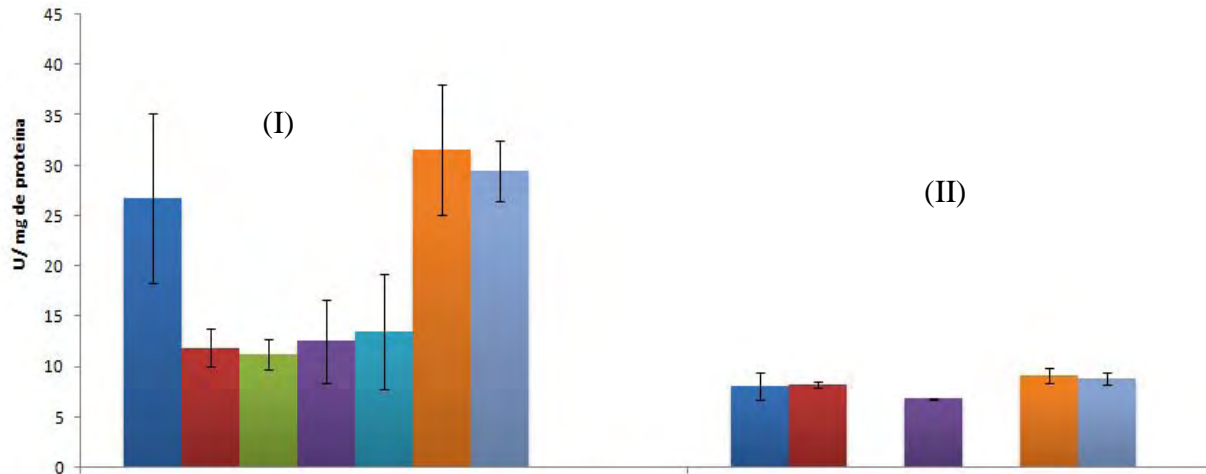
**Figura 14:** Atividade da SOD de brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. a: diferença com controle, para  $p < 0,05$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



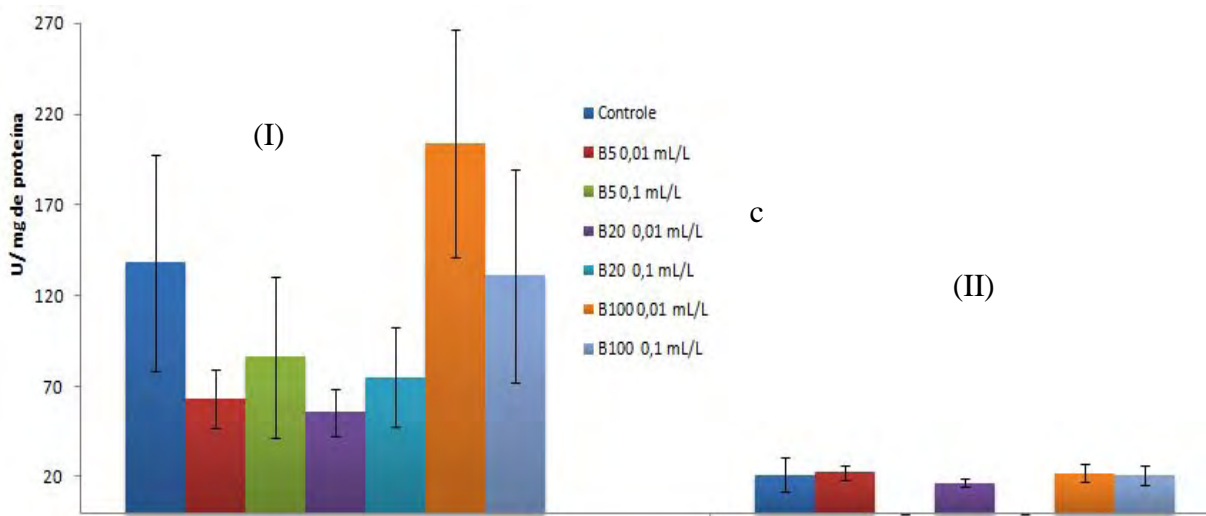
**Figura 15:** Atividade da SOD de fígado de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. a: diferença com controle, para  $p < 0,05$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.6 Análise da Catalase (CAT)

As atividades da CAT em brânquias e fígados de *O. niloticus* estão expressas nas Figuras 16 e 17, respectivamente. Nas brânquias e nos fígados nenhuma diferença significativa foi observada.



**Figura 16:** Atividade da CAT de brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

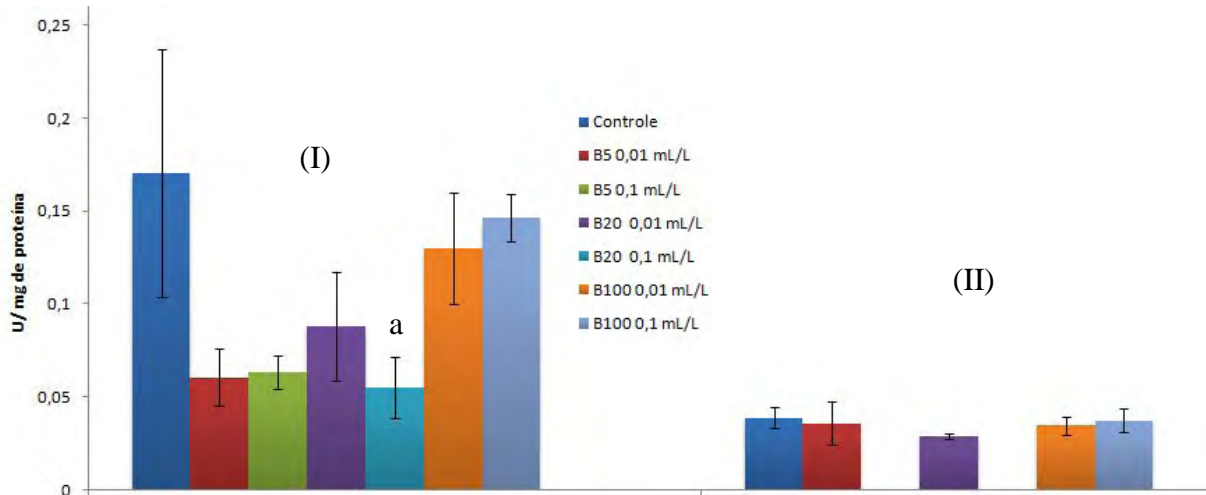


**Figura 17:** Atividade da CAT de fígado de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

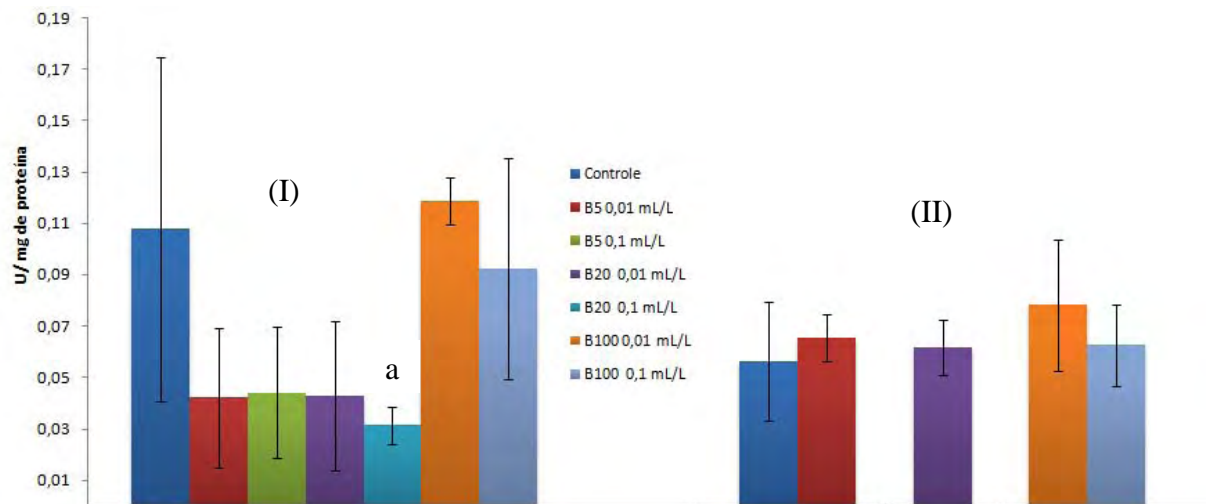


#### 4.7 Análise da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A **Figura 18** apresenta os resultados da atividade da GPx em brânquia de *O. Niloticus*, enquanto a **Figura 19** apresenta a atividade no fígado. Foi observada inibição significativa em B20 0,1mL/L quando comparados com o controle nos dois tecidos analisados. Nos demais tratamentos não observou-se diferenças significantes.



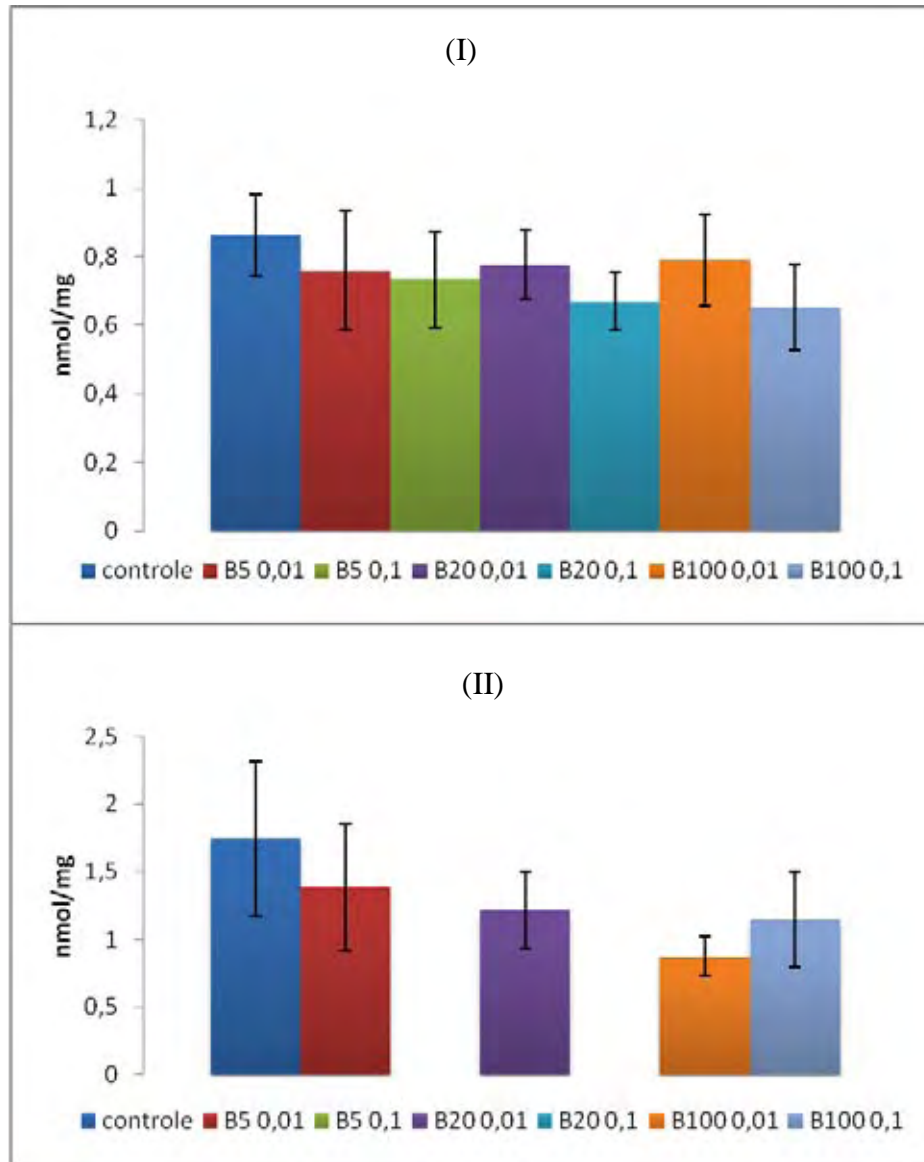
**Figura 18:** Atividade da GPx de brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. a: diferença com controle; para  $p < 0,05$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



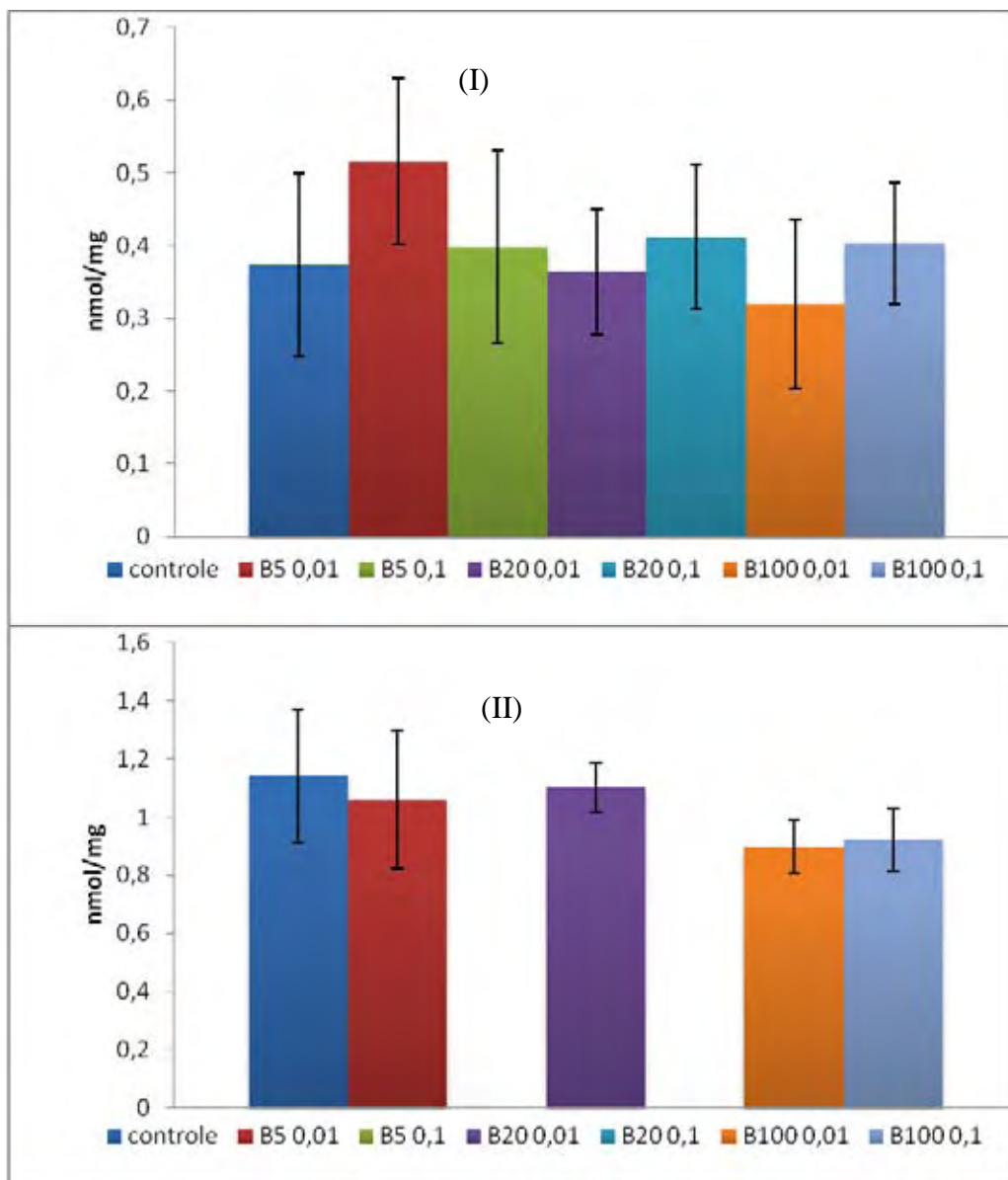
**Figura 19:** Atividade da GPx de fígado de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 B100 por 15 (I) e 30 (II) dias. a: diferença com controle; para  $p < 0,05$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.8 Avaliação da peroxidação lipídica

O resultado do níveis de MDA na brânquia e fígado estão expressos nas **Figuras 20 e 21**, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada para os dois tecidos.



**Figura 20:** Nível de MDA em brânquia de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 B100 por 15 (I) e 30 (II) dias; para  $p < 0,05$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 21:** Nível de MDA em fígado de *Oreochromis niloticus* expostas à B5, B20 e B100 B100 por 15 (I) e 30 (II) dias; para  $p < 0,05$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## 5 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados dos testes de LC50, houve um aumento de toxicidade do B100 para o B5, já que para levar à letalidade 50% dos animais expostos por 96 h é necessária uma concentração consideravelmente menor deste último, em relação ao B20 e ao B100. Tais resultados estão de acordo com trabalhos publicados na literatura. Pereira et al. (2012) comparou resultados de testes de toxicidade de B2, B3, B5, B100 e diesel puro, em 4 espécies de microalgas (*P. subcapitata*, *T. Chuii*, *N. oculata* e *S.costatum*) e constatou aumento de toxicidade do B100 para o diesel puro em todas as 4 espécies testadas. Khan et al. (2007) realizou testes de LC50 para B5, B20, B50 e B100 para duas espécies aquáticas, *D. Magna* e *O. mykiss* e concluiu que biodiesel e frações biodiesel/diesel são consideravelmente menos tóxicos para organismos aquáticos quando comparados com o óleo diesel.

Whyte et al. (2000) descreve HPAs presentes em derivados de petróleo como sendo ativadores de receptores aril hidrocarbonetos em organismos aquáticos, incluindo os peixes. A ativação desses receptores promove uma série de reações em cascata no interior da célula que culminam com a síntese da isoforma 1A do citocromo P450 (CYP1A), consequentemente aumentando a atividade dessa enzima. Em nosso estudo, a atividade da EROD foi induzida em *O. niloticus* nos grupos expostos aos contaminantes B5 e B20, indução esta que não se observa nos grupos expostos ao biodiesel B100, pois o biodiesel puro não contém HPAs, como relatam Nogueira et al. (2010), que analisou HPAs em biodiesel qualitativamente, não obtendo valores destes composto no biodiesel. Esses resultados se mostram similares a trabalhos realizados com peixes expostos HPAs (KOPECKA-PILARCZYK, CORREIA, 2009) e a trabalhos realizados com *O. niloticus* expostos à diferentes frações diesel/biodiesel e ao biodiesel puro (NOGUEIRA et al., 2011).

Uma observação pertinente à atividade da EROD dos peixes expostos por 15 dias é que para os grupos onde houve indução (B5 e B20), a menor concentração testada (0,01mL/L) induziu mais a atividade dessa enzima em relação as maiores concentrações (0,1mL/L), exceto para B20 nas brânquias. Kopecka-Pilarczyk e Correia (2009) também observaram que houve maior indução da EROD de *Sparus aurata* em animais expostos á concentrações menores de uma mistura de HPAs do que em concentrações maiores.

Esses resultados também estão de acordo com o trabalho de Bucheli e Fent (1995) que observou que a atividade do CYP1A pode ser inibida em concentrações mais elevadas de alguns indutores como certos PCBs. Fato que pode ser elucidado nos testes *in vivo* realizado por Nogueira et al. (2011) que expôs *O. niloticus* a diferentes concentrações de diesel e observou maior indução da EROD nas menores concentrações testadas.

Como já mencionado, o óleo diesel é uma mistura complexa de vários compostos derivados do petróleo (VIEIRA et al., 2007). Assim, pode ser que haja substâncias nesse tipo de combustível que em concentrações maiores levou-se a uma inibição da enzima ou de alguma etapa da via metabólica de síntese do citocromo P450. Além disso, pode-se supor que os animais expostos a maior dose dos contaminantes tiveram um comprometimento do metabolismo, afetando sua capacidade de induzir a atividade da EROD adequadamente, enquanto que os animais expostos à dose mais baixa foram capazes de dar uma melhor resposta. De fato, nos grupos expostos por 15 dias não houve nenhuma mortalidade, já nos grupos expostos por 30 dias os peixes expostos a B5 e B20 nas maiores concentrações (0,1mL/L) morreram por volta do vigésimo dia de exposição, corroborando com a hipótese de altas concentrações e tempo prolongado comprometerem o metabolismo dos peixes.

A maior indução da enzima pelo B5 em relação ao B20 nos dois períodos de exposição pode ser explicada pelo fato de haver menor quantidade de diesel no B20, sendo, portanto, menor a indução da enzima, já que na fração diesel/biodiesel o responsável pelo aumento da atividade da EROD é o diesel, por conter os HPAs.

A indução na expressão de EROD nos primeiros dias de contaminação demonstrou que este é um excelente biomarcador sendo capaz de proporcionar a identificação precoce da presença de HPAs e petróleo nos ambientes aquáticos. Contudo, a redução da expressão da EROD em relação ao aumento no tempo de exposição sugere que deve ser utilizado com precaução na identificação de derrames de petróleo não recentes bem como, de vazamentos diários que ocorrem durante as análises de rotina em locais com suspeita de contaminação.

A glutathione S-transferase é uma enzima de detoxificação da fase II do sistema de biotransformação de xenobióticos que catalisa a reação de conjugação da glutathione com uma série de compostos, envolvendo a metabolização de espécies reativas (VAN DER OOST et al., 2003). Neste estudo, a diminuição da atividade da GST observada para os compostos de óleo diesel difere dos resultados de Simonato et al. (2006), que expôs *Prochilodus lineatus* a óleo diesel por 15 dias a 0,08 mL/L, relatando aumento da

atividade dessa enzima. Essa diferença de resposta da GST pode ser explicada por serem espécies de peixes e concentrações utilizadas diferentes, já que o modelo experimental o desenho experimental com aquários de 17 litros é semelhante. Também diferem dos resultados de Nogueira et al. (2011) que expôs *O. niloticus* à diferentes frações diesel/biodiesel e a biodiesel puro onde, após sete dias de exposição, a GST aumentou nas brânquias dos animais tratados com óleo diesel e B5, e no fígado daqueles expostos ao óleo diesel puro. Uma hipótese para esses resultados contrários para a mesma espécie em relação ao B5 pode ser a diferença de tempo de exposição, uma vez que um tempo de tratamento mais prolongado pode debilitar o organismo, diminuindo a expressão e a atividade dessa enzima. Vale ressaltar que no trabalho citado os animais foram expostos por sete dias sem troca de água, enquanto que no presente estudo houve troca de água a cada cinco dias, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação, por nitrogênio amoniacal total, por exemplo.

Por outro lado, a atividade da GST aumentou na brânquia dos animais expostos à maior concentração de B100, o que indica que possíveis elementos presentes na composição do biodiesel possam ativar essa enzima na célula, para sua detoxificação. Pode-se especular também que o aumento da GST nesse caso tenha relação com uma proteção contra EROs que possivelmente possam estar sendo geradas devido à exposição ao B100. No trabalho de Nogueira et al. (2011), observou-se um aumento da peroxidação lipídica nas brânquias de tilápias expostas por 7 dias ao B100, indicando estresse oxidativo. A GST, por apresentar também função antioxidante (possui atividade de peroxidase), estaria assim ativada como uma proteção antioxidante em função da exposição ao B100.

Nos experimentos de 30 dias de exposição nenhuma diferença na atividade da GST foi notada em relação ao grupo controle, sendo somente notado que as atividades em geral foram menores quando comparadas com os experimentos de 15 dias, tanto para brânquias quanto para fígados, inclusive nos grupos controles. Nota-se diminuição geral da atividade da GST no organismo dos animais expostos de 15 para 30 dias, hipótese discutida por Gravato & Santos (2003) que observaram ativação da GST em *Dicentrarchus labrax* nas primeiras 4 e 8 horas e, posteriormente, inibição após as 96 horas de exposição ao óleo diesel e Zhang et al. (2004) relataram aumentos na atividade da GST em *Carassius auratus* expostos a 0,05mg/L de óleo diesel durante os primeiros 25 dias com conseqüente supressão da atividade da GST, inclusive nos grupos controles.

A indução da atividade catalítica de GST reflete uma resposta ao poluente o que sugere a indução do processo de detoxificação (fase II) como forma de eliminar os compostos resultantes da fase I do processo de biotransformação e reduzir os efeitos da intoxicação. Segundo Van der Oost et al. (2003) a utilização da atividade total da GST como biomarcador para avaliação de risco ambiental ou ecológico é limitada a algumas espécies de peixes e, ainda, a exposição a HPAs pode causar tanto a indução quanto a inibição da atividade enzimática.

Para proteger as células contra as EROs, os organismos possuem enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GP<sub>x</sub>), assim como o tripeptídeo glutathione (GSH), que são importantes na conversão de radicais reativos em moléculas não reativas (ALMEIDA; BAINY, 2006).

No presente estudo, a atividade da SOD de animais expostos a B5 0,01 e B20 0,01mL/L por 15 dias foi inibida quando comparada com o grupo controle e nenhuma diferença foi observada para os demais tratamentos, resultados que corroboram o trabalho de Kopecka-Pilarczyk e Correia (2009) que relata inibição da atividade da SOD em peixes quando expostos à HPAs e Avci et al. (2005) que não observa alteração das atividades da SOD quando animais expostos à misturas de HPAs.

A GP<sub>x</sub> teve sua atividade inibida no fígado e na brânquia em relação ao grupo controle nos peixes foram tratados com B20 0,1mL/L por 15 dias, resultado que é semelhante à exposição de 7 dias por B5 0,01mL/L no trabalho de Nogueira et al. (2011), sugerindo que a atividade da GP<sub>x</sub> quando exposta a misturas de diesel/biodiesel tende a ser inibida quando a exposição for prolongada, já que no mesmo trabalho, Nogueira et al. (2011) não observa diferença significativa da GP<sub>x</sub> quando animais expostos à compostos contendo mistura diesel/biodiesel por 2 dias.

Nenhum dos tratamentos causou diferença significativa quando comparado ao grupo controle na atividade da CAT. Esses resultados diferem de Achuba e Osakwe (2003) que observaram aumento da atividade da CAT no fígado e outros órgãos após 14, 21 e 28 dias de exposição de petróleo bruto em *Clarias gariepinus*. Zang et al. (2003) também observou um aumento da atividade da CAT em *Carassius auratus* expostos à óleo diesel por 40 dias. Hipóteses para a diferença dos resultados podem estar relacionadas com o fato de serem espécies e modelos experimentais usados diferentes.

No geral, integrando-se os dados de enzimas antioxidantes, pudemos notar um efeito negativo dos contaminantes na defesa antioxidante dos animais. Entretanto, o

prejuízo na atividade dessas enzimas em função de suas inibições não levou a célula a uma situação de estresse oxidativo, visto que não foram observados aumentos nos níveis de peroxidação lipídica. Outros marcadores de lesão poderiam indicar o contrário, porém para o marcador analisado, ou seja, os níveis de MDA, indicam que mesmo tendo sido inibidas as enzimas antioxidantes, a célula foi capaz de evitar o estresse oxidativo, por exemplo, por meio da ativação de outras defesas antioxidantes não analisadas nesse trabalho.



## 6 CONCLUSÃO

Nossos resultados de teste de toxicidade demonstraram que a toxicidade aumenta do B100 para o B5, passando por B20, indicando que o biodiesel é de fato menos tóxico para os peixes em comparação com o diesel de petróleo. Em geral, os combustíveis que continham diesel de petróleo, como o B5 e B20 foram os que causaram mais alterações nos marcadores avaliados, tais como o aumento na atividade da EROD em brânquia e fígado e as inibições da SOD, GPx e da CAT (apesar de não significativo para esta última), corroborando os dados dos testes de toxicidade. Não obstante, o biodiesel também exerceu efeitos significativos nos peixes, especialmente na atividade da GST, indicando que apesar de ser menos tóxico, pode também levar a efeitos adversos nos peixes. Interessante notar que apesar dos efeitos inibitórios do B5 e B20 nas enzimas antioxidantes, não houve aumentos nos níveis de MDA, sugerindo que o organismo deve ativar outros mecanismos antioxidantes para compensar a menor atividade das enzimas testadas.

Finalmente, é interessante constatar que os efeitos observados para os contaminantes foram evidentes apenas após 15 dias de exposição; após 30 dias, não foram observados efeitos, o que sugere mecanismos de adaptação da atividade enzimática após exposições prolongadas. Entretanto, as concentrações mais altas dos contaminantes levaram à morte os animais expostos ao B5 e B20, apesar de o B100 não ter sido letal nas concentrações testadas após 30 dias, mais uma vez corroborando os dados de menor toxicidade para o B100, em comparação com o B5 e B20.

## 7 REFERÊNCIAS

ACHUBA, F. I.; OSAKWE, S. A. Petroleum - induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 29, p. 97–103(7), 2003.

ALBERS, P. H. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. **Handbook of ecotoxicology**. p. 330-355, 1995.

ALMEIDA, E.A.; BAINY, A.C. Effects of Aerial Exposure on Antioxidant Defenses in the Brow Mussel *Perna perna*. **Brasilian Archives of Biology and Technology** v. 49, n. 2, p. 225-229, 2006.

ALMEIDA, E.A., MIYAMOTO, S., BAINY, A.C., MEDEIROS, M.H., DI MASCIO, P. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Mar. Pollut. Bull.** V. 49, p. 386–392, 2004.

ALMEIDA, E.A., MARQUES, S.A., KLITZKE, C.F., BAINY, A.C.D., MEDEIROS, M.H.G., DI MASCIO, P., LOUREIRO, A.P.M. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.** 135, p. 295–303, 2003.

ANP, Agência Nacional do Petróleo. [www.anp.gov.br/](http://www.anp.gov.br/), acessado em 10/12/2012.

BAUMANN, P. C. Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water. **Mutat Res**, v. 411, n. 3, p. 227–33, 1998.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. **Grune & Stratton**, New York, 1975.

BIANCHI M.L.P, ANTUNES L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.** 12, p.23-30, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v.72, p.248–254, 1976.

BUCHELI, T.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Environ. Sci. Technol.**, v. 25, p. 201–268, 1995.

BURGEOT, T.; BOCQUENÈ, G; PORTE, C.; DIMEET, J.; SANTELLA, R.M.; GARCIA DE LA PARRA, L.M.; PFHOL-LESZKOWICS, A.; RAOUX, C.; GALGANI, F. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series.** v. 131, p. 125-141, 1996

BURKE, M.D., MAYER, R.T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug. Metab. Dispos.** v.2, p.583–588, 1974.

CAIRNS, J.J.R; PRATT, J.R. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. *In*: ROSENBERG, D. M.; RESH, V.H. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates.** 1993.

CAJARAVILLE, M.P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CAJARAVILLE, M.P. et al. Signs of recovery of mussels health two years after the Prestige oil spill. **Marine Environmental Research**, v. 62, p. 337-341, 2006.

CARRO, N.; COBAS, J.; MANEIRO, J. Distribution of aliphatic compounds in bivalve mollusks from Galicia after the Prestige oil spill: Spatial and temporal trends. **Environmental Research**, v.100, p. 339-348, 2006.

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

COLLIER, T. K.; VARANASI, U. Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 20, p. 462-473, 1991.

COLLIER, T. K.; KRONE, C. A. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon Valdez oil spill. **American Fisheries Society**, v. 18, p. 671-683, 1996.

DEN BESTEN, P. J.; ELENBAAS, J. M. Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P-450 monooxygenase system in the sea star *Asterias rubens* L, **Aquatic Toxicology**, v. 20, p. 95-110, 1991.

FARBER, J.L. et al. Biology of disease mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab invest.**, v. 62, p. 670-678, 1990.

FILHO, A.M.S. Planos Nacionais de Contingencia para Atendimento a Derramamento de Oleo: Analise de Países Representativos das Americas para Implantacao no Caso do Brasil. 2006. 217 f. Dissertacao (Mestrado em Ciencias em Planejamento Ambiental) - Curso de Pos-Graduacao em Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FISHER A. B.; Intracellular production of oxygen-derived free radicals. Proceedings of a book of a lodge symposium; c. 27-29; p. 99-104; 1987.

GRAVATO, C. AND M. A. SANTOS. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P – biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L.. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 55, p. 352-358, 2006.

GEORGE, S.G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobioticconjugating enzymes in fish. In: MALLINS D.C., OSTRANDER G.K. **Aquatic Toxicol.:** molecular, biochemical and cellular perspectives, p. 37–85, 1994.

GESTEL, C. A. M.; BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 217–225, 1996.

GOWLAND, B. T. G.; McINTOSH. A.D.; Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. **Marine Environmental Research**. V. 54, p. 231-235, 2002.

GRAÇA, W.J. & PAVANELLI, C.S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. EDUEM, Maringá. p.241, 2007.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.** v.142(2): p.231-55, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. v.1, p.851, 2007.

HAMOUTEN, D. et al. Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. **Mar Environ Res**, v. 54, n. 3- 5, p. 471–4, 2002.

HERMES-LIMA, M., Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. John Wiley & Sons Inc. v. 12, p. 319-368.; 2004.

INZUNZA, B; ORREGO, R. Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 242-251, 2006.

JHA, A. N. Genotoxic studies in aquatic organisms: an overview. **Mutation Research**, v. 552, p. 1-17, 2004.

KEELING, P.L.; SMITH, L.L. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. **Biochem Pharmacol.**, v. 31, p. 3243-3249, 1982.

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **J. Biol. Chem.** v.251, p. 6183–6188, 1976.

KENNISH, M.J. Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects. Londres: CRC Press, p. 494, 1992.

KETTRUP, A.; MARTH, P. Specimen banking as environmental surveillance toll. In: SCHÜÜRMAN, G.; MARKERT, B. (Ed.). **Ecotoxicology-ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects**. New York: John Wiley & Sons, 1998.

KHAN, N.; WARITH, M. A.; LUK, G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel lends, and diesel on aquatic organisms. **J Air Waste Manag Assoc.**, v.57, n. 3, p. 286-96, 2007.

KOPECKA-PILARCZYK, J., CORREIA, A.D. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 72, p. 1296–1302, 2009.

LEITE, M. B. L., MILENA M. S. A., NASCIMENTO N.C. Toxicity of water-soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 893–897, 2011.

LENARTOVA, V.; HOLOVSKA, K.; PEDRAJAS, J.R.; LARA, E.M.; PEINADO, J.; LOPEZ-BAREA, J.; ROSIVAL, I.; KOSUTH, P. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarker of river pollution. **Biomarkers.**, v. 2, p. 247–252, 1997

LEWIS, D.F.V.. **Taylor & Francis Group**, 2001.

LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 120, n. 1, p. 43-49, 1998.

[LOPES, C.F.; MILANELLI, J.C.C.; PROSPERI, V.A.; ZANARDI, E. & TRUZZI, A.C. 1996. Avaliação dos danos ecológicos causados pelo derrame de óleo TEBAR V \(maio/1994\), sobre comunidades de costões rochosos.São Paulo, CETESB, Relatório Técnico, 25p.+anexos.](#)

MAGALHAES, D. P.; FERRAO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, v.12, p. 355-381, 2008.

MARTINEZ C. B. R.; Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. p. 42-62; 2006.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** v. 244, p. 6049–6055; 1969.

MENICOM, M.F.G. et al. Brazilian oil spills chemical characterization - case studies. **Environmental Forensics**, v. 3, p. 303-321, 2002.

MONOSTORY, K.; JEMNITZ, K.; VERECZKEY, L. Xenobiotic metabolizing enzymes in fish: diversity, regulation and biomarkers for pollutant exposure. **Acta Physiol Hung.**, v. 84, n. 4, p. 369-381, 1996.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 370-374, 2002.

NIENCHESKI, LF MGZ BAUMGARTEN. [Distribution of particulate trace metal in the southern part of the Patos Lagoon estuary](#) Aquatic Ecosystem. **Health & Management** v.3 (4), p.515-520, 2000.

NOGUEIRA, L. ALMEIDA, E. A Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere** v. 85; p. 97–105; 2011.

NOGUEIRA, L. ALMEIDA, E. A. Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. **Environ Monit Assess**, v. 180, p. 243-245, 2010.

NORDBERG, J., ARNÉR, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biol. Med.** 31, 1287–1312, 2001.

NORTON, W.N.; MATTIE, D. R.; KEARNS, C.L. Lesions induced by aromatic hydrocarbons, **Am. J. Pathol**, v. 118 , n. 3, p. 387–397, 1985.

OLF. The Norwegian Oil Industry Association Water Column monitoring. **Summary Report Discharges risk assessment monitoring**, 2005.

OZMEN, M. et al. Monitoring the effects of water pollution on *Cyprinus carpio* in Karakaya Dam Lake, Turkey. **Ecotoxicol.**, v. 15, n. 2, p. 157-169, 2006.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 49, n. 1, p. 64–75, 2001.

PARKINSON A. Biotransformation of xenobiotics. **Casarett and Doull's toxicology**. p. 113-186, 1995.

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 20-36, 2004.

PEREIRA S.A. et al. Toxicity of biodiesel, diesel and biodiesel/diesel blends: comparative sub-lethal effects of water-soluble fractions to microalgae species. **Bull Environ Contam Toxicol**. v.88, p. 234–238, 2012.

ROVER JR L, HOEHR NF, VELLASCO AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

SHAMI N.J.I.E, MOREIRA E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr**. v. 17(2), p. 227-236, 2004.

SHEEHAN J, CAMOBRECO V, DUFFIELD J, GRABOSKI M, SHAPOURI H. An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. **Report of National Renewable Energy Laboratory**, U. S. Department of Energy (DOE), 1998.

SHOUTORN P. A. & POWIS G.; Free radicals in Medicine, nature and biologic reactions. **Mayo clinic proceedings**. v. 63, p. 381-389; 1988.

SIES, H., KOCH, O.R., MARTINO, E., BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett.** v.103, p. 287-290, 1979.

SILVA, M.E.F. et al. A new method purific hepatic CYP1A of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian freshwater fish. **Comparative biochemistry and physiology**. v. 138, p. 67-74, 2004.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 76, n. 3, p. 505-11, 2006.

SIMONATO, J.D.; GUEDES C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 112-120, 2008.

SORIANO, J.A. et al. Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. **Science of the Total Environment**, v. 370, p. 80-90, 2006.

STEGEMAN, J.J.; HAHN, M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. *In*: MALINS, D.C.; OSTRANDER, G.K. (Eds.) **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives**, 1994.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. **Quím. Nova**, v. 27 n. 3, p. 441-446, 2004.

TIMBREL, J.A. **Principles of biochemical toxicology**, 1991.

TRÍDICO, C. P. et al. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo [a] pyrene and diazinon. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 73, n. 5, p. 858-863, 2010.

TUVIKENE, A. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Ann. Zool. Fennici**, v. 32, p. 295-309, 1995

V. B. URLACHER AND S. EIBEN, **Trends Biotechnol.**, v. 24, p. 324, 2006.

VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol Environm Saf.**, v. 64, p. 178-189, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesement: a review. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA EAM; BERNARDES MM; Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e na defesa antioxidante. **Medicina (Ribeirão Preto)**; c. 31; p. 31-44; 1998.

VANZELLA, T.P.; MARTINEZ, C.B.R.; COLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 631, p. 36-43, 2007.

VIEIRA, P. A. et al. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **J Hazard Mater**, v. 140, n. 1-2, p. 52–59, 2007.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Crit Rev Toxicol**, v. 30, n. 4, p. 347–570, 2000.

WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.J. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. **Toxicol Pathol.**, v. 30, n. 1, p. 41-53, 2002.

ZHANG, J.F., WANG, X.R., GUO, H.Y., WU, J.C., XUE, Y.Q. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.58, p. 110–116, 2004.

ZIOLLI, R. L. Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo. **Revista Saúde e Ambiente** . v. 3, n.2, 2002.