



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

**DETECÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS DA
EXPOSIÇÃO A ÓLEOS LUBRIFICANTES
AUTOMOTIVOS EM TILÁPIA (*Oreochromis
niloticus*, LINNEAUS, 1758, CICHLIDAE)**

Mariana Navarro Garcia

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural

Mariana Navarro Garcia

Detecção dos efeitos subletais da exposição a óleos lubrificantes
automotivos em Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

São José do Rio Preto

2012

Mariana Navarro Garcia

Detecção dos efeitos subletais da exposição a óleos lubrificantes
automotivos em Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Biologia Animal, área de Biologia
Estrutural junto ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal 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

2012

Mariana Navarro Garcia

Detecção dos efeitos subletais da exposição a óleos lubrificantes
automotivos em Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Biologia Animal,
área de Biologia Estrutural junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal 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
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira
Professor Doutor
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Altair Benedito Moreira
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

02/08/2012

Garcia, Mariana Navarro.

Detecção dos efeitos subletais da exposição a óleos lubrificantes automotivos em tilápia (*Oreochromis niloticus*, Linneaus, 1758, Cichlidae) / Mariana Garcia Navarro. – São José do Rio Preto: [s.n.], 2012.

118 f. : 26 il. ; 30 cm.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida

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

1. Óleo Lubrificante. 2. Estresse Oxidativo. 3. Biomarcadores. 4. Ictiologia 5. Tilápia (Peixe) - Efeito da poluição da água. I. Almeida, Eduardo Alves. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título

CDU - 597

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, o professor Dr. Eduardo Alves de Almeida, pelo apoio, incentivo e dedicação ao meu trabalho. Ao CAUNESP e à professora Dra. Eliane Gonçalves, do IBILCE/UNESP, pelo fornecimento dos peixes usados nos experimentos. Aos companheiros de laboratório Alexandre, Danilo, Beatris, Mariana, LÍlian, Lucilene, Luis e todos os outros não citados, mas que não com certeza não foram esquecidos, pela companhia e auxílio nos procedimentos experimentais e o melhor de tudo pela amizade. Aos meus amigos Carla, Cíntia, Felipe, Guaraci e Gisandro pelo carinho e parceria em todos os momentos. Ao meu namorado Renan pela ajuda no laboratório, em casa e por ter sido o grande apoio até o final. À minha família que me transformou em quem eu sou. À CAPES pelo auxílio financeiro.



A ausência de evidência não significa evidência da ausência.
(Carl Sagan)

RESUMO

Poucos são os estudos que abordam os efeitos do óleo lubrificante sobre a biota aquática. Somando seu caráter tóxico e persistente à falta de fiscalização e informação, percebemos que este composto merece grande atenção. O óleo usado possui algumas características particulares em relação ao óleo lubrificante novo, tais como maior viscosidade e uma composição/proporção diferentes de substâncias devido à queima deste produto. A partir destas informações, a principal questão a ser respondida neste trabalho é até que ponto o óleo lubrificante usado pode produzir mais ou maiores alterações bioquímicas nos peixes em comparação ao lubrificante novo, e o quanto estes dois causam mudanças em parâmetros bioquímicos em relação a animais controles não expostos. Com isso, este trabalho teve como objetivo investigar possíveis efeitos subletais em organismos expostos a óleos lubrificantes novos e usados, usando como modelo biológico a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Grupos de seis animais foram expostos durante três e sete dias às concentrações de 0,01 e 0,1 mL/L do óleo lubrificante novo e as mesmas concentrações para o óleo lubrificante usado. Para verificar os efeitos dos contaminantes foram realizadas análises enzimáticas no fígado e na brânquia de enzimas de fase I (EROD), fase II (GST), antioxidantes (CAT, GPx, SOD e G6PDH), avaliação da lipoperoxidação além, do teste *in vitro* da atividade da EROD hepática. A exposição a estas concentrações tanto do óleo lubrificante novo como do usado resultou em variações nas atividades de todas as enzimas utilizadas neste estudo no período de três dias exceto pela GPx. Foi observado um aumento da peroxidação lipídica apenas no tratamento com concentração de 0,1 mL/L de óleo lubrificante novo no fígado de animais expostos por três dias, o que significa que nos outros tratamentos as defesas antioxidantes foram eficientes contra as ERO. No geral os resultados foram similares, inclusive considerando que a CAT aumentou nas brânquias após sete dias em todos os tratamentos, porém o aumento do MDA no tratamento com o óleo novo e não no usado, sugere que houve estresse oxidativo apenas com o ON. O teste *in vitro* realizado mostrou inibição da EROD com o aumento da concentração do óleo lubrificante novo e usado, porém efeito do óleo usado foi maior do que o novo, mostrando que *in vitro* a composição e a proporção de compostos na mistura do óleo lubrificante usado parecem ter um potencial mais tóxico do que o óleo novo.

PALAVRAS-CHAVE: Óleo Lubrificante; Biomarcadores; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

There are few studies on effects of lubricating oil in aquatic biota. Adding character to the toxic and persistent lack of monitoring and reporting, we realize that compound deserves attention. The oil used has some unique characteristics regarding the new oil such as increased viscosity and a composition/proportion of substances different from the burning of the product. From this information, the main question to be answered in this paper is to what extent the used lubricating oil can produce more or larger biochemical changes in fish in comparison with new lubricant, and how these two causes changes in biochemical parameters compared to control animals not exposed. Therefore, this study aimed to investigate potential sublethal effects on organisms exposed to new and used lubricating oils, as a biological model using the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Groups of six animals were exposed for three and seven days at concentrations of 0,01 to 0,1 mL/L of the new oil and the same concentrations used for the lubricating oil. To check the effects of contaminants were analyzed enzyme in the liver and gill of phase I enzymes (EROD), phase II (GST), antioxidant (CAT, GPx, SOD and G6PDH), evaluation of lipid peroxidation in addition, the *in vitro* test EROD activity of liver. Exposure to these concentrations of both the new oil as the one used resulted in changes in the activity of all enzymes used in this study in three days except for GPx. An increased lipid peroxidation in the treatment only with a concentration of 0,1 mL/L of new oil in the liver of animals exposed for three days, which means that the other treatments were effective antioxidant defenses against ROS. In general, the results were similar, whereas the even increased CAT gills after seven days in all treatments, but the increase of MDA in the treatment with the new oil and not in use, suggests that oxidative stress was only with the ON. *In vitro* tests carried out showed inhibition EROD with increasing concentration of the lubricating oil and used again, but the effect of oil used was greater than new *in vitro* showed that the composition and the proportion of compounds in the mixture of lubricant oil seem have a potentially more toxic than the new oil.

KEY-WORDS: Lubricating Oil, Biomarkers, Oxidative Stress.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
CAPÍTULO I	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. ÓLEOS LUBRIFICANTES	17
2.2. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	21
2.3. ORGANISMO-TESTE E BIOMARCADORES	23
2.4. EFEITOS DE POLUENTES	26
2.4.1. BIOTRANSFORMAÇÃO	26
2.4.2. ESTRESSE OXIDATIVO	29
3. OBJETIVOS GERAIS.....	32
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS	33
4.2. ÓLEO LUBRIFICANTE	34
4.3. PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO CONTROLADA DOS ANIMAIS AO ÓLEO LUBRIFICANTE...	35
4.4. DESCARTE DE RESÍDUOS TÓXICOS E DE ÁGUA CONTAMINADA	39
4.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	39
CAPÍTULO II.....	41
1. INTRODUÇÃO	42

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	45
2.2. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	45
2.3. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	45
2.3.1. SUPERÓXIDO DISMUTASE	45
2.3.2. CATALASE.....	46
2.3.3. GLUTATIONA PEROXIDASE	46
2.3.4. GLICOSE-6-FOSFATO-DESIDROGENASE	46
2.3.5. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	46
2.3.6. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1. SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	48
3.2. GLICOSE-6-FOSFATO-DESIDROGENASE	60
3.3. CATALASE	50
3.4. GLUTATIONA PEROXIDASE	57
3.5. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	62
4. CONCLUSÕES	68
CAPÍTULO III	69
1. INTRODUÇÃO	70
1.1. ETÓXIRESORUFINA- O-DESETILASE	70
1.2. GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....	74
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	76
2.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	76
2.3. TESTE <i>IN VITRO</i>	77

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1. ETÓXIRESORUFINA-O-DESETILASE <i>IN VIVO</i>	78
3.2. ETÓXIRESORUFINA-O-DESETILASE <i>IN VITRO</i>	86
3.3. GLUTATIONA-S-TRANSFERASE <i>IN VIVO</i>	89
3.4. GLUTATIONA-S-TRANSFERASE <i>IN VITRO</i>	93
4. CONCLUSÕES	94
DISCUSSÃO GERAL	95
CONCLUSÕES FINAIS	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Nesta figura estão os 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1987).	21
Figura 2. Representação esquemática da sequência de ordem de respostas à poluição dentro de um sistema biológico (Adaptado de MOORE et al., 2004).	25
Figura 3. Esquema do processo de biotransformação de xenobióticos.	27
Figura 4. Reações de síntese e de degradação de algumas ERO.	30
Figura 5. Tamanho médio dos espécimes de <i>O. niloticus</i>	33
Figura 6. Delineamento experimental.	37
Figura 7. Dissecção da tilápia-do-Nilo.	38
Figura 8. Visceras retiradas da cavidade celomática. Seta indicando o fígado, órgão retirado e utilizado para as análises.	38
Figura 9. Região opercular arrebatada mostrando o posicionamento dos arcos branquiais.	39
Figura 10. Sistema oxidante e antioxidante da célula. (Adaptado de FORTUÑO et al., 2005; RAY; SHAH, 2005).	43
Figura 11. Gráfico da atividade da SOD no fígado de <i>O. niloticus</i> controle e expostas (T) por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.	48
Figura 12. Gráfico da atividade da G6PDH no fígado de <i>O. niloticus</i> controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.	61
Figura 13. Gráfico da atividade da CAT na brânquia de <i>O. niloticus</i> controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.	51

Figura 14. Gráfico da atividade da CAT no fígado de <i>O. niloticus</i> controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L.	53
Figura 15. Gráfico da atividade da GPx na brânquia de <i>O. niloticus</i> controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L.	58
Figura 16. Gráfico da atividade da GPx no fígado de <i>O. niloticus</i> controle e expostas (T) por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L.	59
Figura 17. Gráfico da concentração de MDA na brânquia de <i>O. niloticus</i> controle e expostas (T) por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.	63
Figura 18. Gráfico da concentração de MDA no fígado de <i>O. niloticus</i> controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.	65
Figura 19. O sistema do citocromo P450. P450 ⁺³ : citocromo P450 com o ferro no estado oxidado (Fe ⁺³); P450 ⁺² : citocromo P450 com o ferro no estado reduzido (Fe ⁺²); RH: substrato/xenobiótico; e-: elétron (Fonte: adaptado de LANDIS; YU, 1995).	70
Figura 20. Esquema do mecanismo de indução da EROD.	73
Figura 21. Atividade da EROD em brânquia de <i>O. niloticus</i> . Grupo controle e grupos expostos por 3 ou 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.	78
Figura 22. Atividade da EROD no fígado de <i>O. niloticus</i> controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.	80
Figura 23. Porcentagem da inibição da atividade da EROD no fígado de <i>O. niloticus</i> de acordo com o aumento da concentração do óleo lubrificante novo e usado.	88
Figura 24. Atividade da GST em brânquias de <i>O. niloticus</i> controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao	

controle. b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com maior concentração. c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.....	89
Figura 25. Atividade da GST em fígado de <i>O. niloticus</i> controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L.	91
Figura 26. Gráfico obtido através do teste de temperatura da GST. Redução da atividade da enzima após 60 minutos incubada a 37 °C.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias dos pesos e tamanhos dos indivíduos utilizados no experimento.....	33
Tabela 2. Especificações do produto utilizado para exposição dos animais.	34
Tabela 3. Classificação do óleo lubrificante multiviscoso 15W40.	35
Tabela 4. Análise de variância da atividade enzimática da SOD no fígado de <i>O. niloticus</i> através de aplicação de teste não-paramétrico (Kruskall-Wallis).	49
Tabela 5. Comparação da atividade enzimática da SOD hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.....	49
Tabela 6. Análise de variância da atividade enzimática da G6PDH no fígado de <i>O. niloticus</i> através de aplicação de teste não-paramétrico (Kruskall-Wallis).	61
Tabela 7. Comparação da atividade enzimática da G6PDH hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.....	62
Tabela 8. Análise de variância da atividade enzimática da CAT na brânquia de <i>O. niloticus</i>	52
Tabela 9. Comparação da atividade enzimática da CAT na brânquia entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.....	52
Tabela 10. Análise de variância da atividade enzimática da CAT no fígado de <i>O. niloticus</i> através de aplicação de teste não-paramétrico (Kruskall-Wallis).	53
Tabela 11. Comparação da atividade enzimática da CAT hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.....	54
Tabela 12. Análise de variância da atividade enzimática da GPx no fígado de <i>O. niloticus</i> . ..	59
Tabela 13. Comparação da atividade enzimática da GPx hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.....	60
Tabela 14. Análise de variância da LP na brânquia de <i>O. niloticus</i>	64
Tabela 15. Comparação da LP na brânquia entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.	64
Tabela 16. Análise de variância da peroxidação lipídica no fígado de <i>O. niloticus</i>	65
Tabela 17. Comparação da LP no fígado entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição ao mesmo tratamento.	66
Tabela 18. Análise de variância da atividade enzimática da EROD na brânquia de <i>O. niloticus</i>	79

Tabela 19. Comparação da atividade enzimática da EROD na brânquia entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.....	79
Tabela 20. Análise de variância da atividade enzimática da EROD no fígado de <i>O. niloticus</i> através da aplicação de testes não-paramétricos.....	81
Tabela 21. Comparação da atividade enzimática da EROD hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.....	81
Tabela 22. Análise de variância da atividade enzimática da GST na brânquia de <i>O. niloticus</i>	90
Tabela 23. Comparação da atividade enzimática da GST nas brânquias entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.....	90
Tabela 24. Comparação da atividade enzimática da GST hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.....	91
Tabela 25. Alterações das enzimas analisadas na brânquia para cada tratamento do período de 3 dias.....	95
Tabela 26. Alterações das enzimas analisadas na brânquia para cada tratamento do período de 7 dias.....	96
Tabela 27. Alterações das enzimas analisadas no fígado para cada tratamento do período de 3 dias.....	97
Tabela 28. Alterações das enzimas analisadas no fígado para cada tratamento do período de 7 dias.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AhR	Receptor aril hidrocarboneto
BTEX	Benzeno, tolueno, etileno e xileno
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CYP1A	Isoforma 1A do citocromo P450
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
EROD	7-etóxi-resorufina-O-deetilase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F	Valor retornado pelo teste ANOVA e de Levene
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
gl	Graus de liberdade
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
H	Valor retornado pelo teste de Kruskal-Wallis
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	High performance liquid chromatography
LP	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MFOs	Oxidases multi-funções
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ON	Óleo lubrificante novo
OU	Óleo lubrificante usado
p	Valor de probabilidade do teste de hipótese
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico

APRESENTAÇÃO

O tema desta dissertação de mestrado será apresentado em três capítulos, os quais possibilitarão estimar os efeitos do óleo lubrificante. No primeiro capítulo será apresentada uma introdução expondo as justificativas para a realização deste trabalho, bem como uma revisão bibliográfica acerca dos principais aspectos teóricos dos óleos lubrificantes e seus principais constituintes, organismos-testes, biomarcadores, biotransformação e estresse oxidativo.

No capítulo II, através de análises bioquímicas, serão mostrados os efeitos do óleo lubrificante novo e usado em diferentes tempos de exposição e concentrações. Os parâmetros utilizados foram biomarcadores enzimáticos e não enzimáticos relacionados ao estresse oxidativo em organismos da espécie *Oreochromis niloticus*.

E no último capítulo serão apresentados os resultados encontrados através da análise das enzimas de biotransformação EROD e GST em organismos *in vivo*. Neste mesmo capítulo também serão revelados os dados encontrados em testes *in vitro* realizados. Estes testes foram feitos a fim de obter mais informações sobre o comportamento destas mesmas enzimas expostas ao óleo lubrificante novo e usado.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

1. INTRODUÇÃO

Considerados símbolos do mundo moderno, os meios de transporte automotivos e as máquinas motorizadas estão plenamente disseminados pelo mundo. Automóveis, ônibus, caminhões, motocicletas, barcos, trens, aviões, além de um grande número de equipamentos motorizados tais como colheitadeiras, tratores e motosserras, destinados e adaptados aos mais diversos fins, todos tem algo em comum: dependem de lubrificação, em especial nos seus motores, para seu perfeito funcionamento (APROMAC, 2009). Para tal função existe o óleo lubrificante, um produto derivado de petróleo, composto basicamente por hidrocarbonetos. Além destes hidrocarbonetos, são colocados diversos aditivos para uma melhor *performance*. Esses aditivos são, em geral, metais (HILIGOSS; O'LEAR, 2001).

Óleos lubrificantes não são consumidos por completo durante o uso, porém têm um tempo de uso adequado para se evitar danos ao motor (<<http://www.fecombustiveis.org.br>>). Por este motivo, trocar o óleo lubrificante dos veículos é um ato dos mais corriqueiros e certamente a maioria dos motoristas brasileiros já foi pelo menos uma vez a um posto de combustíveis ou oficina para esta finalidade. Apesar disso, poucas pessoas sabem dos riscos para o ambiente, para a saúde humana e até para a economia do país que o gerenciamento inadequado do óleo lubrificante usado pode causar (FONTENELLE, 2007).

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo comparar os efeitos dos óleos lubrificantes novos e usados para peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, conhecida popularmente como tilápia-do-Nilo. A avaliação foi feita por meio da análise de biomarcadores, com o intuito de verificar até que ponto o óleo usado é mais ou menos tóxico que o novo. Os dados obtidos neste trabalho contribuirão, portanto, para melhor se compreender a toxicologia destes compostos. Além de fornecer informações importantes como subsídio para interpretação de futuros estudos de biomonitoramento ambiental através da análise de biomarcadores bioquímicos de contaminação em tilápias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ÓLEOS LUBRIFICANTES

Óleos lubrificantes minerais são subprodutos do refino do petróleo (CAMARGO, 2003). Eles apresentam alta viscosidade e longas cadeias de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (HILIGOSS; O'LEAR, 2001). A função básica de um óleo lubrificante é reduzir o atrito e o desgaste entre partes móveis de um objeto, aumentando assim, a vida útil dos equipamentos. Dependendo de sua aplicação também pode exercer funções de refrigeração e limpeza das partes móveis, transmissão de força mecânica, vedação, isolamento, proteção do conjunto ou de componentes específicos e até a transferência de determinadas características físico-químicas a outros produtos (APROMAC, 2009).

Além do óleo básico produzido a partir do petróleo, são colocados aditivos, muitos deles metálicos. Estes aditivos são incorporados ao óleo com o objetivo de melhorar sua cor, viscosidade, ponto de fluidez, capacidade antidesgaste, propriedades anticorrosivas e antioxidativas (EKANEM; LORI; THOMAS, 1997; BORIN; POPPI, 2004). Além de serem adicionados, os metais também podem ser incorporados através do desgaste de componentes mecânicos. O desgaste de componentes mecânicos é produto da deterioração por fricção ou por corrosão e está diretamente relacionado à composição da maquinaria. (BROWN, 1982). É importante ressaltar que nas aplicações automotivas os níveis de aditivação, de contaminação e de degradação do óleo básico são bem mais elevados do que nas aplicações industriais (RAMOS, 2001).

Os óleos lubrificantes estão entre os poucos derivados de petróleo que não são totalmente consumidos durante o uso (RAMOS, 2001) produzindo, portanto, um resíduo final. De acordo com Ramos (2001) esse resíduo final produzido a partir do consumo do óleo lubrificante não é biodegradável e pode ocasionar sérios problemas ambientais se não for descartado de maneira adequada. Após o período de uso recomendado, a deterioração parcial,

forma compostos oxigenados (ácidos orgânicos e cetonas), compostos aromáticos polinucleares de elevada viscosidade (e potencialmente carcinogênicos), resinas e lacas (RAMOS, 2001; <<http://www.petroquimicasul.com.br>>).

Além dos produtos de degradação do óleo básico, estão presentes no óleo usado os aditivos que foram acrescentados no processo de formulação de lubrificantes e que ainda não foram consumidos (fenóis, compostos de zinco, de cloro, de enxofre ou de fósforo), metais de desgaste dos motores e das máquinas lubrificadas (chumbo, cromo, bário, cádmio e arsênio) e contaminantes diversos (RAMOS, 2001).

Tanto o óleo lubrificante novo (ON) como o usado (OU) podem causar intoxicação na fauna aquática pelo fato de conterem em sua composição compostos tóxicos, tais como os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etileno e xileno (BTEX) e poliaromáticos (HPAs), metais, além de outros. O óleo ainda pode agir obstruindo fisicamente os tecidos, causando asfixia e danos subletais, por impregnar na pele, nas brânquias ou em outras partes vitais (BRASIL, 2006).

Além destes danos diretos da contaminação dos óleos lubrificantes automotivos, há também problemas indiretos. A presença de óleos no ambiente diminui a área de contato entre a superfície da água e o ar atmosférico devido à formação de uma película impermeável, impedindo dessa forma, a transferência de oxigênio da atmosfera para a água (BRASIL, 2006). Isso pode provocar asfixia dos animais, além de impossibilitar a realização da fotossíntese pelo fato da luz entrar com maior dificuldade pela presença da camada de óleo na superfície (PEREIRA, 2004).

Em águas paradas, o óleo tende a empoeçar, permanecendo no ambiente por um longo período. Por outro lado, nos rios e córregos, onde a movimentação da água é maior, o óleo tende a se acumular nas raízes dos vegetais aquáticos e daqueles que crescem nas margens, interagindo de certa forma com os sedimentos ali encontrados. Dessa maneira, o óleo pode

afetar os organismos que vivem naquele determinado ambiente ou que se alimentam destes sedimentos e plantas, como por exemplo, os peixes (USEPA, 1999).

Por todos os problemas decorrentes da contaminação do óleo lubrificante, a norma da ABNT (NBR1004) classifica o óleo lubrificante usado como um resíduo perigoso (classe I). Consideram-se resíduos perigosos ou Classe I “[...] resíduos sólidos ou mistura de resíduos que, em função de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade e patogenicidade, podem apresentar risco à saúde pública [...]” (ROCCA, 1993).

Apesar de ser um resíduo, o óleo lubrificante usado, ou também chamado de contaminado, não pode ser descartado de qualquer maneira. O óleo lubrificante básico — a matéria-prima nobre que serve como base para produzir lubrificantes novos — existe apenas em pequena quantidade no petróleo e grande parte do que o país necessita para seu consumo acaba tendo que ser importada. Por este motivo, no Brasil e em vários outros países, o destino destes óleos é o rerrefino. O rerrefino restabelece as condições do óleo lubrificante básico, cuja qualidade é tão boa quanto o composto básico produzido no primeiro refino. Os óleos rerrefinados voltam ao mercado gerando empregos, economizando divisas e evitando o aumento da poluição ambiental (APROMAC, 2005).

Pela capacidade de recuperação da matéria-prima nobre e pela minimização da geração de resíduos o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) regulamentou a questão dos óleos lubrificantes usados por meio da Resolução N° 362, de 23 de junho de 2005. Na resolução estabeleceu-se no Art. 5º, que tanto o produtor quanto o revendedor de óleo lubrificante, bem como o gerador do óleo lubrificante usado, são responsáveis pelo seu recolhimento, tendo como destino obrigatório o encaminhamento para o rerrefino.

Na literatura ainda são poucos os estudos sobre a ação tóxica de óleos lubrificantes automotivos em organismos aquáticos (BIEGER; HELLOU; ABRAJANO, 1996; MARIGÓMEZ; BAYBAY-VILLACORTA, 2003). É de se esperar que estes óleos sejam

fontes de grande contaminação do ambiente aquático, principalmente naqueles recursos hídricos próximos a áreas urbanas. Considerando que grande parte da frota de automóveis das cidades não é submetida a revisões e manutenções periódicas, é bastante comum o vazamento destes óleos para o ambiente. Tais óleos podem ser posteriormente carregados pelas chuvas inserindo-se nos ambientes aquáticos e causando efeitos prejudiciais à biota.

Os poucos estudos existentes na literatura sobre os efeitos danosos de óleos lubrificantes em animais aquáticos são referentes a óleos novos (CANCIO; ORBEA; VÖLKL, 1998; MARIGÓMEZ; BAYBAY-VILLACORTA, 2003). Até onde sabemos, não existe nenhum relato sobre os efeitos em organismos aquáticos expostos a óleos lubrificantes usados após vários quilômetros rodados em um automóvel. Geralmente, na medida em que o óleo é queimado sua viscosidade diminui, facilitando vazamentos em motores danificados. Assim, os maiores casos de despejo destes compostos no ambiente se dá através do óleo já usado, e não do novo, o que indica uma necessidade de se estudar mais profundamente os efeitos dessas substâncias em animais expostos.

2.2. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Segundo o CONAMA, óleos lubrificantes são classificados como tóxicos, potencialmente carcinogênicos, devido principalmente à presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos em sua estrutura molecular, apresentando forte caráter lipofílico (ŠIMKO, 2005) (Figura 1). Estes hidrocarbonetos são resultados da combustão incompleta de materiais orgânicos, principalmente de derivados do petróleo, alcatrão, madeira e carvão (AN; SHIN; CHOI, 2008).

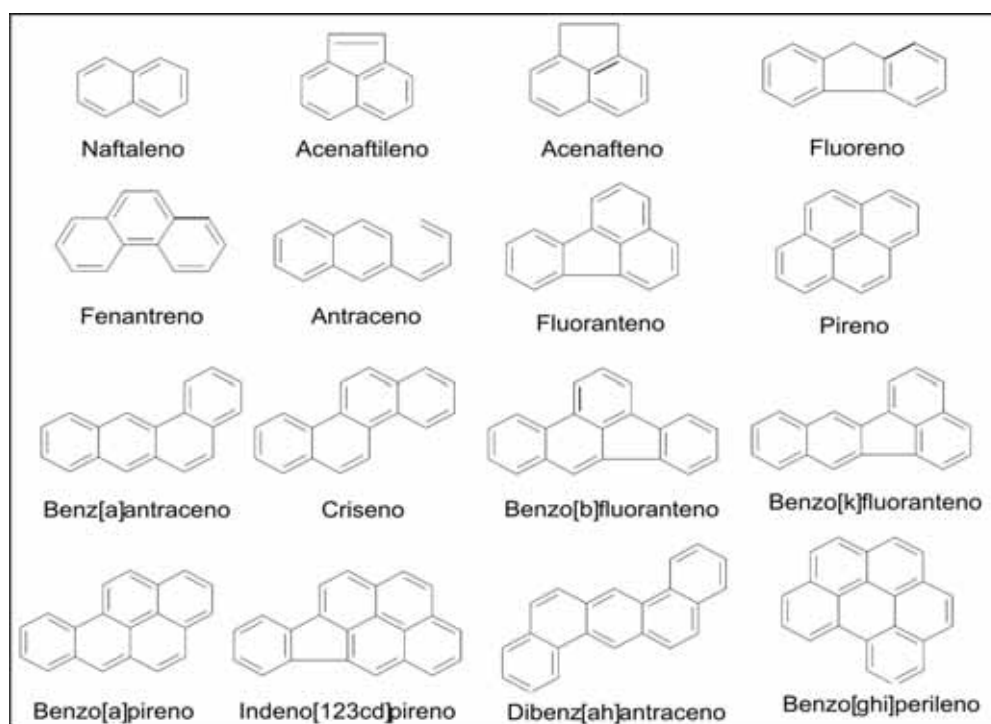


Figura 1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Nesta figura estão os 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1987).

HPAs são altamente lipossolúveis e rapidamente absorvidos pelos pulmões, intestinos e pela pele de animais experimentais, independente da rota de administração. Níveis detectáveis de HPAs podem ser observados em muitos órgãos internos de minutos a horas

após a administração. Os maiores níveis são encontrados geralmente no fígado (IARC 1983, FOTH; KAHL; KAHL, 1988).

A grande maioria dos organismos aquáticos é capaz de metabolizar de forma eficiente estes compostos. Entretanto, durante este processo de metabolização podem ser formadas espécies reativas do oxigênio (ERO), que atacam biomoléculas podendo causar diversos tipos de lesões oxidativas. Além disso, alguns metabólitos formados durante a biotransformação podem ser metabolicamente ativados e, desta maneira, tornam-se reativos a grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares. As principais macromoléculas afetadas são lipídios presentes na membrana plasmática e o DNA. No caso do DNA, quando há ligação covalente destes compostos ocorre a formação de adutos que, presumivelmente, inicia processos de mutagênese e carcinogênese (XUE; WARSHAWSKY, 2005).

Por estes motivos, os HPAs foram classificados pela Agência Norte Americana de Proteção ao Meio Ambiente (EPA) como poluentes prioritários que representam uma ameaça à saúde e a integridade do homem e dos ecossistemas aquáticos (MILLER; RAMOS, 2001). A biotransformação dos HPAs abrange uma série de reações de oxidação, redução, hidrólise e de conjugação que são realizadas principalmente no fígado por enzimas do sistema de monooxigenases de função mista da superfamília dos citocromos P450 (KLAASSEN; DOULL; AMDUR, 1996). Este tipo de transformação tem como objetivo biológico fazer com que um determinado metabólito seja mais hidrofílico que o seu precursor, e com isso facilitar a excreção através dos fluidos biológicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Os efeitos da contaminação por HPAs podem ser avaliados por meio de análises de biomarcadores, em organismos considerados bons bioindicadores de qualidade ambiental, tais como os peixes. Estes organismos são amplamente estudados por terem presença ubíqua nos ambientes aquáticos, nível trófico apropriado, além de importância econômica e ecológica.

2.3. ORGANISMO-TESTE E BIOMARCADORES

Na avaliação do impacto de substâncias potencialmente tóxicas em sistemas aquáticos, as análises químicas são muito importantes. Entretanto, muitas vezes são limitadas e insuficientes para a real compreensão dos processos e interações do meio com a biota. Para suprir estas limitações os testes ecotoxicológicos podem ser utilizados como instrumento de predição (ESPÍNDOLA; BRIGANTE; DORNFELD, 2003), antecipação e diagnóstico de possíveis impactos causados pelos compostos tóxicos (CALOW, 1993), bem como para classificação, regulação e mapeamento da contaminação (CAIRNS; NIEDERLEHNER; BIDWELL, 1998).

Estes testes de toxicidade são ensaios laboratoriais realizados sob condições experimentais específicas e controladas. Neles são utilizadas amostras ambientais ou misturas complexas para estimar a toxicidade de substâncias. Nestes ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de uma determinada substância, sendo os efeitos tóxicos produzidos sobre eles observados e quantificados (RIBO, 1997; RONCO; BÁEZ; GRANADOS, 2004).

De acordo com Alves-Costa (2001), a espécie *O. niloticus*, conhecida popularmente como tilápia-do-Nilo, é um excelente organismo-teste para ensaios laboratoriais realizados para a investigação de substâncias potencialmente tóxicas nos ecossistemas aquáticos. Isto se deve ao fato desta espécie ser amplamente distribuída e capaz de responder rapidamente às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

Alarmes sobre os efeitos de várias substâncias tóxicas em diferentes espécies e populações de peixes geralmente são veiculados depois da morte dos animais. Porém a morte de um organismo é um critério muito extremo para determinar se uma substância é danosa ou não para a biota aquática e, infelizmente, não tem qualquer caráter preventivo. Inversamente,

além da proteção de espécies visando a conservação da biodiversidade, é ecologicamente mais saudável, mesmo para o homem, medir os efeitos subletais de poluentes sobre a biota.

A sensibilidade dos organismos a diferentes substâncias tóxicas é critério fundamental na escolha de bioindicadores de poluição (LEWIS, 1995). Algumas espécies são particularmente sensíveis à poluição (bioindicadoras de resposta), enquanto outras, as bioindicadoras de acumulação, podem acumular poluentes em concentrações elevadas, sem apresentarem sintomas visíveis (SILVA et al., 2000). Isso se deve ao fato dos organismos possuírem diferentes histórias evolutivas que podem acarretar em diferentes graus de sensibilidade ao estresse induzido por contaminantes. Por isso o efeito tóxico destes compostos químicos deve ser avaliado em diferentes espécies de peixes para um melhor entendimento dos mecanismos de defesa.

Por este motivo, quando trabalhamos com compostos potencialmente tóxicos, devemos dar preferência ao estudo de níveis de organização mais simples, pois estes possuem uma resposta mais rápida à perturbação, com menor interferência e maior capacidade de previsibilidade, tais como células e enzimas de biotransformação. A detectabilidade e a resposta são prejudicadas ao se estudar níveis de organização de elevada complexidade biológica, devido à grande interferência de fatores externos (MOORE et al., 2004) (Figura 2).

Atualmente uma das principais ferramentas desenvolvidas para se analisar as respostas dos organismos a contaminantes são os biomarcadores. De acordo com Huggett e colaboradores (1992), biomarcadores refletem o *status* saudável de organismos nos níveis mais baixos de organização (molecular ou celular) e apresentam rápida resposta ao estresse e alta importância toxicológica. Eles podem ser utilizados como indicadores precoces de alterações no ecossistema antes da ocorrência de danos irreversíveis (WALKER et al., 1996).

Entre os principais parâmetros utilizados como biomarcadores estão: enzimas e produtos de biotransformação; parâmetros de estresse oxidativo; metalotioneínas; parâmetros

hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, fisiológicos, morfológicos e de genotoxicidade (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

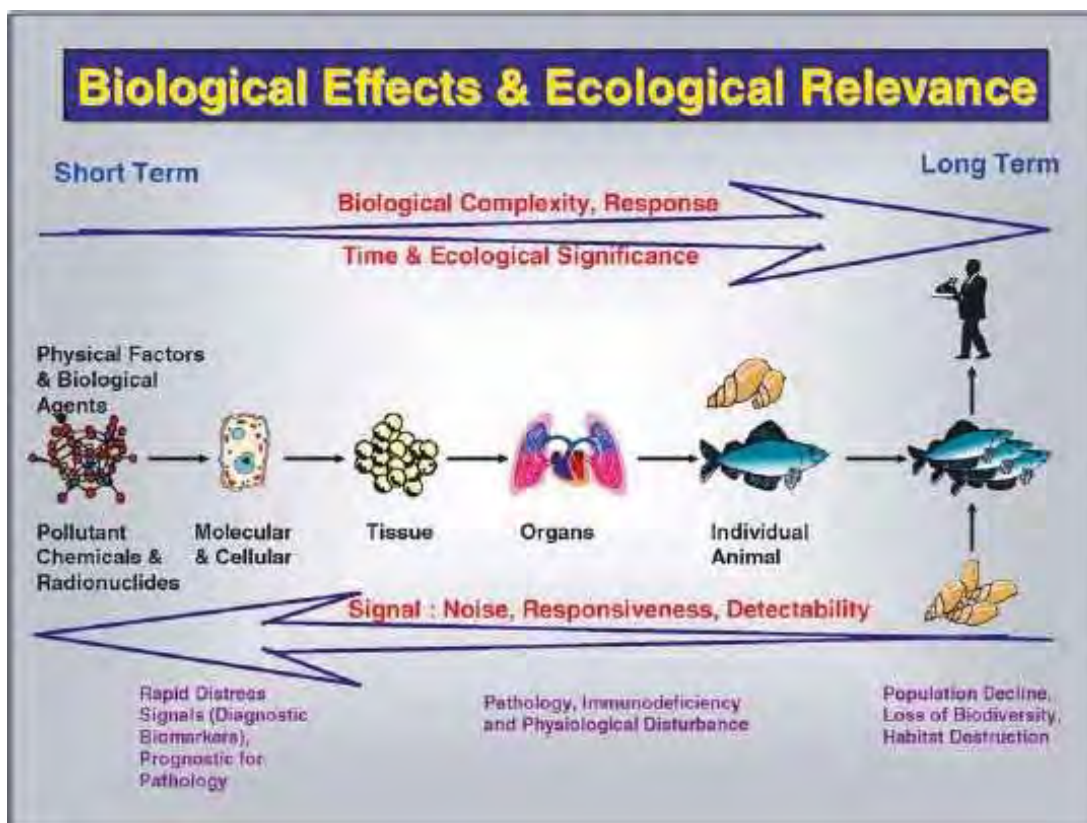


Figura 2. Representação esquemática da sequência de ordem de respostas à poluição dentro de um sistema biológico. Ao se estudar níveis de organização de elevada complexidade biológica, a detectabilidade e a resposta são prejudicadas devido à grande interferência por fatores externos, enquanto que agentes biológicos mais simples possuem uma rápida resposta à perturbação (biomarcadores), com menor interferência e com capacidade de previsibilidade, o que é fundamental para estudos ecotoxicológicos (Adaptado de MOORE et al., 2004).

Estudar o potencial tóxico de determinados contaminantes ajuda na identificação dos fatores que causam estresse nas espécies de peixes, bem como o reconhecimento e a padronização de biomarcadores das consequências deste estresse (DAGGETT et al., 1998). Os estudos das alterações na fisiologia das espécies geram conhecimentos necessários para entender como os efeitos negativos de substâncias tóxicas que interferem no seu metabolismo.

2.4. EFEITOS DE POLUENTES

2.4.1. BIOTRANSFORMAÇÃO

Para assegurar a sobrevivência frente a todos os potenciais efeitos causados por substâncias nocivas, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa para proteção de suas células. Os mecanismos de defesa utilizados incluem bombas de efluxo ou seqüestro de drogas, sistemas de reparo dos sítios alvos destas substâncias e a transformação metabólica (biotransformação). A biotransformação dos compostos químicos nos organismos é essencial para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar a interação entre o elemento químico e a célula (DI GIULIO et al., 1995), podendo desta maneira eliminar o composto mais facilmente.

Uma vez absorvidos, os organismos possuem duas formas para eliminar um composto. Ele pode ser excretado na sua forma original ou biotransformado pelo organismo. O fígado é o órgão que se encontra mais ativamente envolvido no processo de biotransformação de compostos estranhos ao organismo, devido a sua função, posição e circulação sanguínea. No entanto, existem outros órgãos com capacidade biotransformadora, tais como o rim, as brânquias e o intestino, embora com menor capacidade que a do fígado (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A biotransformação pode ser subdividida em duas fases: fase I, fase II (Figura 3). Na fase I os compostos são oxidados por um sistema de mono-oxigenases, também designadas por oxidases multi-funções (MFOs), que geralmente estão associadas ao complexo citocromo P450. Os citocromos P450 são hemoproteínas presentes na membrana, predominantemente, do retículo endoplasmático do fígado (STEGEMAN et al., 1992; BUCHELI; FENT, 1995), porém, apresentam atividade significativa em diversos outros órgãos.

Na fase II ocorrem reações enzimáticas sintéticas de conjugação, facilitando, portanto, a excreção dos compostos através da adição de grupos mais polares e reconhecíveis por

proteínas transportadoras de membrana, podendo, por isso, desempenhar um importante papel não só na manutenção da homeostasia como também na desintoxicação e eliminação de muitos compostos (COMMANDEUR; STIJNTJES; VERMEULEN, 1995; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

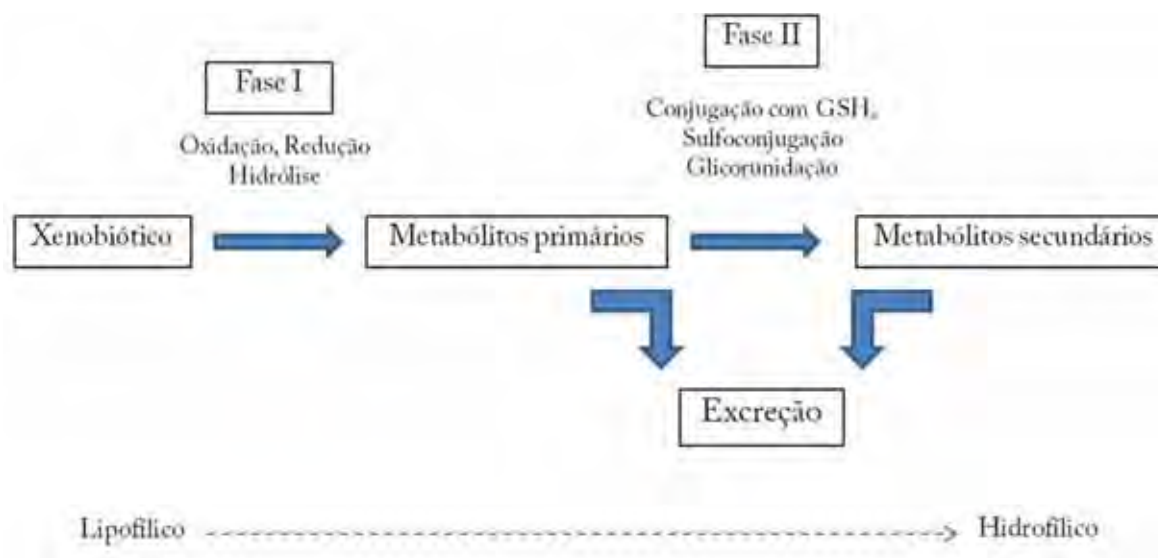


Figura 3. Esquema do processo de biotransformação de xenobióticos.

A classe de enzimas que se destaca na fase II é a das glutathione S-transferases (GST). Estas enzimas são responsáveis por catalisar reações de conjugação da glutathione (GSH), com uma variedade de compostos eletrofílicos, envolvendo a detoxificação de intermediários reativos e radicais de oxigênio (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Esta reação de conjugação acaba formando produtos mais solúveis e, portanto, mais fáceis de serem excretados pelo organismo (FITZPATRICK et al., 1997).

É importante ressaltar que a biotransformação também pode alterar a toxicidade de um composto, o que pode ser benéfico ou prejudicial para o organismo. Caso haja uma reação de desintoxicação, a toxicidade do composto é reduzida enquanto a excreção é geralmente elevada. No caso de haver bioativação o composto é transformado num metabólito reativo que é mais tóxico que o composto original. Os efeitos tóxicos podem se manifestar quando o

composto original ou os seus metabólitos se ligam a macromoléculas celulares. Em última instância, este processo levar a ruptura membrana, lesão celular e/ou efeitos genotóxicos que, por sua vez, podem levar ao desenvolvimento e progressão de doenças, tais como o câncer (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

2.4.2. ESTRESSE OXIDATIVO

O desequilíbrio entre a produção de ERO e o sistema antioxidante endógeno é um fator que pode causar uma série de mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Trabalhos relatam que a exposição a derivados de petróleo induzem a produção de ERO (ACHUBA; OSAKWE, 2003; LÓPEZ-BAREA, 2000). Estas ERO podem reagir com biomoléculas como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. A peroxidação lipídica e a inativação de enzimas são resultados observados do dano oxidativo (ZHANG et al., 2004).

Rattner e Heath (2002) mostraram uma maior toxicidade de xenobióticos quando animais aquáticos se encontravam em estado de hipóxia. Provavelmente essa maior toxicidade do xenobiótico em estados de hipóxia deva-se a uma maior captação do tóxico pelo peixe, causada pelo esforço de alcançar uma maior absorção de oxigênio. Como o número de substâncias químicas testadas é muito pequeno, os dados sobre efeitos subletais são raros, não permitindo generalizações. Em geral, peixes mostram maior resistência aos estados de hipóxia e até anóxia em águas de temperaturas mais baixas devido a maior solubilidade do oxigênio. Em clima tropical, onde a temperatura da água é quase sempre elevada, o metabolismo dos animais é maior e não é certo o grau de toxicidade dos poluentes sobre a biota, daí a importância deste estudo nas nossas condições ambientais.

Certas respostas fisiopatológicas a algumas concentrações elevadas de poluentes são idênticas àsquelas de algumas espécies de peixes em hipóxia, condição em que a quantidade de oxigênio dissolvido é baixa, ou mesmo em anóxia, quando a concentração de oxigênio chega próxima à zero (VIG; NEMSCOK, 1989). Isso porque peixes além de produzirem espécies reativas de oxigênio (ERO) em várias reações metabólicas, também sofrem processos de estresse oxidativo quando passam por períodos de hipóxia (LENÁRTOVÁ et al., 1997).

ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de 2 H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$) e hidroxila ($\cdot OH$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) (Figura 4).

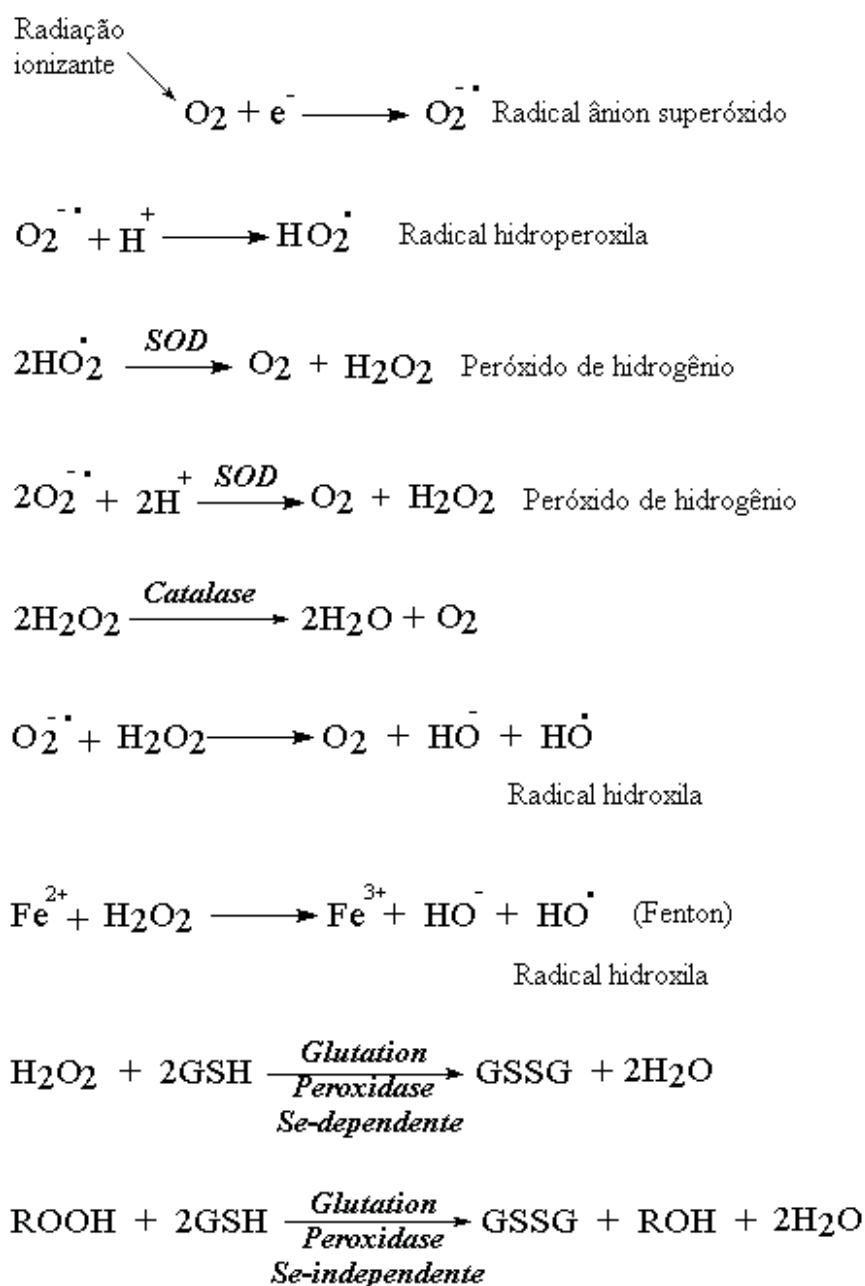


Figura 4. Reações de síntese e de degradação de algumas ERO.

A formação de ERO também pode ocorrer durante a biotransformação de xenobióticos. Elas são formadas principalmente como subprodutos da ação do complexo multienzimático P450, de diversas monooxigenases e de reações de ciclo-redox (SOLÉ; PORTE; ALBAIGES, 1995).

Para proteger contra os efeitos deletérios das ERO, as células possuem sistemas de defesa antioxidantes tais como as enzimas superóxido dismutase (SOD), que reduz o $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 e O_2 , as enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que detoxificam H_2O_2 , e enzimas complementares como a glicose 6-fosfato-desidrogenase (G6PDH, regenera NADPH a partir de elétrons da glicose 6-fosfato) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Estas enzimas antioxidantes muitas vezes podem ser induzidas ou inibidas por determinadas substâncias tóxicas.

Conforme exposto acima, fica claro que os derivados de petróleo podem promover alterações significativas em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de peixes e que estas alterações podem ser utilizadas como biomarcadores na análise e monitoramento da qualidade da água de locais impactados por estes contaminantes. Entretanto, poucas pesquisas têm sido realizadas sobre o efeito de contaminantes em espécies neotropicais e muito pouco é conhecido sobre a sensibilidade destas espécies aos contaminantes potencialmente presentes nos ecossistemas aquáticos tropicais (MARTINEZ et al., 2004, ALMEIDA; MELETTI; MARTINEZ, 2005).

Tendo em vista que estudos sobre os efeitos tóxicos do óleo lubrificante novo e usado são escassos mesmo sendo classificado como um produto perigoso (Classe I), a abordagem proposta para este trabalho, certamente, trará uma contribuição sobre os potenciais riscos, pelo uso inadequado do óleo lubrificante, nas várias atividades em que este produto está envolvido. Além disso, os dados gerados a partir deste tipo de pesquisa podem ser de grande importância para o biomonitoramento em ambientes de água doce.

3. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo principal comparar o efeito do óleo lubrificante novo e usado em tilápias-do-Nilo (*O. niloticus*) após exposição controlada a duas concentrações diferentes de cada tipo de óleo.

A hipótese de nosso trabalho é a de que o óleo lubrificante usado pode produzir mais efeitos subletais nos peixes em comparação ao lubrificante novo, o que foi avaliado por meio da análise de mudanças em parâmetros bioquímicos em relação a animais controles não expostos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar o nível de estresse oxidativo da espécie *O. niloticus* frente à exposição ao óleo lubrificante novo e o usado em diferentes concentrações e tempo de exposição utilizando como parâmetros as enzimas GPx, SOD, CAT, G6PDH.
2. Verificar em qual tecido o estresse oxidativo é mais evidente: no fígado ou nas brânquias.
3. Comparar o nível de peroxidação lipídica frente à exposição ao óleo lubrificante novo e usado em diferentes concentrações e tempo de exposição.
4. Comparar a atividade das enzimas de biotransformação (EROD e GST) *in vivo* na espécie *O. niloticus* frente à exposição ao ON e ao OU em diferentes concentrações e tempo de exposição.
5. Analisar o comportamento da EROD *in vitro* frente a concentrações crescentes de ON e OU.
6. Comparar as alterações ocorridas nos peixes em 3 e 7 dias de exposição.
7. Analisar em qual concentração os contaminantes causam maiores prejuízos aos animais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais usados nos experimentos desse trabalho foram obtidos nos tanques da UNESP de São José do Rio Preto – IBILCE. O tamanho padrão determinado foi o de 15 cm, todos com peso aproximado de 100g (Figura 5 e Tabela 1).

Tabela 1. Médias dos pesos e tamanhos dos indivíduos utilizados no experimento.

GRUPO EXPERIMENTAL	PESO (G)	TAMANHO (CM)
Controle	122,30 ± 42,50	16,25 ± 1,99
Tratamento ON [0,01]	99,83 ± 25,95	15 ± 1,38
Tratamento ON [0,1]	102,70 ± 24,50	15,16 ± 1,47
Tratamento OU [0,01]	101,97 ± 20,54	15,25 ± 0,93
Tratamento ON [0,1]	102,70 ± 24,50	15,16 ± 1,47

Nota: Dados expressos em média ± desvio padrão.



Figura 5. Tamanho médio dos espécimes de *O. niloticus*.

4.2. ÓLEO LUBRIFICANTE

O óleo lubrificante mineral utilizado no experimento de exposição foi o MOTOR OIL SAE 15W40 – CG4 da marca SCANIA® (Tabela 2). O desenvolvimento dos aditivos melhoradores de índice de viscosidade possibilitou a fabricação dos óleos de múltipla graduação. Esses óleos também chamados de multiviscosos ou multigrados, como o SAE 5W30 e SAE 15W40, são largamente usados porque são fluidos o bastante em baixas temperaturas e suficientemente espessos a altas temperaturas, para terem um desempenho satisfatório (<http://www.orbiquimica.com.br/arquivos/boletim/36_30.pdf>) (Tabela 3). O óleo usado foi da mesma marca, coletado após 15 mil km rodados em caminhão.

Tabela 2. Especificações do produto utilizado para exposição dos animais.

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
COR	Óleo límpido viscoso âmbar
ODOR	Característico de óleo mineral
DENSIDADE	0,866 – 0,871
SOLUBILIDADE	Insolúvel em água e miscível em hidrocarbonetos
COMPOSIÇÃO	Óleo derivado de petróleo, aditivos anticorrosivos, antidesgaste, antioxidante, dispersante, detergente e antiespumante

Tabela 3. Classificação do óleo lubrificante multiviscoso 15W40.

SAEJ300 Janeiro 2001					
Grau de viscosidade (SAE)	Viscosidade a Baixas Temperaturas		Viscosidade a Altas Temperaturas		
	Viscosidade máxima (cP*)	Viscosidade mínima (cP*)	Viscosidade (cSt ⁺ a 100 °C)		Viscosidade (cP* a 150 °C)
			Mínimo	Máximo	
0W	6200 até -35 °C	60000 até -40 °C	3,8	-	
5W	6600 até -30 °C	60000 até -35 °C	3,8	-	
10W	7000 até -25 °C	60000 até -30 °C	4,1	-	
15W	7000 até -20 °C	60000 até -25 °C	5,6	-	
20W	9500 até -15 °C	60000 até -20 °C	5,6	-	
25W	13000 até -10 °C	60000 até -15 °C	9,3	-	
20	-	-	5,6	< 9,3	2,6
30	-	-	9,3	< 12,5	2,9
40	-	-	12,5	< 16,3	2,9
40	-	-	12,5	< 16,3	3,7
50	-	-	16,3	< 21,9	3,7
60	-	-	21,9	< 26,1	3,7

Nota: *Unidade da viscosidade dinâmica = Centipoise (cP). ⁺ Unidade da viscosidade cinemática = Centistokes (cSt).

4.3. PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO CONTROLADA DOS ANIMAIS AO ÓLEO LUBRIFICANTE

O experimento foi realizado no mês de julho de 2011, no período do inverno. Antes do início dos experimentos, os animais foram acondicionados em caixas d'água com termostatos durante uma semana, permitindo a aclimação fora dos tanques de origem. Os experimentos de exposição dos peixes aos contaminantes foram feitos em nove aquários de 50 x 40 x 60 cm, divididos em 6 compartimentos de 17 L cada, e três aquários de 17 x 20 x 20 cm (aproximadamente 17 L). Esta divisão foi necessária, pois no dia de início do experimento o vidro de um dos aquários maiores com subdivisões trincou e não pode ser usado. Entretanto,

como todos os peixes foram acondicionados em compartimentos isolados de 17 L, essa divisão não alterou as réplicas do experimento. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial e mantidos sob aeração e temperatura constantes.

O experimento continha seis animais por grupo experimental, totalizando 60 animais (Figura 6). As concentrações escolhidas de 0,01 e 0,1 mL/L foram as mesmas concentrações previamente testadas em nosso laboratório para o óleo diesel, onde não foi observada mortalidade dos animais.

Após uma semana de aclimação, os peixes foram transferidos para os aquários no período da manhã, quando eles estão menos agitados. Depois de colocados nos diferentes compartimentos foram adicionados os contaminantes, sendo constituídos 10 grupos experimentais organizados como na Figura 6 onde foram testadas as variáveis: tipo de óleo (novo e usado), concentração (0,01 e 0,1 mL/L) e período de exposição (3 e 7 dias).

Depois do período pré-estabelecido de exposição, os animais foram mortos por imersão do anestésico *2-Phenoxyethanol* (Sigma-Aldrich) à 3 mL/L de água. Após este procedimento os indivíduos foram medidos e pesados em balança analítica de precisão. Os espécimes, dentro de bandejas (Figura 7), foram posicionados em decúbito dorsal e a fim de possibilitar a secção através de incisão mediana na parede ventral, expondo os órgãos da cavidade celomática para retirada do fígado para análises bioquímicas (Figura 8). Depois da retirada do fígado, a cavidade opercular foi aberta para a retirada das brânquias (Figura 9).

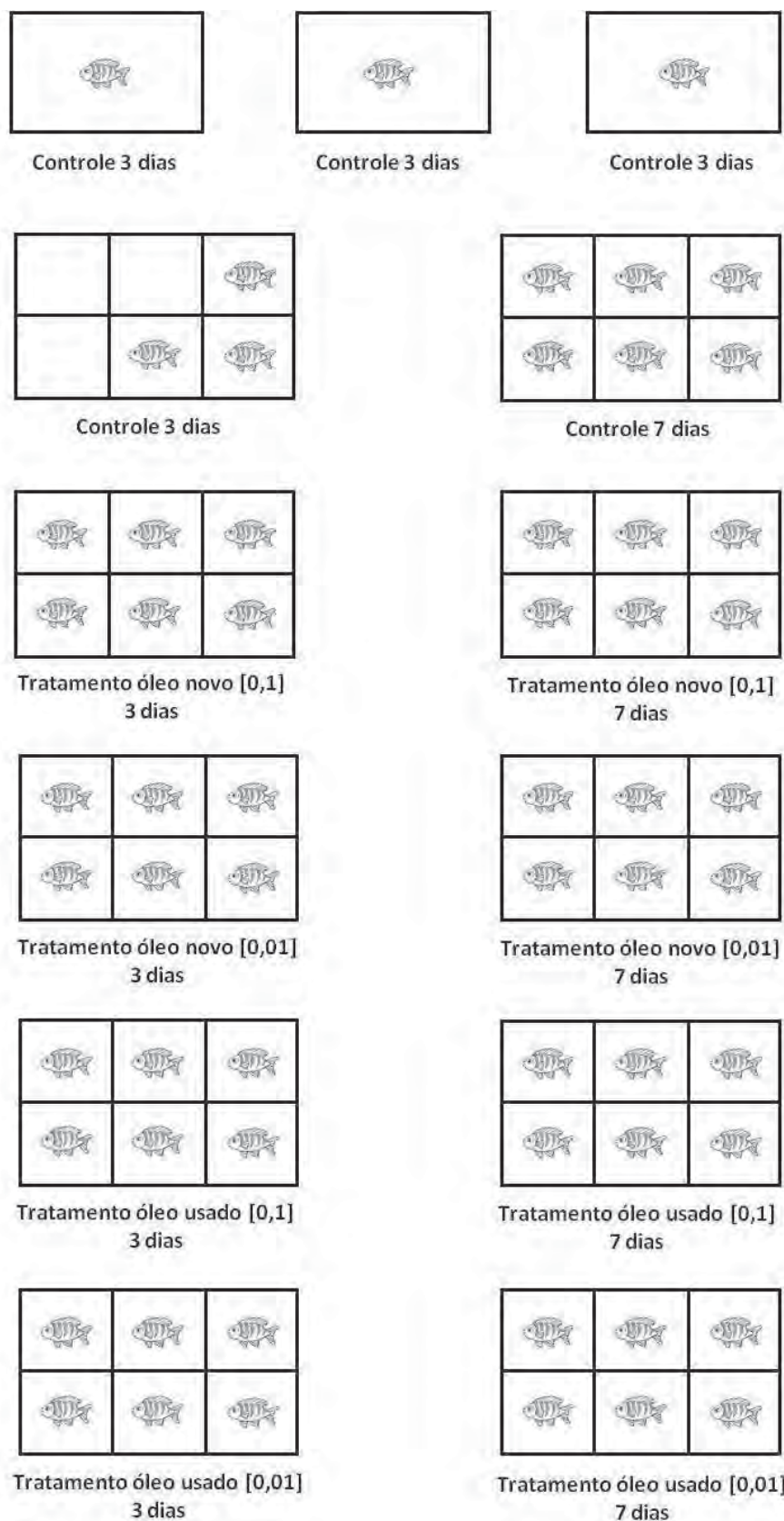


Figura 6. Delineamento experimental. Peixes colocados em aquários com seis compartimentos isolados. Três peixes foram colocados em aquários separados devido a rachaduras em um dos aquários compartimentalizados.



Figura 7. Dissecação da tilápia-do-Nilo.



Figura 8. Vísceras retiradas da cavidade celomática. Seta indicando o fígado, órgão retirado e utilizado para as análises.



Figura 9. Região opercular arrebatada mostrando o posicionamento dos arcos branquiais.

4.4. DESCARTE DE RESÍDUOS TÓXICOS E DE ÁGUA CONTAMINADA

A água contaminada dos aquários foi tratada através de filtros de carvão ativado. Este tipo de carvão retém os resíduos tóxicos evitando, portanto, o descarte inadequado no ambiente. Além disso, todos os resíduos químicos produzidos durante as análises foram devidamente armazenados em recipientes apropriados para o descarte que futuramente será dado o tratamento adequado a todos eles.

4.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os resultados estão expressos em médias $\pm$ erro padrão correspondentes a seis réplicas ($n=6$). O software STATISTICA 8.0 foi usado para efetuar a análise estatística.

Os dados experimentais foram inicialmente testados para normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade da variância (Levene), de forma a obedecer a requisitos estatísticos. No caso de dados paramétricos, o teste aplicado foi ANOVA para verificação de diferenças estatisticamente significantes entre três ou mais grupos e teste t para correlação entre dois

grupos. Em seguida foi aplicado um teste post-hoc (Tukey HSD) para verificar quais grupos apresentam diferenças significantes e quais não apresentam (ZAR, 1999).

Nos casos onde os dados foram considerados não-paramétricos aplicou-se os testes Mann-Whitney, para dois grupos amostrais e Kruskal-Wallis, para três ou mais. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

CAPÍTULO II

BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM *Oreochromis niloticus* EXPOSTOS A ÓLEO LUBRIFICANTE NOVO E USADO

1. INTRODUÇÃO

As ERO têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Entretanto, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. A situação de estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante que poderá acarretar danos celulares (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Variáveis como, idade, variações sazonais de temperatura da água e disponibilidade de oxigênio, período reprodutivo, comportamento e a presença de poluentes na água, alteram o metabolismo e consequentemente a formação de ERO. Este aumento de ERO tem como consequência alterações nos níveis de lipoperoxidação (LP) e na atividade de enzimas antioxidantes (LIVINGSTONE et al., 1990; REGOLI, 2000; VIDAL; BASSERES; NARBONNE, 2002).

As ERO são, devido a sua alta reatividade, potencialmente tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (NORDBERG; ÁRNER, 2001). Elas podem reagir com diferentes alvos celulares originando lesões oxidativas às macromoléculas (ALMEIDA et al., 2003), como o DNA, lipídeos e proteínas. Entretanto, em alguns casos, o estresse oxidativo moderado pode regular positivamente as defesas, de modo a proteger as células de danos subsequentes mais severos (SALO; DONOVAN; DAVIES, 1991).

As enzimas antioxidantes compõem a principal linha de defesa aos componentes oxidantes do sistema, impedindo o ataque às macromoléculas e a perda da integridade celular. Dentre as enzimas antioxidantes temos a CAT, GPx e a SOD. A enzima SOD catalisa a dismutação do O_2^- , formando assim peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular. A CAT e a GPx desempenham importante papel na eliminação de H_2O_2 . O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes e a produção de ERO é importante para a manutenção da

integridade celular, pois de maneira conjunta, a SOD, CAT e GPx reduzem o acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , e consequentemente o dano celular (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004) (Figura 10).

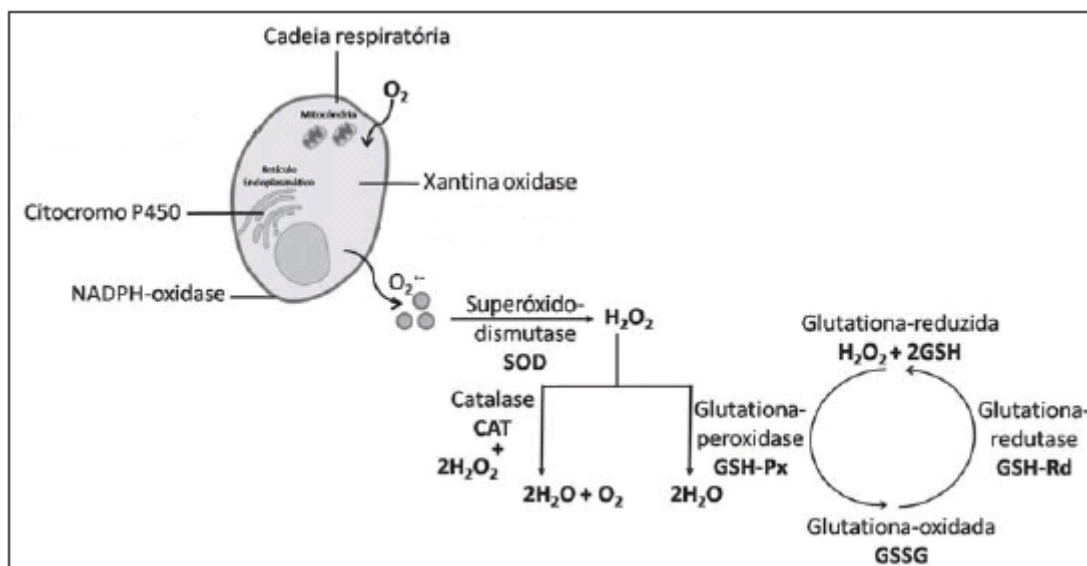


Figura 10. Representação esquemática do sistema oxidante e antioxidante da célula (Adaptado de FORTUÑO et al., 2005; RAY; SHAH, 2005).

Sabe-se que muitas classes de poluentes podem atuar no aumento da formação intracelular de ERO (MAESTRO, 1980; WINSTON; DI GIULIO, 1991). Organismos expostos a ecossistemas poluídos podem revelar indução ou inibição de suas defesas antioxidantes. Variações nos componentes desse sistema de defesa antioxidante e presença de danos aos tecidos têm sido propostos como biomarcadores de poluição em organismos aquáticos tais como moluscos e peixes (DI GIULIO et. al, 1989; LIVINGSTONE et. al, 1990).

O processo de LP é considerado a principal causa de injúria e morte celular, e muitas condições patológicas estão diretamente associadas a esse processo. Basicamente, a LP consiste em uma reação em cadeia, na maioria dos casos catalisada por metais de transição, na qual oxidantes fortes causam a quebra dos fosfolipídios de membrana que contém ácidos graxos polinsaturados. Os danos da LP para as membranas biológicas podem ser de vários

níveis de severidade, dependendo da natureza e concentração do oxidante, variando desde reduções localizadas na fluidez da membrana até a ruptura total da integridade da bicamada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Além disso, os hidroperóxidos resultantes da peroxidação são instáveis e se decompõem em misturas complexas de aldeídos, cetonas, alcanos e ácidos carboxílicos que podem formar adutos com o DNA.

Muitos estudos têm demonstrado o aumento da LP em vários tecidos de peixes expostos a diversos tipos de contaminantes. Exemplos incluem carpas expostas ao agrotóxico *Paraquat* e bagres expostos a sedimento contaminado com HPA, dentre outros (STEGEMAN et al., 1992).

Como dito anteriormente, o petróleo é uma mistura de compostos orgânicos, principalmente hidrocarbonetos, com toxicidade variada aos organismos aquáticos. Estudos revelam que a exposição de peixes ao petróleo causa mudanças nos seus parâmetros moleculares, bioquímicos, fisiológicos e comportamentais. O óleo lubrificante, sendo um derivado do petróleo, possui muitas características semelhantes. Verificar quais são os possíveis efeitos tóxicos do óleo lubrificante é importante para a definição de biomarcadores sensíveis a exposição a esse contaminante.

O sistema de defesa antioxidante está sendo cada vez mais estudado devido ao seu potencial em fornecer respostas em baixos níveis de organização biológica. Estas respostas podem ser utilizadas como ferramentas em programas de monitoramento ambiental pelo fato da facilidade das análises e baixo custo (WINSTON; DI GIULIO, 1991; ORUÇ et al., 2004). Já que os peixes respondem à exposição a poluentes alterando ou adaptando suas funções metabólicas (BEBE; PANEMANGALORE, 2003), neste estudo, foram investigados parâmetros relacionados ao estresse oxidativo como biomarcadores à mistura complexa que compõem tanto o óleo lubrificante novo como o usado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para determinar o grau de estresse oxidativo causado pelo óleo novo e usado nos peixes, os tecidos (brânquia e fígado) retirados dos animais como descrito no item 4.3 do Capítulo I foram colocados em tubos de *ependorf* e preservados a -80°C . No momento da análise as amostras foram descongeladas em gelo, homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, sacarose 0,5 M; pH 7,4, contendo inibidores de protease (PMSF) e centrifugado a $10.000 \times g$ por 30 minutos. A fração sobrenadante foi então coletada e centrifugada novamente a $50.000 \times g$ por uma hora, de forma a obtermos assim as frações citosólica e microsomal. Para as análises das enzimas antioxidantes realizadas foi utilizada apenas a fração citosólica.

2.2. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Fragmentos de fígado e brânquias foram homogeneizados (1:3, massa:volume) em tampão TRIS-HCl, 0,1M, pH 8,0. Em seguida, foram adicionados 300 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2M. As amostras foram incubadas por 40 minutos a 90°C em um aquecedor tipo *dry block*. Após este período, as amostras de malondialdeído (MDA) e TBA foram extraídas com 1 mL de n-butanol e então centrifugadas a $3.600 \times g$ por cinco minutos. Posteriormente é retirada a porção sobrenadante que foi analisada no HPLC.

2.3. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

2.3.1. SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da SOD foi medida pelo método de McCord e Fridovich (1969), utilizando um sistema de geração de radical ânion superóxido (xantina/xantina oxidase)

acoplado à redução do citocromo c pelo radical ânion superóxido, provocando aumento de absorbância em 550 nm em 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 pelo superóxido.

2.3.2. CATALASE

A atividade da CAT foi medida através do método de Beutler (1975). Este método é baseado na quantificação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, através do decréscimo de absorbância em 240 nm, em temperatura ambiente.

2.3.3. GLUTATIONA PEROXIDASE

A medida da GPx foi feita pela técnica descrita por Sies; Koch e Martino (1979). Este método baseia-se na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm, promovido durante a redução da GSSG, catalisada por GR, em presença de NADPH, em temperatura ambiente, que é proporcional ao consumo de GSH pela GPx, na oxidação do substrato t-butil-hidroperóxido.

2.3.4. GLICOSE-6-FOSFATO-DESIDROGENASE

A atividade da G6PDH do tecido hepático foi determinada pelo aumento de absorbância provocado pela redução de NADP⁺ a NADPH à custa de glicose-6-fosfato em 340 nm, de acordo com o método de Glock e McLean (1953).

2.3.5. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A técnica para se avaliar os níveis de peroxidação lipídica nos tecidos foi a detecção por HPLC-UV/Vis em 532 nm do produto formado entre o MDA (produto da lipoperoxidação) e o ácido 2-tiobarbitúrico (ALMEIDA et al., 2004). A fase móvel foi composta por solução fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% metanol,

bombeada isocraticamente (1 mL/min). A coluna utilizada foi uma LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de poro). A quantificação do MDA se deu por comparação das áreas dos picos das amostras no cromatograma com as áreas dos picos de uma curva padrão previamente injetada no HPLC de padrões autênticos de MDA reagido com o TBA.

2.3.6. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para medir a quantidade de proteína de todas as amostras, o método foi o utilizado por Bradford (1976), com curva padrão de soro albumina bovina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da SOD foi medida apenas no fígado por falta de tecido branquial para a realização desta análise. Os resultados obtidos a partir da análise da SOD hepática não mostraram diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos tratamentos em relação aos grupos controle nos dois períodos de exposição testados (Figura 11 e Tabela 4).

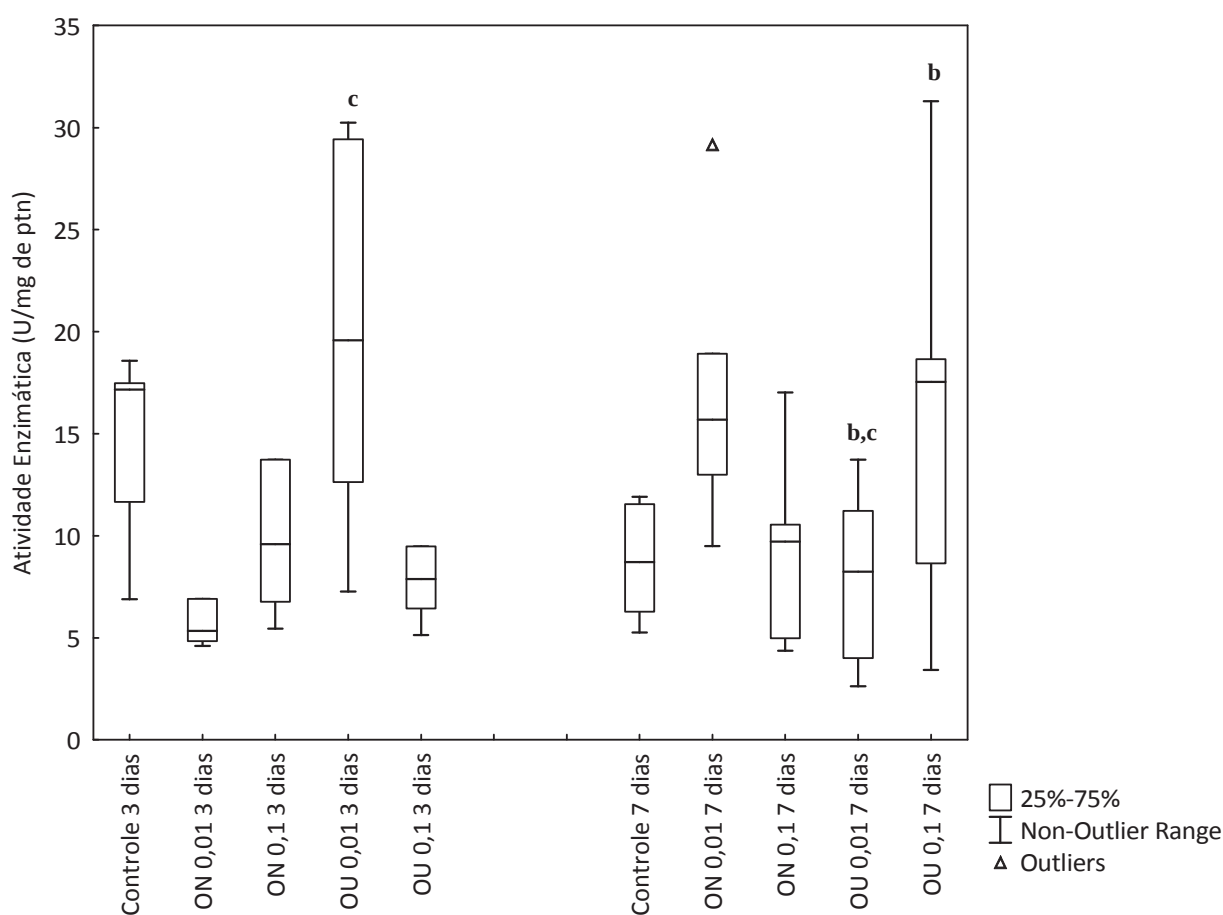


Figura 11. Gráfico da atividade da SOD no fígado de *O. niloticus* controle e expostas (T) por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.

Tabela 4. Análise de variância da atividade enzimática da SOD no fígado de *O. niloticus* através de aplicação de teste não-paramétrico (Kruskall-Wallis).

SOD			
EFEITO	H	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	8,227	4	0,083
ATIVIDADE EM 7 DIAS	8,136	4	0,086

Foi observada uma redução estatisticamente significativa da atividade da SOD do tratamento de três dias de exposição à concentração de 0,01 mL/L de OU para o mesmo tratamento, porém com os animais expostos por sete dias (Tabela 5). Se compararmos os grupos controles de três e sete dias podemos notar que a atividade enzimática da SOD também sofreu uma redução do menor para o maior tempo de exposição. Este fato pode explicar a redução do grupo tratado com a concentração de 0,01 mL/L de OU, uma vez que ele acompanha a tendência de redução da atividade da SOD ocorrida nos animais do grupo controle.

Tabela 5. Comparação da atividade enzimática da SOD hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,521	0,054	0,465	0,017*

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$). Valores em negrito indicam aplicação de teste não-paramétrico (Mann-Whitney).

Achuba e Osakwe (2003) verificaram alterações dose-dependente na atividade da CAT e da SOD e na LP, em vários tecidos do bagre africano (*Clarias gariepinus*) após 14, 21 e 28 dias de exposição ao petróleo cru. Zhang e colaboradores (2003) submeteram indivíduos de *Carassius auratus* a diferentes concentrações de óleo diesel durante 40 dias e observaram que o diesel, dependendo da concentração testada, induz o aumento da atividade hepática da GPx,

SOD e CAT. Esses resultados mostraram que o petróleo e derivados são mediadores na geração de radicais livres em peixes. O aumento da atividade das enzimas antioxidantes pode representar uma resposta adaptativa para proteger os peixes das ERO após a exposição a estes poluentes (ACHUBA; OSAKWE, 2003).

A enzima SOD tem sua importância reconhecida como antioxidante sendo responsável por catalisar a conversão de ânions superóxidos reativos em oxigênio e peróxido de hidrogênio, uma ERO menos tóxica. Sob condições naturais (organismos não expostos a agentes tóxicos ou estressores), a SOD e GPx estão entre as defesas antioxidantes mais importantes (JANSSENS et al., 2000; LUSHCHAK et al., 2001). Entretanto, sob condições de estresse causado por xenobióticos tais como os HPAs, provavelmente a SOD é compensada em importância por outras defesas antioxidantes como a CAT (VEGA-LÓPEZ, 2007).

Alterações encontradas na atividade de enzimas antioxidantes por exposição a poluentes sugerem que mudanças observadas podem ser uma resposta adaptativa às ERO. Além disso, a atividade destas enzimas pode ser estimulada ou inibida sob a ação de estresse químico dependendo da intensidade e duração do estresse aplicado, bem como da susceptibilidade da espécie exposta (BALLESTEROS; WUNDERLINB; BISTONI, 2009). De acordo com Cheung e colaboradores (2001), um aumento na concentração do xenobiótico e consequente indução de atividade antioxidante não é uma regra geral.

3.2. CATALASE

A análise de variância realizada detectou diferenças significantes na atividade da CAT nas brânquias entre os grupos de animais expostos aos contaminantes tanto com três dias como com sete dias de exposição (Figura 12 e Tabela 6). No tratamento de três dias o OU na concentração de 0,1 mL/L causou um decréscimo significativo na atividade da CAT em

relação ao grupo controle. Entretanto, nos animais expostos a mesma concentração de OU por sete dias a resposta foi inversa, mostrando um aumento significativo da CAT comparando com o grupo controle. Ainda em relação aos grupos expostos por sete dias, às duas concentrações de ON também causaram um aumento significativo da CAT em relação ao grupo controle (Figura 12).

A exposição ao mesmo contaminante, porém em diferentes concentrações apresentou diferenças estatisticamente significantes. Pode-se observar que atividade da CAT sofreu um decréscimo nos animais do grupo exposto a menor concentração do OU em relação a maior concentração ($p = 0,002$) (Figura 12).

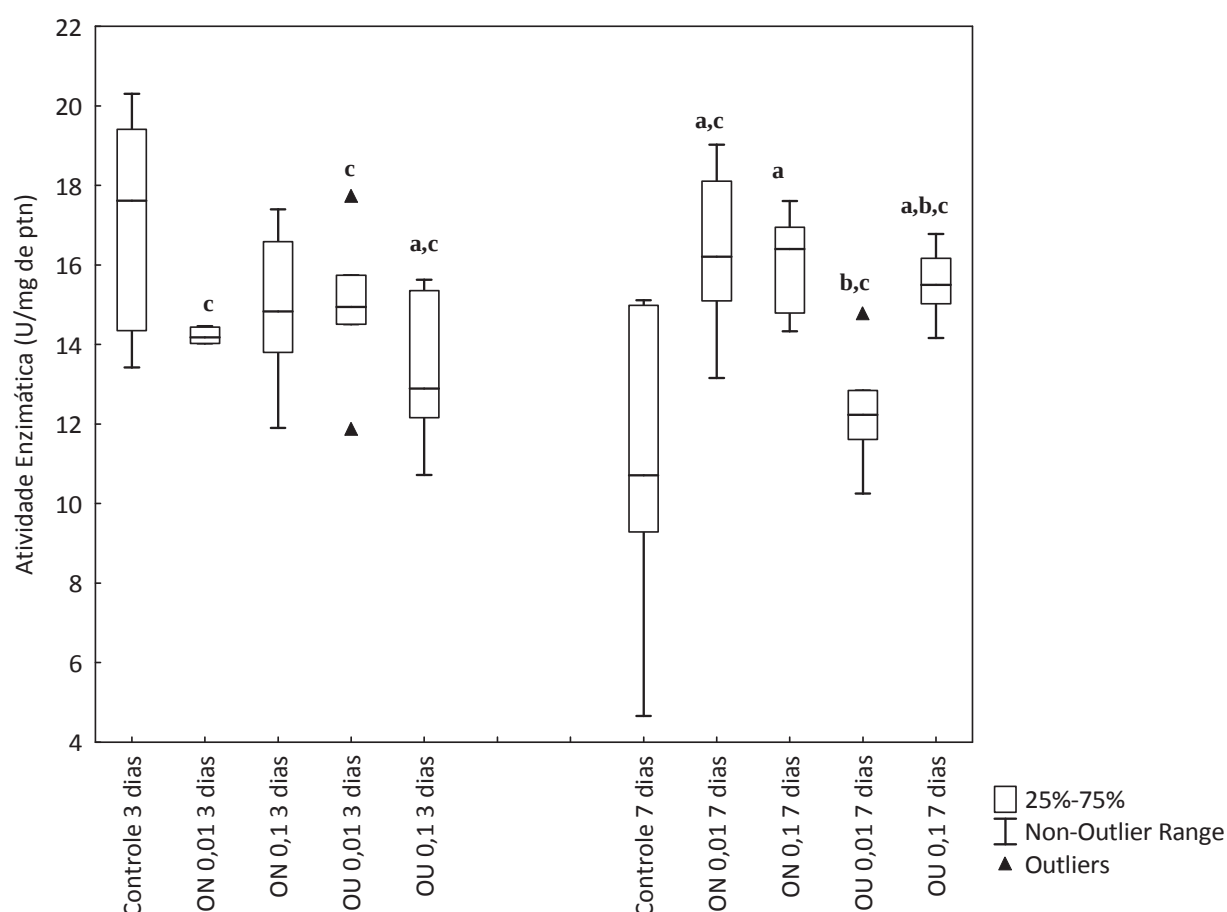


Figura 12. Gráfico da atividade da CAT na brânquia de *O. niloticus* controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo

contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.

Tabela 6. Análise de variância da atividade enzimática da CAT na brânquia de *O. niloticus*.

CAT			
EFEITO	F	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	3,061	4	0,0359*
ATIVIDADE EM 7 DIAS	6,967	4	0,0007*

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$).

Também foram encontradas diferenças significantes entre o mesmo tratamento com diferentes tempos de exposição (Tabela 7). Os animais expostos por três dias às duas concentrações do OU tiveram uma menor atividade da enzima se comparado com os animais expostos por sete dias. O mesmo padrão também foi encontrado para o tratamento com concentração 0,01 mL/L de óleo lubrificante novo.

Tabela 7. Comparação da atividade enzimática da CAT na brânquia entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,358	0,0285*	0,0435*	0,0237*

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$).

Comparando com os grupos controles, no fígado não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na atividade da CAT em nenhum dos tratamentos e períodos de exposição (Figura 13 e Tabela 8). Também não foram encontradas diferenças significantes da CAT no fígado entre três e sete dias de exposição ao mesmo tratamento (Tabela 9).

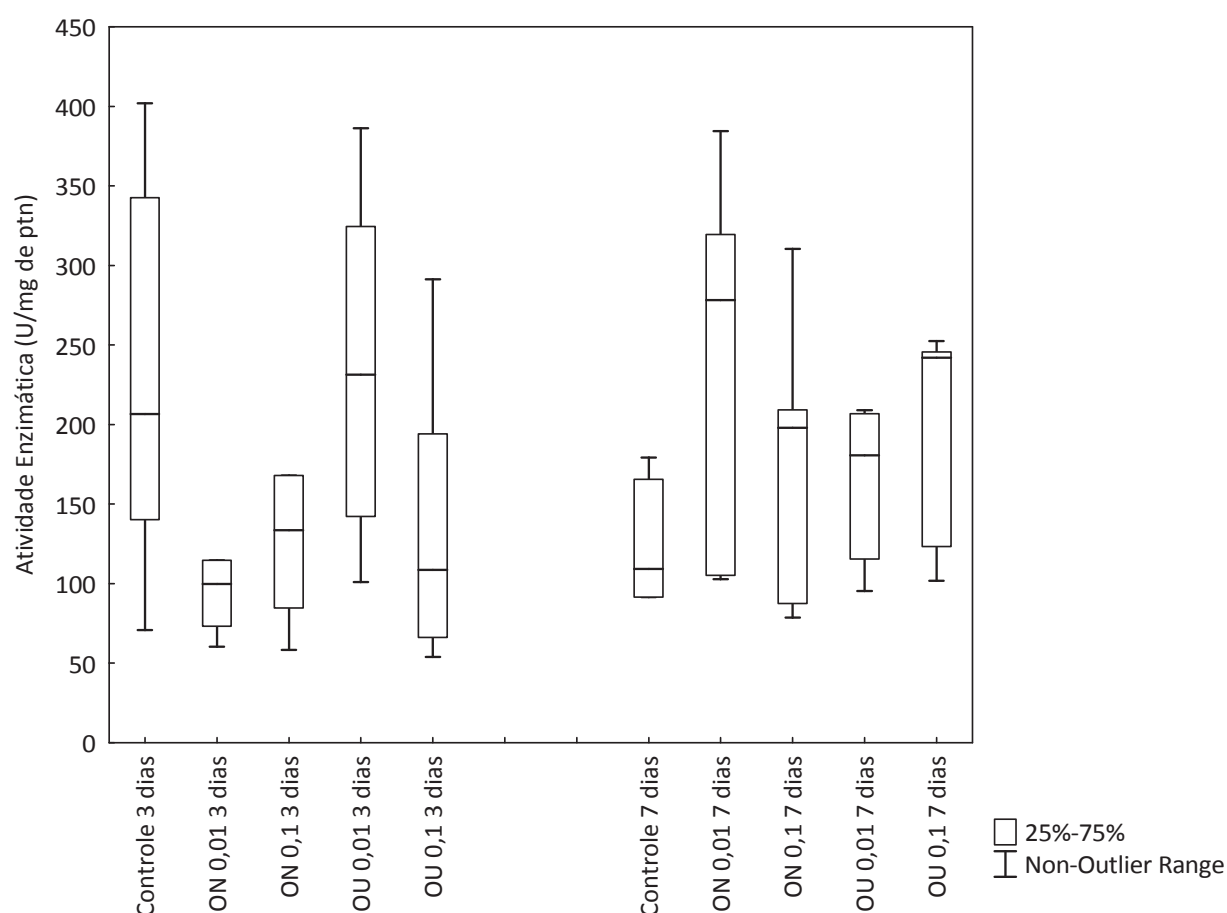


Figura 13. Gráfico da atividade da CAT no fígado de *O. niloticus* controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L.

Tabela 8. Análise de variância da atividade enzimática da CAT no fígado de *O. niloticus* através de aplicação de teste não-paramétrico (Kruskall-Wallis).

CAT			
EFEITO	H	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	5,5	4	0,238
ATIVIDADE EM 7 DIAS	6,735	4	0,15

Tabela 9. Comparação da atividade enzimática da CAT hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,423	0,2	0,3	0,167

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$). Valores em negrito indicam aplicação de teste não-paramétrico (Mann-Whitney).

É bem conhecido que determinados xenobióticos podem gerar ERO, tais como peróxido de hidrogênio e radical ânion superóxido que, por sua vez, são responsáveis por danos celulares e teciduais (FILHO et al., 2001; PINTO et al., 2003). Mecanismos de defesa antioxidantes, incluindo a CAT, têm uma importância considerável para os peixes e outros organismos, pois é induzida para protegê-los contra os efeitos dos radicais livres produzidos devido ao estresse oxidativo e outros fatores.

A presença de metais e HPAs no composto testado pode ter mediado a formação de ERO, sendo que quanto mais tempo exposto, mais o organismo produz estas espécies reativas. Além disso, sabe-se que o processo de biotransformação também pode atuar na produção de ERO através de reações realizadas por enzimas do complexo de monooxigenases, aumentando ainda mais sua quantidade (STEGEMAN et al. 1992). Sabe-se que em organismos expostos a metais ocorre o aumento destas espécies instáveis, o que pode elevar a atividade das enzimas antioxidantes, como a CAT, SOD e GST, que utilizam esses compostos como seus substratos específicos (ATLI; CANLI, 2007). No presente estudo, este aumento de ERO no organismo provocou uma indução da CAT que foi evidenciada nos grupos de animais expostos por sete dias às duas concentrações de ON e a maior concentração de OU.

O aumento da atividade desta enzima nas brânquias no tratamento com sete dias pode estar relacionado com o maior tempo de exposição. Estudos mostram que em exposições agudas a um determinado contaminante o organismo pode não responder à perturbação

causada. Entretanto, após algum período em contato com a substância tóxica o organismo acaba se tornando responsivo a ela (ARIAS et al., 2007). Além disso, estudos mostram que a exposição a um contaminante em concentrações elevadas pode fazer com que o organismo não consiga responder à perturbação de maneira efetiva. Entretanto, com um maior período de exposição ao composto o indivíduo responde induzindo a atividade da CAT, como o ocorrido nos grupos expostos ao OU durante sete dias.

A indução da CAT neste estudo sugere uma defesa do organismo frente a agentes oxidantes, pois é uma enzima chave para remover H_2O_2 e evitar a formação de $\cdot OH$ que podem causar danos celulares (REGOLI et al., 2000). Outros trabalhos têm sugerido que a indução da CAT pode ser uma resposta à exposição de HPAs. Sturve e colaboradores (2006) mostraram que a exposição do bacalhau (*Gadus morhua*) às águas contaminadas com derramamento de petróleo, resultou em aumento da atividade da CAT. O mesmo padrão foi encontrado para os mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) no Rio Siagne, Baía de Cannes (França), onde foi verificada a presença de HPAs em seus tecidos (DAMIENS et al., 2006). Outros estudos também têm demonstrado aumento da atividade da CAT por exposição a metais (LIU; KUEH 2005; GRAVATO et al., 2006; HANSEN et al., 2006).

No menor período de exposição podemos observar uma diminuição da atividade da CAT nas brânquias dos animais tratados com a maior concentração de OU. Este decréscimo da enzima poderia estar relacionado com a inibição direta no sítio ativo da enzima provocada pela presença de metais, HPAs e outros compostos que possivelmente se encontram mais concentrados no OU devido à queima ocorrida durante o período de uso no motor do automóvel. Estudos recentes realizados com o gastrópode *Achatina fulica*, demonstrou uma enorme redução na atividade da CAT após a exposição dos indivíduos ao cádmio e ao zinco, o que indicou efeito prejudicial dos metais na enzima em tecidos específicos (glândula digestiva e rim) (CHANDRAN et al. 2005). Bainy e colaboradores (1996) também mostraram que a

inibição da atividade da CAT em *O. niloticus* pode ser um importante resultado na análise e monitoramento de áreas poluídas.

Na literatura encontramos outra explicação para a redução da atividade enzimática da CAT. Hutchinson e colaboradores (2003) observaram uma relação entre a diminuição na produção de H_2O_2 e aumento na produção de O_2^- - em peixes (*Limanda limanda* L.) expostos a sedimento contaminado com HPAs. Kono e Fridovich (1982) descreveram a inibição da CAT, mostrando uma relação entre esta enzima antioxidante e o ânion superóxido. A redução da atividade enzimática pode ser explicada através da conversão da CAT nativa (Fe III) para Ferro II na presença do ânion superóxido. Esse padrão pode ser prevenido e revertido na presença da SOD.

Escobar e colaboradores (1996) também demonstraram inativação da CAT por O_2^- e radicais peróxidos e discutiram que, apesar de um aumento na taxa de produção de espécies reativas de oxigênio frequentemente induzir um aumento da atividade de enzimas antioxidantes, num primeiro estágio de exposição e/ou em altas concentrações de radicais livres prevalece a inativação enzimática e redução da atividade levando à autocatálise do processo de dano oxidativo.

De acordo com os trabalhos acima citados, estes contaminantes podem gerar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio capazes de causar inibição de atividade enzimática, pode-se sugerir que os organismos deste local estejam sofrendo estresse oxidativo associado à exposição a HPAs.

O óleo lubrificante, tanto o novo como o usado são considerados misturas complexas, sendo que sua composição compreende diversas substâncias em sua fórmula. Portanto, é difícil estabelecer exatamente o composto que causou o aumento ou a inibição da atividade da CAT nos organismos testados. Isso porque não sabemos se pode estar ocorrendo interações entre as substâncias ou mesmo qual tipo de interação.

Características das brânquias, tais como sua elevada superfície de troca composta por uma fina camada de células, faz com que assumam um papel de suma importância em funções metabólicas vitais para os peixes, tais como respiração, osmorregulação e excreção (MOYLE; CECHE Jr., 1988). Este órgão possui permanente contato com o ambiente o que pode refletir na sua integridade. Isso porque em casos de contaminação ou de poluição, as brânquias são uma importante via de entrada de compostos lipofílicos, como os HPAs (HYLLAND, 2006). Isso explicaria as respostas encontradas nas brânquias.

A hipótese para a ausência de respostas significantes no fígado é que os períodos de exposição ao ON e OU não foram suficientes para causar os efeitos esperados. Ainda podemos sugerir que as brânquias estivessem acumulando os compostos, fazendo com que grande parte deles não chegassem ao fígado para ser metabolizado e não fossem capazes de causar alterações relevantes.

Resultados semelhantes aos mostrados neste trabalho foram observados por Atli e colaboradores (2006). Através de um experimento de exposição aguda (96h) a metais esses pesquisadores mostraram que a CAT pode apresentar diferentes respostas em relação ao tipo de tecido.

3.3. GLUTATIONA PEROXIDASE

A atividade da GPx nas brânquias não sofreu alterações em nenhum dos tratamentos em relação ao controle (Figura 14). A análise de variância não mostrou nenhuma diferença significativa nos animais expostos aos contaminantes por três dias ($F = 1,53$; $gl = 4$; $P = 0,225$), nem por sete dias ($F = 1,67$; $gl = 4$; $P = 0,19$).

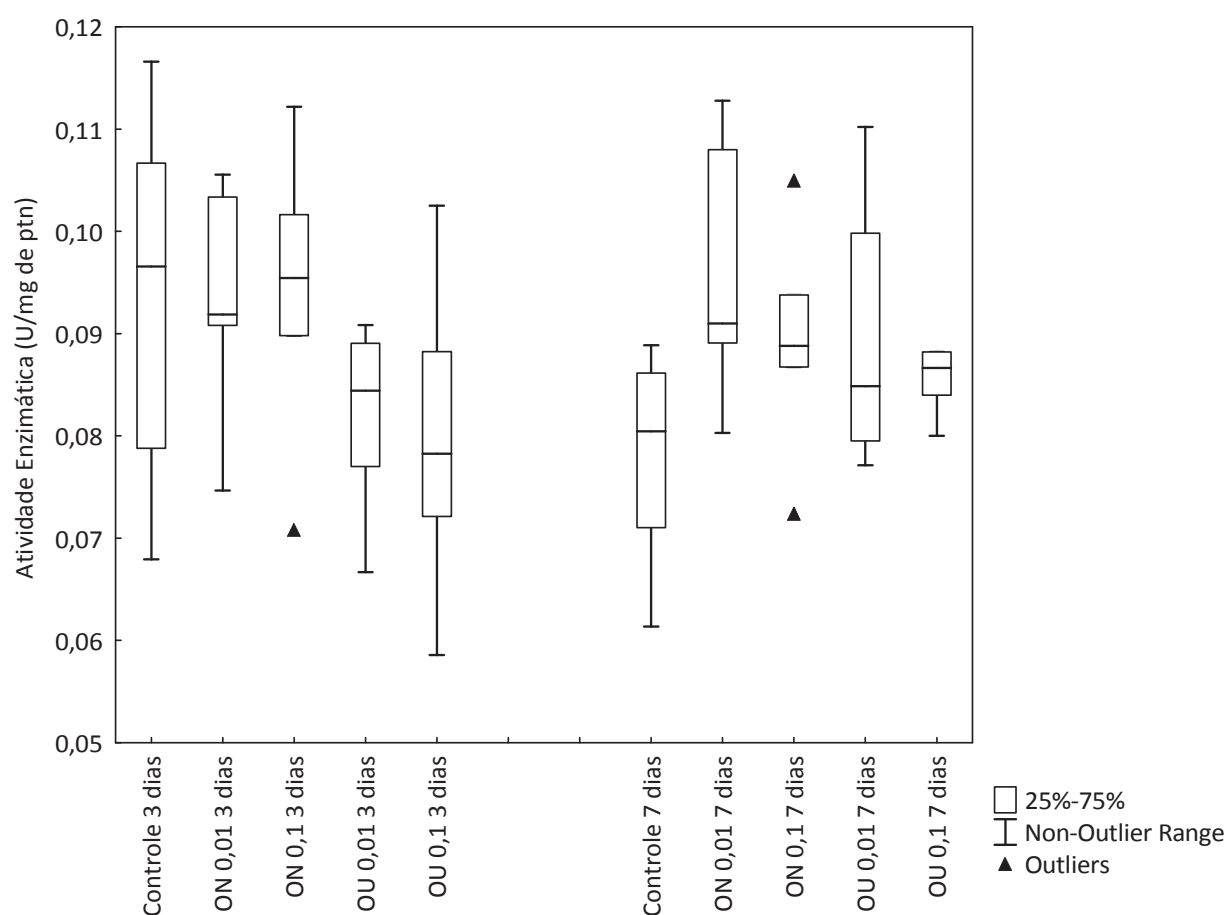


Figura 14. Gráfico da atividade da GPx na brânquia de *O. niloticus* controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L.

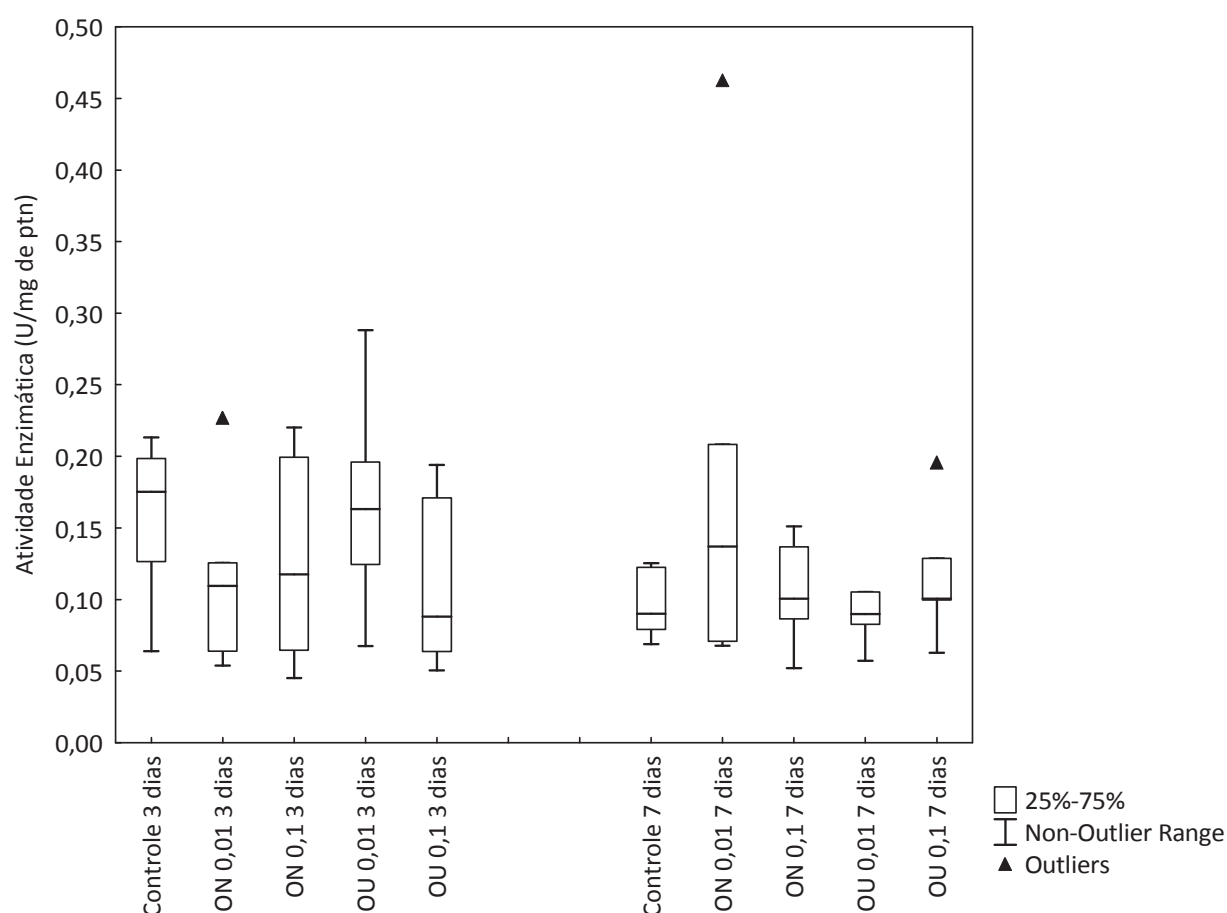


Figura 15. Gráfico da atividade da GPx no fígado de *O. niloticus* controle e expostas (T) por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L.

Assim como nas brânquias, o fígado também não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa na atividade da GPx dos tratamentos em relação aos controles (Figura 15 e Tabela 10).

Tabela 10. Análise de variância da atividade enzimática da GPx no fígado de *O. niloticus*.

GPx			
EFEITO	F	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	0,973	4	0,439
ATIVIDADE EM 7 DIAS	2,158	4	0,706

Nota: Valores em negrito indicam aplicação de teste não-paramétrico (Kruskall-Wallis).

Da mesma maneira não houve nenhuma diferença entre os mesmos tratamentos com diferentes tempos de exposição (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação da atividade enzimática da GPx hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,499	0,336	0,809	0,076

Nota: Valores em negrito indicam aplicação de teste não-paramétrico (Mann-Whitney).

A atividade da GPx no fígado e nas brânquias não mostrou nenhuma alteração significativa. A GPx, segundo Devlin (2003), é um importante mecanismo de proteção contra danos causados por radicais livres, pois é responsável por catalisar a redução de peróxido de hidrogênio e de peróxidos de lipídios. Entretanto, sabe-se que algumas isoformas de GST possuem atividade peroxidase (ALMEIDA et al., 2005), o que pode ter ajudado no combate às ERO e não ter disparado a atividade da GPx no fígado e nas brânquias dos peixes expostos aos óleos lubrificantes.

3.4. GLICOSE-6-FOSFATO-DESIDROGENASE

O fígado é o principal local onde ocorrem os processos lipogênicos nos peixes. Este processo envolve a ação de enzimas específicas que fornecem energia para os processos bioquímicos, como a G6PDH (WANG et al., 2005), sendo portanto, o tecido hepático o principal local para atuação desta enzima. Dessa forma, a análise da atividade dessa enzima foi realizada apenas no fígado, onde a atuação desta enzima é realmente significativa.

A análise de variância não indicou nenhuma diferença dos tratamentos em relação aos controles em nenhum dos dois tempos de exposição testados (Figura 16 e Tabela 12).

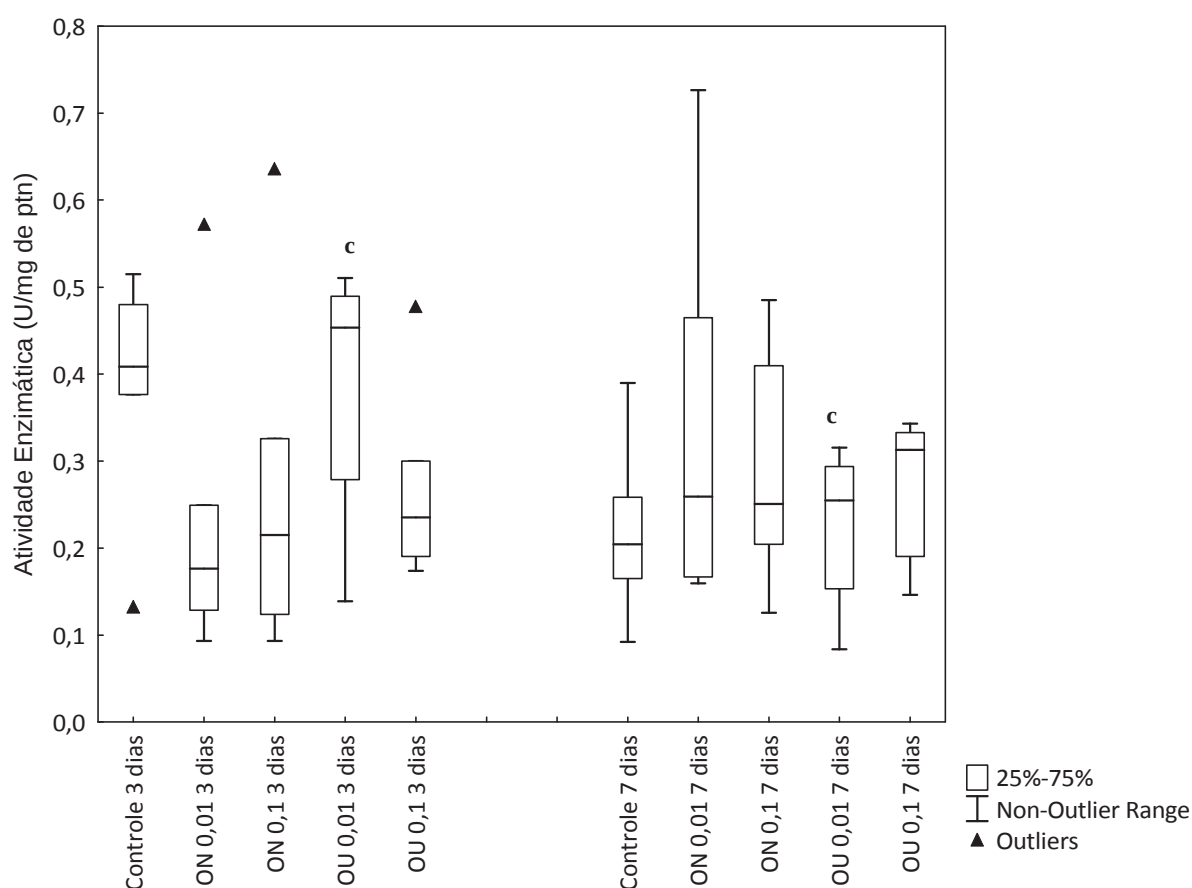


Figura 16. Gráfico da atividade da G6PDH no fígado de *O. niloticus* controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.

Tabela 12. Análise de variância da atividade enzimática da G6PDH no fígado de *O. niloticus* através de aplicação de teste não-paramétrico (Kruskal-Wallis).

G6PDH			
EFEITO	H	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	5,234	4	0,264
ATIVIDADE EM 7 DIAS	1,74	4	0,783

Tabela 13. Comparação da atividade enzimática da G6PDH hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,844	0,336	0,954	0,044*

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$). Valores em negrito indicam aplicação de teste não-paramétrico (Mann-Whitney).

Os animais dos grupos expostos à concentração de 0,01 mL/L de OU por três dias e sete dias apresentaram um comportamento na atividade enzimática diferente (Figura 16). Houve uma redução estatisticamente significativa da atividade da G6PDH do grupo exposto por três dias para o mesmo tratamento, porém, com sete dias de exposição (Tabela 5).

Um trabalho que está de acordo com os resultados aqui encontrados é o de Winzer; Van Noorden e Kohler (2002). Neste estudo eles encontraram que a resposta de hepatócitos a estressores oxidativos é a inativação da G6PDH, que pode causar maior susceptibilidade à toxicidade de xenobióticos. Esta observação explicaria a redução da G6PDH no grupo exposta a concentração de 0,01 mL/L do OU. Com um maior período de exposição ao OU as células do fígado podem ter se tornado responsivas à presença do contaminante na água. Esta redução deixa claro que a exposição de peixes ao petróleo ou derivados pode provocar alterações na atividade das enzimas de defesa antioxidante que consequentemente podem levar à ocorrência de danos oxidativos.

Entretanto, assim como o encontrado em outras enzimas, é muito importante considerar que estes animais estão expostos a várias substâncias presentes no OU concomitantemente, por isso, torna-se difícil estabelecer relações diretas entre o efeito tóxico do óleo lubrificante e esta alteração da enzima G6PDH.

3.5. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A concentração de MDA nas brânquias nos tratamentos realizados com ON e OU nas duas concentrações não sofreu alterações em relação ao controle de acordo com o teste de

Kruskal-Wallis (Tabela 14). Este resultado pode ser observado tanto nos animais expostos por três como por sete dias. Em relação ao mesmo período de exposição, as diferenças estatisticamente significantes encontradas estão nos níveis de LP nos animais tratados com concentração de 0,1 mL/L e 0,01 mL/L de OU com três dias de exposição ($p = 0,004$) (Figura 17).

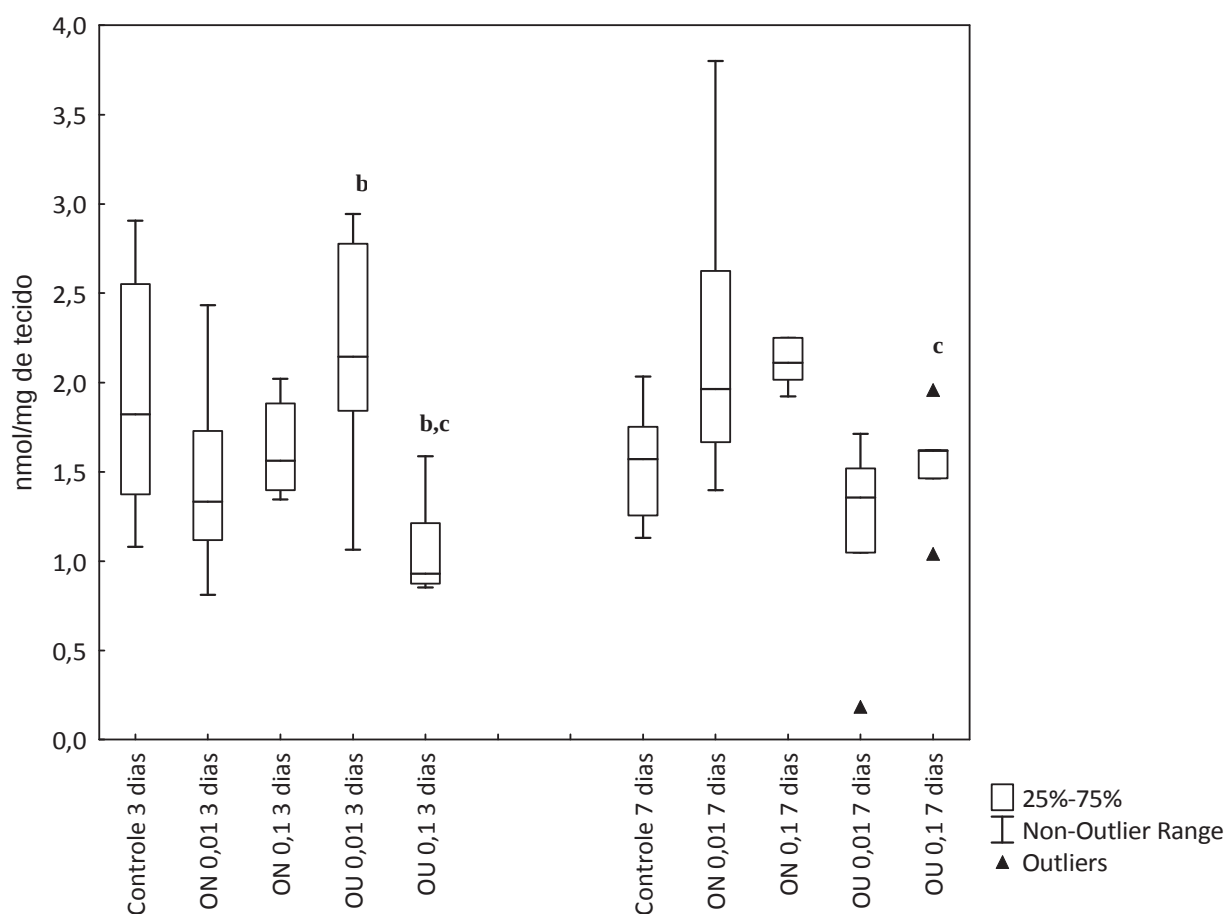


Figura 17. Gráfico da concentração de MDA na brânquia de *O. niloticus* controle e expostas (T) por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.

Tabela 14. Análise de variância da LP na brânquia de *O. niloticus*.

LP			
EFEITO	F	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	3,668	4	0,017*
ATIVIDADE EM 7 DIAS	6,884	4	0,142

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$). Valores em negrito indicam aplicação de teste não-paramétrico (Kruskal-Wallis).

Após sete dias de exposição, podemos observar que a peroxidação nas brânquias dos peixes expostos à concentração 0,1 mL/L de OU foi maior do que nos peixes expostos por três dias ao mesmo composto na mesma concentração (Tabela 15).

Tabela 15. Comparação da LP na brânquia entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,173	0,097	0,031*	0,082

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$).

No fígado, o grupo de peixes expostos à concentração de 0,1 mL/L do ON por três dias teve uma aumento estatisticamente significativa na concentração de MDA em relação ao controle (Figura 18 e Tabela 16).

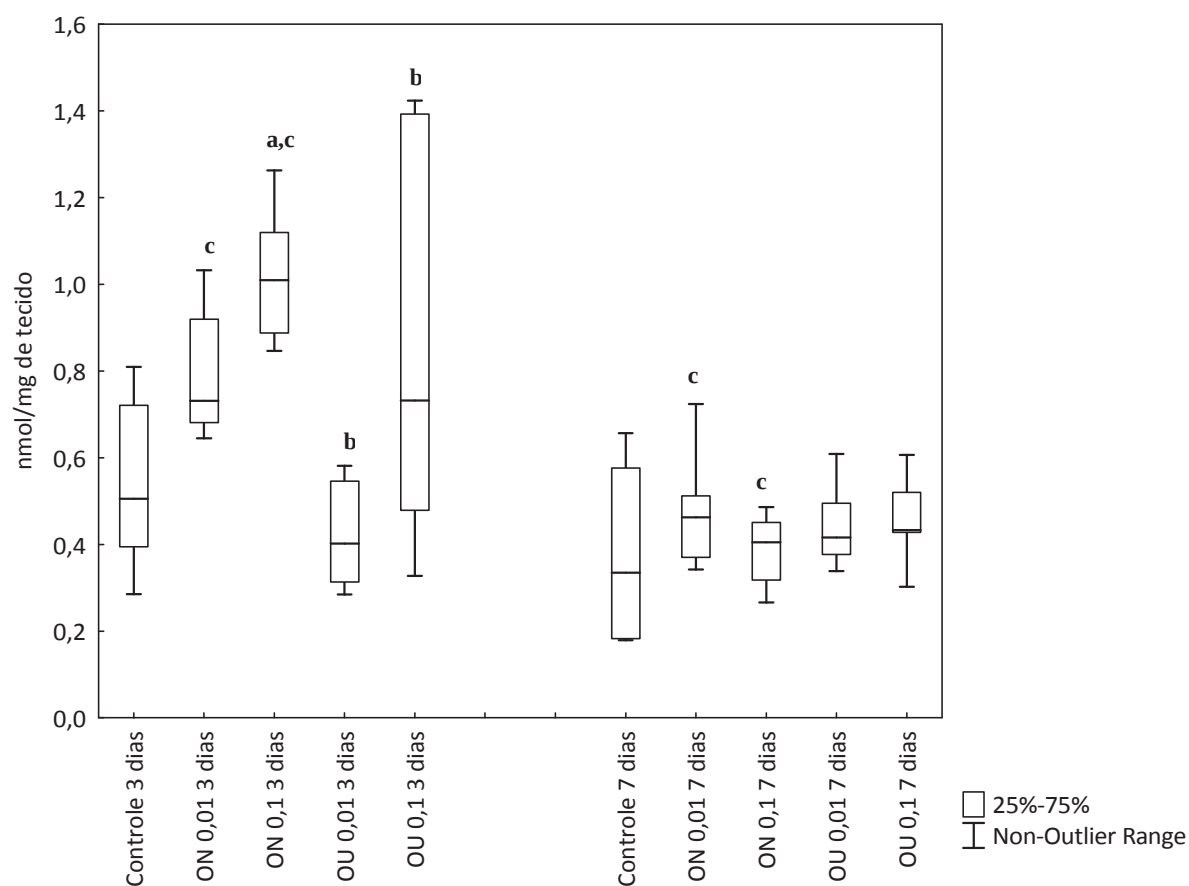


Figura 18. Gráfico da concentração de MDA no fígado de *O. niloticus* controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.

Tabela 16. Análise de variância da peroxidação lipídica no fígado de *O. niloticus*.

LP			
EFEITO	F	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	5,46	4	0,0026*
ATIVIDADE EM 7 DIAS	0,629	4	0,646

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$).

Também foram encontradas diferenças significantes do nível de LP no fígado de peixes tratados com OU expostos a diferentes concentrações (Figura 18). Os peixes expostos

a concentração de 0,1 mL/L do OU apresentou um grau maior de LP em relação aos animais expostos a concentração de 0,01 mL/L também de OU.

Outro resultado observado foi a maior concentração de MDA encontrada nos peixes expostos por três dias ao ON (0,1 mL/L e 0,01 mL/L) em comparação aos animais tratados com as mesmas concentrações de óleo novo, porém com um maior tempo de exposição ao contaminante (Tabela 17).

Tabela 17. Comparação da LP no fígado entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição ao mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,000005*	0,003*	0,144	0,768

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$). Valores em negrito indicam aplicação de teste não-paramétrico (Mann-Whitney).

A peroxidação de lipídios é uma importante consequência do estresse oxidativo e pode ser provocada por um único radical livre que promove uma série de reações bioquímicas deletérias (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A LP pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996).

Em geral as brânquias apresentaram um maior grau de peroxidação lipídica em relação ao fígado, mesmo comparando os animais dos grupos controle. Isso ocorre porque as brânquias possuem uma grande superfície de contato com o meio e são uma das primeiras regiões do corpo do animal a entrar em contato com contaminantes presentes na água (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008).

O maior nível de LP nos animais expostos a maior concentração de OU em comparação com a menor concentração também de OU pode ser explicado pelo fato de que

alguns organismos não são responsivos a baixas concentrações de um determinado contaminante. Este comportamento pode ser invertido se o contaminante permanecer em contato com o organismo por mais tempo. No caso, isso pode ser percebido com o aumento da LP no grupo exposto à concentração de 0,1 mL/L de OU por três dias para o grupo com o mesmo tratamento, porém exposto por sete dias.

Vários estudos têm detectado aumento da peroxidação lipídica em organismos aquáticos expostos a altas concentrações de xenobióticos na água (BANO; HASAN, 1989; THOMAS; WOFFORD, 1993). Neste trabalho, os níveis de LP nos grupos expostos aos contaminantes por sete dias foram baixos, comparados aos dados obtidos dos grupos expostos por três dias. Este fato pode estar relacionado com uma possível adaptação do organismo, aumentando suas defesas antioxidantes e reduzindo a LP nas células do fígado. Ou ainda, podemos sugerir que determinados contaminantes podem ser capazes de ativar os mecanismos de defesa contra radicais livres que causam a LP, reduzindo, portanto, os danos celulares. No caso dos óleos lubrificantes a principal linha de defesa ativada contra os radicais livres é a CAT.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste capítulo mostraram que para a espécie estudada, o tempo de exposição ao ON e ao OU é uma variável extremamente importante. A resposta dos organismos frente à exposição ao ON e OU diferiu bastante em relação ao período que os animais ficaram expostos aos diferentes compostos. Isso sugere que a tilápia-do-Nilo tem a capacidade de modular sua resposta frente a determinados contaminantes ou ainda se adaptar ao ambiente poluído por óleos lubrificantes.

No caso das enzimas antioxidantes e do efeito oxidativo, fica claro que os principais efeitos causados pelos dois contaminantes testados foram nos animais expostos por três dias e à menor concentração. Para a questão do tempo de exposição, a explicação parece ser que os organismos se adaptaram à presença dos óleos na água e conseguiram se reestabelecer.

Após a análise integrada dos dados obtidos neste capítulo, observa-se que os resultados foram muito similares em relação à exposição aos dois tipos de óleos, inclusive considerando que a CAT aumentou nas brânquias após 7 dias nos dois tratamentos. Entretanto, o maior nível de MDA nos animais expostos ao ON reflete em um maior grau de estresse oxidativo.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EROD E GST NA PRESENÇA DE ÓLEO LUBRIFICANTE NOVO E USADO EM *Oreochromis niloticus*

1. INTRODUÇÃO

1.1. ETÓXIRESORUFINA- O-DESETILASE

As enzimas de fase I estão relacionadas a reações onde ocorre uma alteração não sintética (oxidação, redução ou hidrólise) da molécula original (COMMANDEUR; STIJNTJES; VERMEULEN, 1995), expondo ou introduzindo grupos funcionais no xenobiótico (VERMEULEN, 1996). Estas reações levam, geralmente, à formação de um composto mais hidrofílico, ou seja, mais facilmente excretável que o composto original (COMMANDEUR; STIJNTJES; VERMEULEN, 1995) (Figura 19).

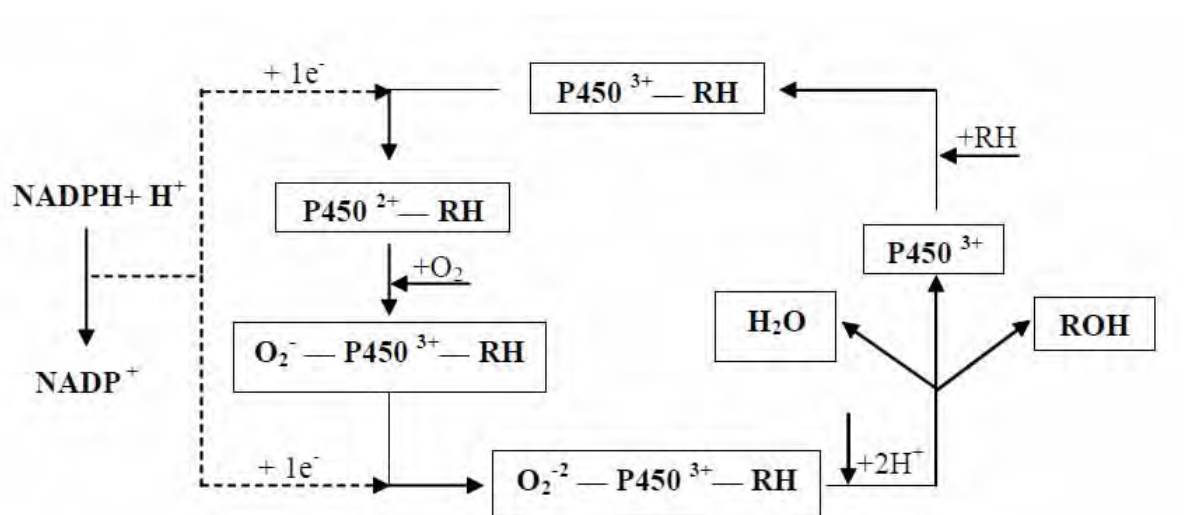


Figura 19. O sistema do citocromo P450. $P450^{+3}$: citocromo P450 com o ferro no estado oxidado (Fe^{+3}); $P450^{+2}$: citocromo P450 com o ferro no estado reduzido (Fe^{+2}); RH: substrato/xenobiótico; e^- : elétron (Fonte: adaptado de LANDIS; YU, 1995).

A capacidade que o citocromo P450 tem de realizar reações com um grande número de substratos é decorrente da variedade de isoenzimas citocromo P450 e da não especificidade para um substrato único. Esta pouca especificidade provê importante flexibilidade ao metabolismo de xenobióticos (PEDERSEN et al., 1996). As isoformas são classificadas em famílias, subfamílias e membros de acordo com sua composição de aminoácidos, sequência N-terminal, especificidade de substrato e tipos de reações que catalisam (NELSON et al.,

1993). A terminologia mais aceita e hoje utilizada permite compreender, por exemplo, que CYP1A1 significa que a molécula em questão é um citocromo P-450 (CYP), da família 1 (CYP1), da subfamília A, membro 1.

Em animais aquáticos, principalmente vertebrados, a subfamília CYP1A é expressa cataliticamente pela atividade da 7-etóxi-resorufina-O-desetilase (EROD) que tem como substrato a 7-etóxi-resorufina, participando de uma reação O-desalquilação (BUCHELI; FENT, 1995), dependente de NADPH (STEGEMAN; HAHN, 1994). O produto formado na reação, a resorufina, é uma estrutura com multi anéis, com forma similar a vários substratos indutores de CYP1A (BURKE; MAYER, 1985) e pode ser medido por espectrofotômetro ou espectrofluorímetro.

A subfamília CYP1A é hoje a mais amplamente estudada, pelo fato destas enzimas estarem envolvidas no metabolismo de um grande número de compostos citotóxicos, cancerígenos e mutagênicos. Uma das vantagens primárias da indução da atividade da EROD como biomarcador é a simplicidade de ser mensurada, além de ser altamente sensível a determinados xenobiontes orgânicos, tais como PCBs, HPAs β -naphthoflavona (NICARETA, 2004).

Arinç; Sem e Bozcaarmutlu (2000) mostraram que a medição da atividade da EROD parece ser a análise mais sensível e amplamente utilizada para se determinar a resposta de indução do CYP1A em peixes. A indução da EROD é usada como um biomarcador da exposição à HPAs e compostos estruturalmente relacionados (STEGEMAN; HAHN, 1994; BUCHELI; FENT, 1995). No entanto, tem sido mostrado que fígado de peixes a atividade da EROD pode ser inibida por metais (VIARENGO et al., 1997), detergentes não-iônicos (YUN; SONG; KIM, 1996) e pesticidas (TRÍDICO et al., 2010).

A indução é o processo pelo qual um xenobiótico aumenta a quantidade de RNAm que irá traduzir uma determinada proteína e com isso causa aumento do conteúdo dessa proteína.

A indução pode ser medida pelo aumento da concentração de RNAm como também pelo aumento da concentração da proteína, no caso do citocromo P450. PCB, HPA, b-naftoflavona e muitas outras substâncias podem induzir o citocromo P450A1 de fígado de peixes (GOKSOYR et al., 1991; VACCARO et al., 2005).

O receptor envolvido na regulação da expressão do gene CYP1A é conhecido como receptor Ah (receptor hidrocarboneto aromático). A indução é iniciada pela ligação do xenobiótico específico ao complexo proteico que compreende o receptor Ah e proteína 90 (hsp 90), funcionando então como um agonista (WHYTE et al., 2000). Após a liberação da hsp 90, o complexo receptor-indutor liga-se a uma outra enzima, a hidrocarboneto aril nuclear transferase (ARNT), e pode então ser transferido do citoplasma da célula para o núcleo. No núcleo, a ARNT liga-se a região específica do DNA, o elemento de resposta ao xenobiótico. Fatores transcricionais são usados para acessar a região promotora do gene CYP1A, e o RNA mensageiro pode ser sintetizado (STEGEMAN; HAHN, 1994) (Figura 20).

Em várias espécies de peixe, os níveis de proteína de CYP1A no fígado demonstraram ser um biomarcador muito sensível a exposição à HPAs, o que certamente se enquadra nos procedimentos necessários a uma correta avaliação do risco ecológico (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A avaliação de CYP1A pode ser usada em várias fases do processo de avaliação do risco ecológico, nomeadamente, ao nível da quantificação do impacto e exposição a vários poluentes orgânicos, monitoramento ambiental da “saúde” dos organismos e dos ecossistemas, identificação de efeitos tóxicos primários, investigação dos mecanismos de toxicidade dos xenobióticos e identificação da exposição a compostos específicos (STEGEMAN et al., 1992). A utilização da EROD como biomarcador tem aumentado nos últimos anos devido, essencialmente, a otimização de protocolos para a medição da sua atividade catalítica de uma forma rápida e relativamente pouco dispendiosa (BURKE; MAYER, 1974).

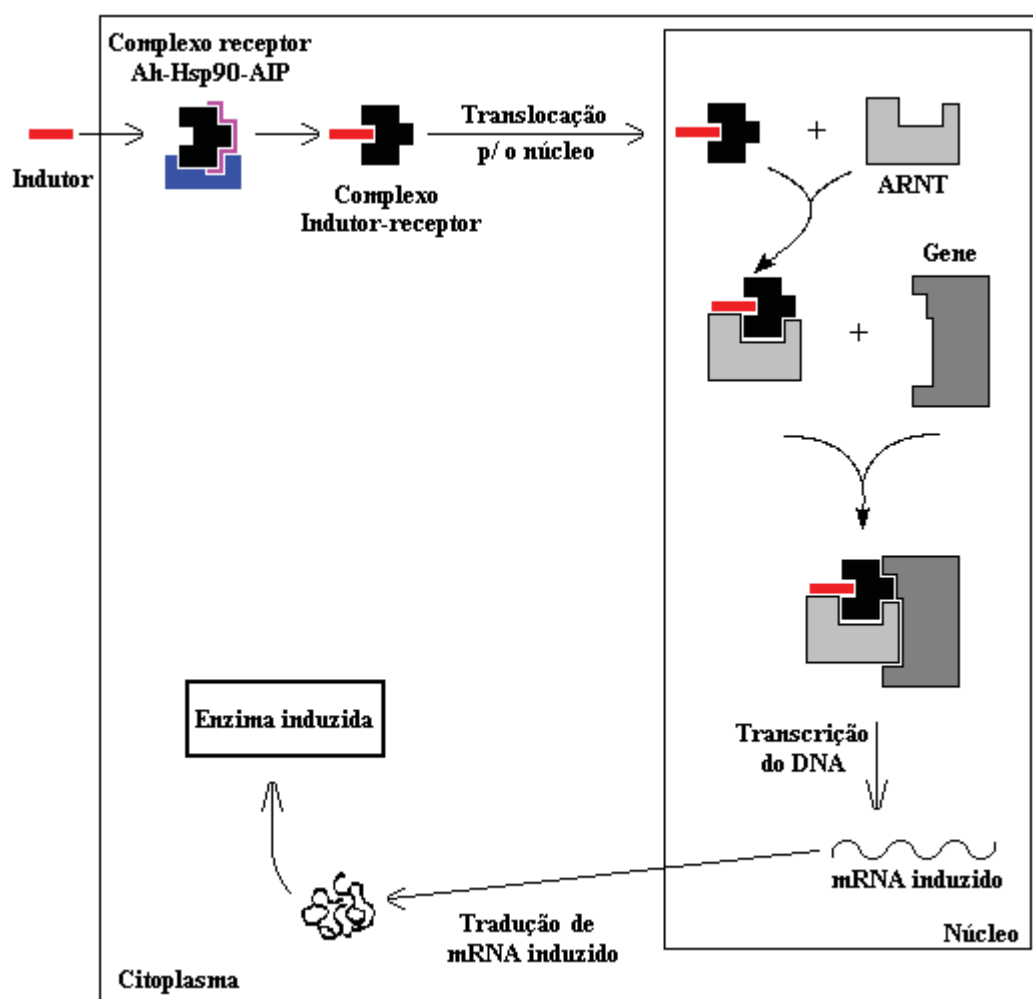


Figura 20. Esquema do mecanismo de indução da EROD.

Os testes toxicológicos *in vitro* têm vantagens sobre os sistemas tradicionais *in vivo* por diminuir a necessidade de morte de organismos indicadores, um melhor controle das variáveis ambientais, a possibilidade de uma amostragem simultânea ou repetida ao longo do tempo, e um estudo sob condições controladas (MOORE; SIMPSON, 1992; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Portanto, comparar a atividade da enzima EROD *in vivo* e *in vitro* em organismos expostos ao óleo lubrificante novo e usado é importante para tentar entender os mecanismos de toxicidade dos compostos utilizados neste trabalho.

1.2. GLUTATIONA S-TRANSFERASE

As GSTs representam o maior grupo de enzimas de detoxificação. Todas as espécies de eucarióticos possuem múltiplas isoenzimas GST citoplasmáticas ou relacionadas a membranas. Dentre as GSTs, cerca de 95% predominam enzimas da fração citosólica e 5% pertencem à fração microsomal (retículo endoplasmático) e mitocondrial (HAYES; PULFORD, 1995; KLAASSEN, 1996).

A GST representa uma família de enzimas homólogas envolvidas com as reações de Fase II no fígado: conjugação da GSH com o xenobionte ou com o metabólito produzido na Fase I, gerando compostos mais facilmente eliminados pela bile ou que sejam convertidos a ácido mercaptúrico no rim para serem eliminados através da urina (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974). A GST catalisa a conjugação da glutatona a uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos, durante a fase II da biotransformação (RIOL et al., 2000). Além de participarem em processos de desintoxicação por formação de conjugados com a glutatona reduzida (GSH), as GSTs possuem papel no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonóides; atuam com peroxidase na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool durante o estresse oxidativo (DIXON; LAPTHORN, 2002).

A glutatona reduzida (GSH) é um tripeptídico (γ -glutamilcisteinil-glicina) que perfaz a maior parte dos grupos tiólicos livres da maioria das células vivas (MANAHAM, 2000). A GSH, segundo Manaham (2000), participa: da desintoxicação de xenobiontes orgânicos (reações de conjugação: biotransformação de fase II); da remoção de peróxidos pela GPx; da proteção contra radiação ionizante e contra eletrófilos (cátions metálicos, por exemplo); da modulação de atividades enzimáticas dependentes do equilíbrio redox e da manutenção da condição reduzida dos grupos-SH de proteínas citosólicas.

A GSH atua, portanto, como um tampão oxidativo, mantendo o citosol na condição reduzida, essencial para a célula. A oxidação da GSH produz o dissulfeto de glutatona

(GSSG), essa forma oxidada é produzida sob a ação enzimática da glutathione peroxidase (GPx) ou mesmo em reações não catalisadas. Pela ação de tioltransferases como a GST, a GSH pode também originar compostos dissulfidrílicos. A glutathione redutase (GR) ligada a um sistema de carreadores de elétrons (NADPH/NADP⁺) mantém os níveis normais de GSH na célula. A GPx, a GST, e a GR atuam juntas para o equilíbrio redox do sistema GSH/GSSG (DAGGETT et al., 1998; MANAHAM, 2000; WRIGHT et al., 2000).

Diferentes GSTs exibem diferentes atividades quando induzidas por um composto específico ou por um metabólito formado de um composto particular. A ação conjunta de várias isoenzimas de GST compõe uma rede de defesa do organismo contra as substâncias tóxicas (HAYES, 1989). Evidências sugerem que o nível de expressão de GST seja um fator crucial na determinação da sensibilidade das células a um amplo espectro de substâncias tóxicas (HAYES; PULFORD, 1995).

Esta enzima de biotransformação tem sido muito estudada em trabalhos de campo no monitoramento de poluentes nas últimas décadas (FENET et al., 1998; KANTONIEMI; KIRSI; OIKARI, 1996). Um exemplo é o estudo feito por Willet e colaboradores (1999) que utilizaram mexilhões (*Bathymodiolus* sp. e *Modiolus modiolus*) provenientes de locais contaminados por HPAs oriundos de escoamento da perfuração de petróleo na região do Golfo do México. A análise da GST nestes animais indicou indução da atividade da enzima. Em um trabalho de biomonitoramento do Mar Báltico com sedimento contaminado por HPAs e metais foi observado um aumento da atividade da GST na espécie de peixe *Platichthys flesus*, sugerindo esta enzima como biomarcador para estudos de campo (NAPIERSKA; PODOLSKA, 2005). Sendo este trabalho a análise do efeito da exposição de peixes a compostos (óleo lubrificante novo e usado) que possuem tanto HPAs como metais em sua constituição, mesmo que em diferentes proporções, a análise da GST torna-se indispensável para verificar possíveis consequências da exposição a estes contaminantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os tecidos utilizados foram colocados em tubos de *ependorf* e preservados a uma temperatura de -80°C. No momento da análise as amostras foram descongeladas em gelo, homogeneizadas (1:4, massa:volume) em tampão Tris-HCl 50mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Sacarose 0,5M; pH 7,4; contendo inibidores de protease (PMSF 100µM), e centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos. A fração sobrenadante foi então coletada e centrifugada novamente a 50.000 x g por uma hora, de forma a obtermos as frações citosólica e microsomal. A GST foi medida na fração citosólica, enquanto que na fração microsomal, que foi ressuspenso em tampão de microssoma (50 mM Tris, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 20% glicerol, pH 7,4), foi medida a atividade da EROD.

2.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

2.2.1. ATIVIDADE DA 7-ETÓXIRESORUFINA-O-DESETILASE

A atividade da EROD foi medida através do método fluorimétrico na fração microsomal dos extratos protéicos do fígado e da brânquia. Este método cinético mede a O-desalquilação do substrato não fluorescente 7-etóxi-resorufina em um produto fluorescente, a resorufina ($\lambda_{\text{excit}}=537$ nm, $\lambda_{\text{emiss}}=583$ nm) (SARASQUETE; SEGNER, 2000; MUNRO et al., 2007). À cubeta foram adicionados 1950 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4; 20 µL de solução de 7-etóxi-resorufina 335 µM, 20 µL de NADPH 20 mM e 10 µL de extrato microsomal (FERNANDES et al., 2002). A reação foi monitorada por 3 minutos, a uma temperatura de 30 °C. A atividade da EROD foi expressa em pmol/min/mg de proteína.

2.2.2. GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A atividade da GST foi feita pelo método de Keen; Habig e Jakoby (1976). As amostras foram adicionadas em um meio de reação contendo 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 100 mM de GSH. O aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm.

2.2.3. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração microsomal de proteína foi determinada de acordo com o método utilizado por Bradford (1976), com curva padrão de soro albumina bovina.

2.3. TESTE *IN VITRO*

Para realização do teste *in vitro* foram utilizadas amostras de fígado de peixes expostos a óleo diesel em um experimento anteriormente realizado. As amostras foram homogeneizadas para a obtenção da fração microsomal. A partir de 26 amostras de fígado com a EROD induzida foi feito um *pool*. Para fazer este *pool* as amostras foram misturadas durante 30 segundos num vórtex e separadas em 22 alíquotas de 100µL, que foram divididas em 2 grupos de duas alíquotas (duas repetições). As amostras foram incubadas durante 60 minutos a 37 °C em banho-maria com concentrações crescentes de 0,00% (controle), 0,25%, 0,50%, 1,00%, 2,50% e 5,00% de ON em um grupo e OU no outro grupo. Após as incubações, a atividade EROD foi medida através do método fluorimétrico.

As amostras utilizadas neste teste foram as mesmas do teste *in vitro* realizado com óleo diesel no trabalho de Nogueira e colaboradores (2011). Por este motivo, o teste de temperatura não foi repetido, sendo que neste trabalho foi mostrado que a atividade da EROD mantinha-se estável após a incubação das amostras a 37 °C após 1 h, com medições feitas a cada 15 minutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ETÓXIRESORUFINA- O-DESETILASE *IN VIVO*

Após a exposição ao ON e OU em duas concentrações (0,1 e 0,01 mL/L) durante três e sete dias, foram encontrados diferentes padrões de inibição e indução da atividade microsomal da EROD na brânquia e no fígado de *O. niloticus* (Figura 21).

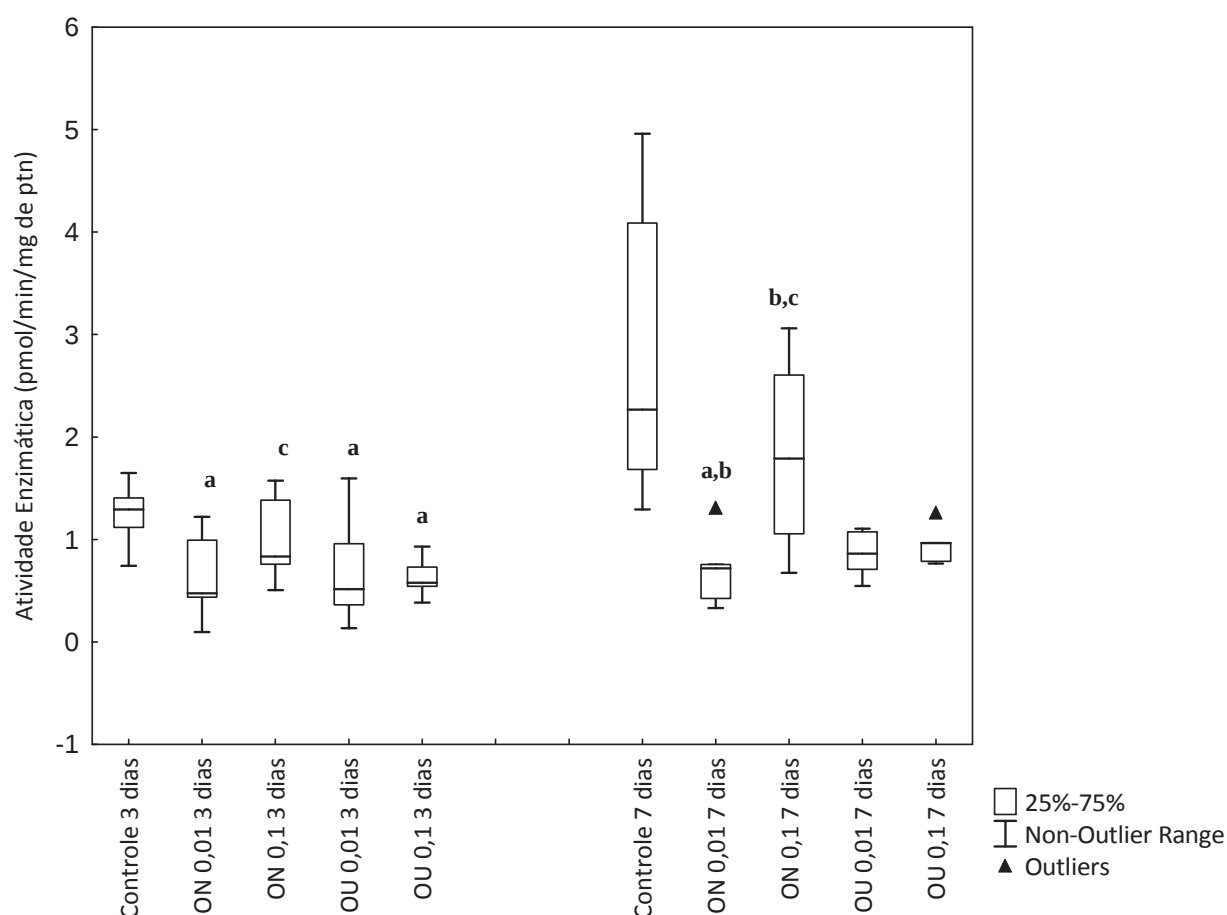


Figura 21. Atividade da EROD em brânquia de *O. niloticus*. Grupo controle e grupos expostos por 3 ou 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. a Diferença significativa em relação ao controle. b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.

Em relação à atividade da EROD na brânquia observamos uma inibição em relação ao controle tanto com três como com sete dias de exposição. O ON na concentração de 0,1 mL/L não foi capaz de inibir a EROD, mostrando que esta redução na atividade enzimática não foi dose-dependente, sendo que apenas a menor concentração do ON causou decréscimo da EROD, tanto com três como com sete dias de exposição (Figura 21).

Este padrão de inibição fica muito claro nos grupos expostos por sete dias ao ON a onde observa-se que a EROD foi inibida cerca de 45% mais no tratamento com os animais expostos a concentração de 0,01 mL/L em relação à concentração de 0,1 mL/L ($p = 0,017$).

Tabela 18. Análise de variância da atividade enzimática da EROD na brânquia de *O. niloticus*.

EROD			
EFEITO	F	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	3,097	4	0,033*
ATIVIDADE EM 7 DIAS	15,871*	4	0,032*

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$). Valores em negrito indicam aplicação de teste não-paramétrico (Kruskal-Wallis).

Comparando os dois períodos de exposição podemos observar que a atividade da EROD foi maior nos peixes expostos por sete dias à concentração de 0,1 mL/L em relação aos animais expostos por três dias à mesma concentração do ON (Figura 21 e Tabela 19).

Tabela 19. Comparação da atividade enzimática da EROD na brânquia entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,062*	0,681	0,006*	0,458

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$).

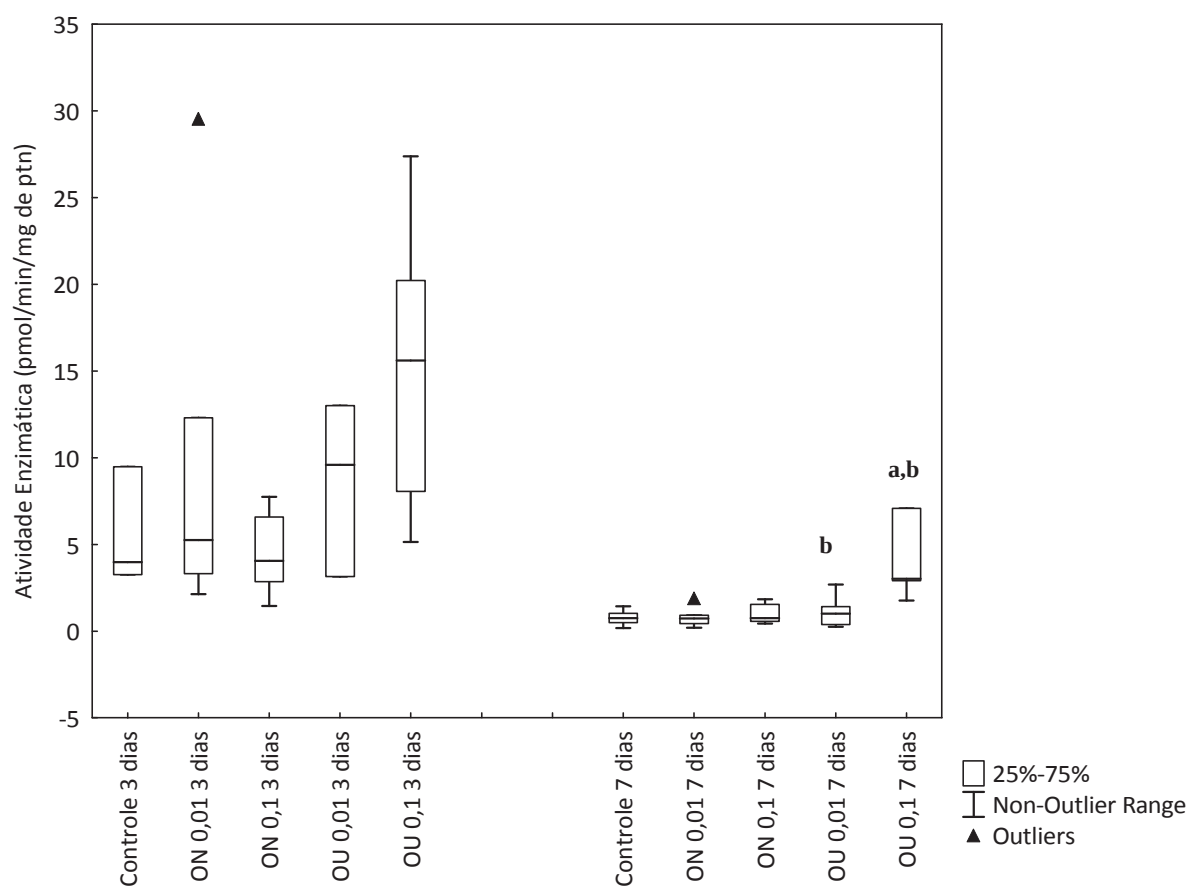


Figura 22. Atividade da EROD no fígado de *O. niloticus* controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. ^a Diferença significativa em relação ao controle. ^b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com diferentes concentrações. ^c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.

A atividade enzimática da EROD no fígado teve uma alta variância entre os indivíduos dos tratamentos com exposição por três dias, refletindo em erros muito elevados (Figura 22). Devido a esta alta variação, os dados foram considerados não-paramétricos, por não terem obedecido aos padrões de normalidade e homogeneidade para aplicação de testes estatísticos paramétricos (Tabela 20).

No experimento de sete dias foram encontradas diferenças significantes entre o controle e os tratamentos (Figura 22). Esta diferença está relacionada à indução da enzima no

tratamento com a maior concentração de óleo lubrificante usado (Figura 22). Também foi observada diferença entre os grupos expostos por sete dias às duas concentrações do óleo usado. Os indivíduos expostos a maior concentração do óleo usado tiveram uma diferença significativa em relação aos peixes expostos a menor concentração ($p = 0,01$), sendo que os animais apresentaram uma forte indução da EROD hepática.

As células normalmente respondem a concentrações realísticas de contaminantes através do aumento da atividade de enzimas de defesa, enquanto concentrações excessivas podem inibi-las (GOKSØYR, 1991).

Tabela 20. Análise de variância da atividade enzimática da EROD no fígado de *O. niloticus* através da aplicação de testes não-paramétricos.

EROD			
EFEITO	H	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	7,655	4	0,1050
ATIVIDADE EM 7 DIAS	11,319	4	0,0232*

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$).

Assim como foi visto para as brânquias, também foram encontradas diferenças significantes entre os dois períodos de exposição (Tabela 21). As diferenças foram observadas em todos os tratamentos, exceto no tratamento com a maior concentração do óleo usado.

Tabela 21. Comparação da atividade enzimática da EROD hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,0104*	0,0039*	0,275	0,0039*

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$). Valores em negrito indicam aplicação de teste não-paramétrico (Mann-Whitney).

Os resultados encontrados neste estudo não mostraram uma forte indução da atividade da EROD pelos tratamentos com óleos lubrificantes novos e usados, mesmo sabendo que os compostos utilizados apresentam HPAs em sua composição. Entretanto, alguns trabalhos têm mostrado que a indução do CYP1A em peixes através da exposição a HPAs com tamanho molecular pequeno (contendo 4 ou menos anéis aromáticos fundidos), tais como criseno, fenantreno, pireno e naftaleno é irregular e depende da espécie. Em experimentos *in vitro* com células de fígado de truta arco-íris expostas ao fenantreno, Bols e colaboradores (1999) não obtiveram resultados de indução da atividade do CYP1A. Entretanto, na literatura há trabalhos em que ocorre a indução da EROD pelo fenantreno em outras espécies de peixes tais como o bacalhau e linguado (GOKSØYR et al., 1986; STEGEMAN et al., 1998).

Do mesmo modo, o pireno e o criseno não causaram aumento da atividade EROD na truta arco-íris (BOLS et al., 1999) mas, novamente, na carpa a atividade foi induzida (VAN DER WEIDEN et al., 1994). Dessa maneira, fica evidente que a resposta a HPAs em particular, a compostos tendo inferior a 4 anéis aromáticos fundidos, não é uniforme entre diferentes espécies de peixes nem dentro da mesma espécie. Isto pode estar relacionado a variações intrínsecas na afinidade do receptor de hidrocarboneto-aril (Ahr) de diferentes espécies de peixes para moléculas de pequeno tamanho molecular. Também foram relatadas grandes variações na indução da atividade da EROD entre espécies de peixes tropicais e de águas temperadas (*O. niloticus* e truta arco-íris) (PATHIRATNE; GEORGE, 1996).

Uma outra explicação para este resultado é que talvez o tempo de exposição, não tenha sido suficiente para induzir a enzima em todos os tratamentos. Sabe-se que é necessário um determinado tempo para que ocorra transcrição dos genes ativados pelo receptor AhR. Além disso, o tipo de composto ligado ao receptor pode levar a padrões distintos de expressão CYP1A.

Associada a questão da irregularidade da indução da EROD por HPAs, temos que levar em conta a presença de outros compostos interagindo, podendo atuar de forma antagônica ou sinérgica. Como já comentado, o óleo lubrificante, tanto o novo como o usado contém metais pesados, porém, em diferentes proporções.

A atividade da EROD nas brânquias dos indivíduos tratados apresentou uma resposta curiosa. Observou-se que os animais expostos à menor concentração (0,01 mL/L) apresentaram uma maior inibição em comparação com os animais expostos a 0,1 mL/L. Este resultado repetiu tanto no experimento com período de exposição três dias como no de sete dias. Outros estudos também relataram este comportamento de misturas de HPAs que possuem um efeito maior em menores concentrações (NOGUEIRA et al., 2011; KOPECKA-PILARCZYK; CORREIA, 2009). Os resultados aqui encontrados também estão de acordo com os dados obtidos por Bucheli e Fent (1995) que observaram que a atividade da EROD poderia ser inibida a concentrações mais elevadas de alguns indutores, tais como β -naphthoflavona e determinados PCBs (GOKSØYR, 1991).

Os resultados aqui mostrados estão de acordo com um trabalho anterior de Bucheli e Fent (1995) onde observaram que a atividade do CYP1A poderia ser inibida com concentrações mais elevadas de alguns indutores, tais como alguns HPAs. Além disso, na literatura existem trabalhos que mostram que a atividade da EROD em fígado de peixe pode ser inibida por metais pesados (VIARENGO et al., 1997). Um dos trabalhos revela claramente uma significativa inibição da atividade da EROD em uma cultura de células do fígado de enguia exposta a Cr (VI), após *in vivo* ser exposta ao composto β -naphthoflavona (FBN) (OLIVEIRA et al., 2003)

De acordo com Eggens e colaboradores (1992), contaminação por metais pesados é uma possível explicação para as discrepâncias encontradas entre os níveis de xenobióticos orgânicos, por vezes observados em tecidos de peixes e a atividade da EROD. Esta explicação

pode ser apoiada por outros estudos, onde foi relatada de forma inesperada uma baixa atividade da EROD. Estes níveis baixos coincidiram com a presença de metais pesados no ambiente (ROMEO et al., 1994).

Comparando os tecidos, o fígado tem uma concentração muito mais elevada de EROD do que a brânquia. Podemos comparar as escalas dos gráficos dos dois tecidos e notar que o fígado apresenta cerca de cinco vezes mais EROD do que as brânquias. Portanto, o fígado ainda é o principal órgão responsável pela metabolização. Então a atividade e resposta mais baixa da brânquia podem ser explicadas pela inibição ocorrida, considerando que houve um aporte maior e imediato dos componentes dos óleos nesse tecido. No fígado, por ter uma capacidade maior de metabolizar compostos, responde melhor, induzindo a atividade. Além disso, os compostos que chegam via corrente sanguínea no fígado estão em uma concentração mais reduzida em relação às brânquias.

Viarengo e colaboradores (1997) demonstraram *in vitro* que a atividade da EROD no fígado de peixes, previamente induzida por tratamentos *in vivo* com exposição à xenobióticos orgânicos, pode ser afetada por concentrações micromolares de Hg^{+2} ou Cu^{+2} . De acordo com os resultados experimentais, deste trabalho a sensibilidade da atividade da EROD hepática utilizando como organismo teste o robalo a diferentes metais pesados pode ser ordenada como se segue: $\text{Hg}^{+2} < \text{Cu}^{+2} < \text{Zn}^{+2} < \text{Fe}^{+2} < \text{Cr (VI)}$.

Vários mecanismos para explicar a toxicidade do metal celular têm sido documentados. Os metais pesados podem alterar a atividade das enzimas através da ligação aos seus grupos funcionais (sulfidrilo, carboxilo, imidazol entre outros) ou através do deslocamento do metal associado com a enzima (VIARENGO, 1985).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que Cu^{+2} pode atuar tanto diretamente, como através de ligação em grupos SH de proteína, e indiretamente, pela indução de estresse oxidativo (VIARENGO et al., 1990; VIARENGO; NOTT, 1993; STOHS; BAGCHI, 1995).

Goksøyr e colaboradores (1994) mostraram que em peixes tratados com Fe^{+2} o fígado apresentava uma pronunciada inibição da atividade da EROD. Essa inibição pode ser explicada através da alteração de grupos SH de proteínas transmembrana e seu ambiente lipídico causada pela produção radicais de oxigênio produzidos pela reação de Fenton seguido pela lipoperoxidação. Além disso, os íons metais redox-ativos, tais como Cu^{+2} e Fe^{+3} estão envolvidos na oxidação de GSH, dando origem aos radicais tiol e hidroxil (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; STOHS; BAGCHI, 1995; LIOCHEV, 1999).

No fígado foi encontrado um comportamento diferente. O óleo lubrificante parece ter induzido a enzima no tratamento com a maior concentração do óleo usado. Além disso, as maiores atividades enzimáticas foram encontradas no menor período de exposição (três dias). Este fato pode estar relacionado com a adaptação do organismo à presença do contaminante, indicando que os animais foram capazes de lidar com as concentrações de HPAs presentes tanto no óleo lubrificante novo como usado diesel. Além disso, a concentração na água e no organismo, de HPAs pode ter diminuído ao longo do tempo, isso porque estes compostos podem ter sido metabolizados através dos processos de biotransformação e eliminados pelos peixes.

Através dos resultados obtidos podemos notar um claro padrão de inibição da EROD nas brânquias e um comportamento instável de indução no fígado. As enzimas podem apresentar diferentes padrões de comportamento dependendo do órgão analisado. Muitas vezes um determinado composto pode ter maior influência em um outro tecido. No caso da brânquia parece que os metais influenciaram mais do que os hidrocarbonetos aromáticos presentes tanto no ON como no OU. Já no fígado, podemos inferir que tenha ocorrido uma competição entre os componentes umas vezes induzindo, outra inibindo.

Em relação aos óleos lubrificantes, podemos notar que a EROD foi mais responsiva com o OU. No caso das brânquias onde foi observada inibição da enzima, o padrão de

decréscimo foi relativamente maior com as concentrações do OU. Assim como no caso do fígado que teve uma indução, esta foi observada nos peixes expostos ao OU.

1.1. ETÓXIRESORUFINA- O-DESETILASE *IN VITRO*

Vários fatores podem influenciar a atividade do citocromo P450 em peixes e a sua consequente análise. Os altos desvios encontrados podem ter diversas explicações que vão desde diferenças nas respostas dos indivíduos a um composto, o nível de estresse do animal, a preparação do tecido, conservação da amostra, até as condições da execução do ensaio (NICARETA, 2004).

Para entender melhor a relação existente entre os compostos presentes nos contaminantes e a resposta encontrada em organismos *in vivo* foi realizado um teste *in vitro* com tecido hepático com a EROD previamente induzida por óleo diesel. A temperatura é provavelmente o fator abiótico dominante que exerce influência sobre o citocromo P450, por este motivo foi realizado o teste de temperatura previamente.

O teste de temperatura realizado antes da incubação da amostra foi feito para o mesmo *pool* de amostras do trabalho publicado por Nogueira e colaboradores (2011). Neste trabalho foi observado que a atividade da EROD permanecia estável após a incubação das amostras a 37 °C durante 1 hora. A atividade da enzima também se manteve estável em todas as medições realizadas cada 10 minutos.

Após a incubação dos extratos proteicos das amostras de tecido hepático com a EROD induzida previamente *in vivo* com concentrações crescentes de óleo lubrificante novo e usado, foi observada uma inibição significativa da atividade da EROD (Figura 23).

Os resultados mostraram os dois tipos de óleos foram capazes de inibir a atividade da EROD. Entretanto, o óleo lubrificante usado teve um efeito inibitório maior sobre a enzima do que o ON. Enquanto a menor concentração de óleo (0,25%) novo inibiu cerca de 15%, o

OU, na mesma concentração inibiu 60% da atividade enzimática. Através do gráfico, nota-se que o padrão de inibição da atividade enzimática foi dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração do óleo incubado na amostra, maior o grau de inibição. Este padrão foi encontrado tanto para o óleo lubrificante novo, como para o usado. Esta inibição da EROD foi relatada por Nogueira e colaboradores (2011), porém com exposição a óleo diesel.

O óleo lubrificante, assim como o diesel, é uma mistura complexa de vários compostos derivados do petróleo (VIEIRA et al., 2007) e de outros compostos, entre eles os metais. Diversos trabalhos já mostraram que HPAs, normalmente, induzem a EROD *in vivo*. Quando o animal está vivo, uma série de respostas e o comportamento de algumas enzimas podem ser diferentes. Isso porque existem interações entre outros tecidos e órgãos (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). Além disso, apesar da EROD não perder atividade no decorrer do experimento, comprovado pelo teste de temperatura, outros fatores podem estar sendo inibidos com o descongelamento das amostras o que poderia alterar a resposta final da EROD.

Entretanto, o óleo lubrificante usado causou uma maior inibição da enzima em relação ao ON. Nas amostras incubadas com o OU a redução da atividade foi cerca de 40% maior do que nas amostras incubadas com o ON. A explicação para este fato é que o óleo lubrificante usado passou por um processo de queima o fazendo com que novos compostos surjam e a concentração de determinadas substâncias aumente dentro da mistura.

Além disso, sabe-se que os HPAs são produzidos a partir da combustão de vários compostos, entre eles os derivados de petróleo (AN; SHIN; CHOI, 2008). Portanto, novos HPAs podem ter sido produzidos com o decorrer do uso do óleo lubrificante dentro do motor. Esses novos HPAs podem ser os responsáveis pelo aumento da inibição da EROD no teste *in vitro*.

Ainda devemos considerar que no teste *in vitro* há maior exposição do tecido hepático ao óleo lubrificante, o que o torna semelhante à brânquia, uma vez que o contato com metais e outros inibidores é maior do que no tecido hepático *in vivo*.

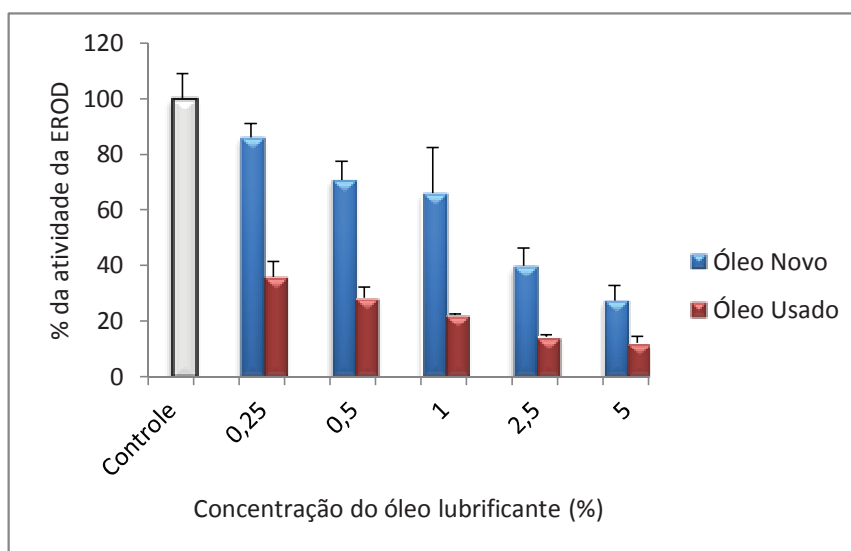


Figura 23. Porcentagem da inibição da atividade da EROD no fígado de *O. niloticus* de acordo com o aumento da concentração do óleo lubrificante novo e usado.

Estudos de biotransformação em peixes revelaram que a exposição aos HPAs induz um aumento na concentração de CYP1A e, portanto, na sua atividade catalítica (WHYTE et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Entretanto, outros trabalhos mostram que a concentração tem um papel fundamental, sendo que alguns HPAs e outras substâncias em concentrações elevadas podem levar a inibição da enzima (NOGUEIRA et al., 2011; KOPECKA-PILARCZYK; CORREIA, 2009).

A maior inibição ocorrida com o OU no teste *in vitro* realizado pode ser explicada através de ligação direta no sítio catalítico no caso dos metais presentes no óleo lubrificante novo e usado, porém, provavelmente maior no OU pelo aumento da concentração dos metais, devido ao desgaste do motor; ou ainda pela interferência de HPAs ou outras substâncias.

1.2. GLUTATIONA-S-TRANSFERASE *IN VIVO*

Nas brânquias nota-se um aumento da atividade da GST em relação ao controle no experimento de três dias (Figura 24) em todos os grupos expostos. O inverso do que ocorreu no experimento com sete dias de exposição, onde parece que há um decréscimo da atividade desta enzima no tratamento com menor concentração do OU (Figura 24).

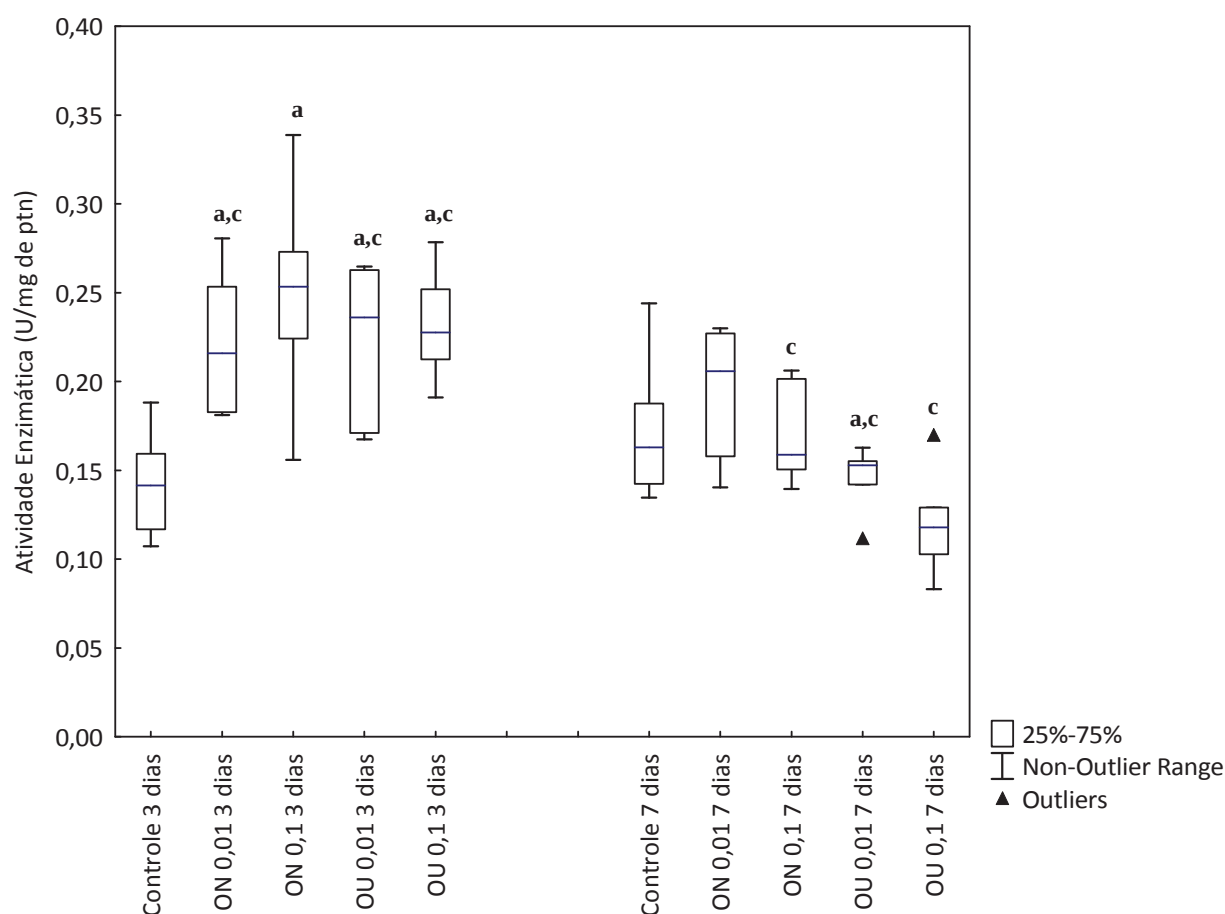


Figura 24. Atividade da GST em brânquias de *O. niloticus* controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L. a Diferença significativa em relação ao controle. b Diferença significativa em relação ao grupo exposto ao mesmo contaminante com maior concentração. c Diferença significativa entre os tempos de exposição para o mesmo grupo.

Tabela 22. Análise de variância da atividade enzimática da GST na brânquia de *O. niloticus*.

GST			
EFEITO	F	GL	P
ATIVIDADE EM 3 DIAS	5,4637	4	0,0028*
ATIVIDADE EM 7 DIAS	4,6578	4	0,0063*

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$).

Em relação ao tempo de exposição foi encontrado um padrão de inibição na atividade da GST. Os peixes expostos por três dias tiveram uma maior atividade da GST do que os peixes expostos por sete dias. Foram encontradas diferenças significantes em relação aos tratamentos com OU com as duas concentrações e no tratamento com a menor concentração do ON (Tabela 23).

Tabela 23. Comparação da atividade enzimática da GST nas brânquias entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,085	0,035*	0,0005*	0,0007*

Nota: *Valores significantes ($p < 0,05$).

No fígado não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no período de três dias de exposição ($F = 1,289$; $gl = 4$; $P = 0,301$) nem no período de sete dias de exposição ($F = 0,4535$; $gl = 4$; $P = 0,7688$).

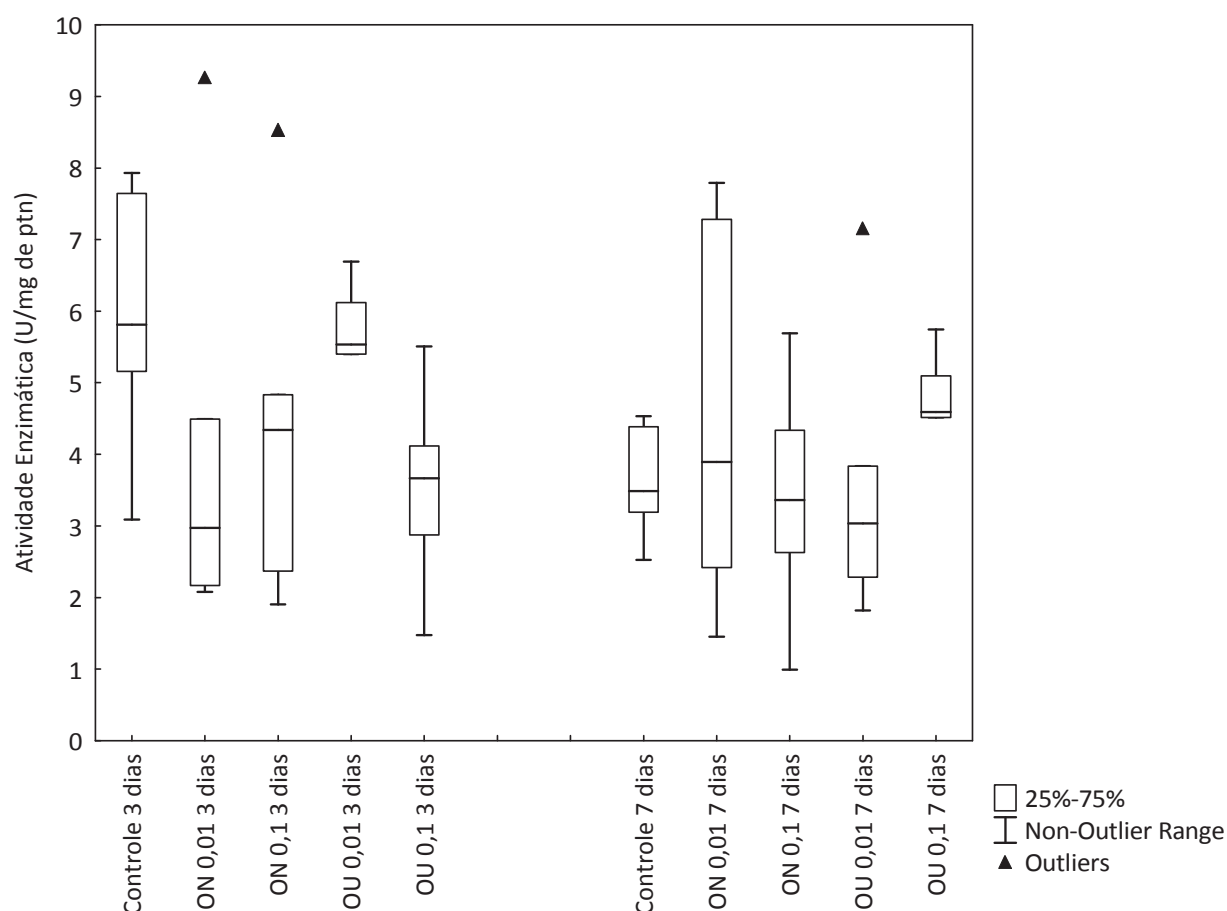


Figura 25. Atividade da GST em fígado de *O. niloticus* controle e expostas por 3 e 7 dias ao ON e OU, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mL/L.

Diferente das brânquias, no fígado não houve nenhuma diferença entre os tratamentos em relação ao tempo de exposição aos contaminantes (Tabela 24).

Tabela 24. Comparação da atividade enzimática da GST hepática entre os períodos de 3 e 7 dias de exposição de mesmo tratamento.

GRUPO	ON (0,1 mL/L)	ON (0,01 mL/L)	OU (0,1 mL/L)	OU (0,01 mL/L)
P	0,415	0,771	0,348	0,134

A GST é uma família de enzimas que tem uma forte atuação no fígado. Estudos mostram que a GST hepática é responsiva à exposição de HPAs e metais (ZHANG et al., 2004). O esperado era que esta enzima fosse induzida neste órgão. Entretanto, os efeitos

observados na atividade da GST foram nas brânquias e não no fígado. Entretanto, assim como no caso da EROD a concentração desta enzima é muito maior no tecido hepático (Figura 24 e Figura 25). Portanto, a não observação de mudanças na concentração deste órgão pode ser plausível no sentido de que os compostos chegam em menor quantidade neste órgão em relação às brânquias e pelo fato do fígado ter uma concentração suficiente de enzimas para biotransformar àquelas que estão chegando.

Segundo Simonato e colaboradores (2008) as brânquias são consideradas uma importante região para a excreção de compostos. Esse aumento da GST nas brânquias nos grupos expostos por três dias pode ter produzido uma maior quantidade de conjugados da GSH, formando assim, moléculas menos tóxicas e mais solúveis que seriam mais facilmente excretáveis por esse órgão. Atividade extra-hepática GST tem sido demonstrada em várias espécies, os outros órgãos envolvidos são o intestino e as brânquias (MALINS; OSTRANDER, 1993).

No caso da inibição ocorrida nas brânquias dos organismos expostos por sete dias Regoli e colaboradores (1998), sugerem que esta inibição pode estar envolvida com a desestabilização da membrana lisossômica provocada pela exposição aos metais ou ao estresse de radicais livres. Esta desestabilização pode causar a ruptura da membrana e liberar diversos outros radicais e íons ácidos, que prejudica o funcionamento normal da enzima em questão.

Em estudos anteriores realizados com o peixe *Carassius auratus* a atividade hepática da GST aumentou após quatro dias de exposição à fração solúvel do óleo diesel em água (ZHANG et al., 2004). No entanto, Zhang e colaboradores (2003 e 2004) constataram uma inibição da atividade desta enzima a partir de 40 dias de exposição à mesma fração solúvel. Esses resultados mostram que a resposta deste biomarcador bioquímico pode variar em função do tempo de exposição ao xenobiótico. No caso deste trabalho, o tempo de exposição

foi importante para a resposta da GST na brânquia que mostrou uma indução após três dias e inibição depois de sete dias.

Mesmo constatando a indução da GST em outros trabalhos, este padrão é altamente complexo e envolve tanto o metabolismo (ativação e desativação) do agente indutor, como também o controle de funcionamento de regiões laterais dos genes que codificam isoformas diferentes de GST. Como foram utilizadas misturas complexas (óleo lubrificante novo e usado) é difícil apontar a causa da indução, inibição ou mesmo o fato da GST se apresentar não responsiva aos contaminantes aqui utilizados.

1.3. GLUTATIONA-S-TRANSFERASE *IN VITRO*

Diferentes enzimas possuem maneiras variáveis de se comportar frente à temperatura. Por este motivo, também foi realizado o teste de temperatura antes da realização do teste *in vitro* da GST na presença do ON e do OU.

O teste de temperatura feito foi o mesmo realizado no teste *in vitro* da EROD. O objetivo deste teste é avaliar se a atividade enzimática continua estável após o período de 1 hora na temperatura de 37 °C.

Após analisar os dados obtidos no teste de temperatura da GST obtivemos o gráfico abaixo. Nota-se uma clara inibição da GST em relação ao tempo de incubação do *pool* de amostras utilizado. Por este motivo o teste *in vitro* não pode ser realizado, uma vez que a estabilidade da atividade enzimática é essencial para a realização do teste sugerido.

Erro! Vínculo não válido.

Figura 26. Gráfico obtido através do teste de temperatura da GST. Redução da atividade da enzima após 60 minutos incubada a 37 °C.

2. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da análise da EROD e da GST permitem concluir que o OU possui um maior grau de toxicidade para esta espécie no presente delineamento experimental. Enquanto a atividade da EROD apresenta um padrão de inibição nas brânquias em ambos os períodos de exposição, no fígado ocorre uma indução da enzima nos tratamentos com três dias de exposição e no grupo de animais expostos por sete dias à maior concentração de OU.

A GST nas brânquias apresentou um comportamento de indução nos grupos expostos por três dias e inibição nos grupos expostos por sete dias. No fígado não observa-se nenhum padrão evidente de alteração da atividade. Isso mostra novamente, que o tempo de exposição é uma variável importante a ser considerada em estudos de toxicologia.

O teste *in vivo* realizado revela que essas enzimas foram mais responsivas à menor concentração dos contaminantes utilizados no experimento. Isso revela que a menor concentração pode ter um efeito tóxico maior no organismo do que a maior concentração dos compostos.

O teste *in vitro* feito com células hepáticas para analisar a atividade da EROD mostrou que existem diferentes mecanismos de toxicidade atuando em situações *in vivo* e *in vitro*. *In vitro* o óleo lubrificante tem um forte poder de inibição da enzima. O padrão de inibição observado é dose-dependente. Além disso, nota-se que o OU tem uma capacidade de inibir a EROD com mais eficiência do que o ON.

DISCUSSÃO GERAL

Para ter uma visão geral das informações mostradas neste trabalho, foi feita uma discussão geral, mostrando algumas correlações encontradas entre os dados analisados.

Nas brânquias dos animais tratados durante três dias observa-se que a GST teve um aumento em todos os tratamentos, enquanto a EROD teve um decréscimo para as duas concentrações do OU e para a menor concentração do ON. A CAT também teve sua atividade reduzida entre os animais expostos à concentração de 0,1 mL/L (Tabela 25).

Tabela 25. Alterações das enzimas analisadas na brânquia para cada tratamento do período de 3 dias.

	CAT	GPx	LP	GST	EROD
0,01 mL/L ON	-	-	-	↑	↓
0,1 mL/L ON	-	-	-	↑	-
0,01 mL/L OU	-	-	-	↑	↓
0,1 mL/L OU	↓	-	-	↑	↓

Os grupos de peixes expostos pelo período de sete dias apresentaram alguns comportamentos inversos aos tratados por três dias. A GST que apresentou indução em todos os tratamentos com três dias, agora revela uma inibição no tratamento de 0,01 mL/L de OU e nenhuma alteração nos outros grupos. A atividade da CAT teve um aumento em todos os grupos, exceto pelo tratamento com a maior concentração do OU. Justamente aquele que sofreu inibição com três dias de exposição. Já a EROD continua com o mesmo padrão de decréscimo, porém apenas no grupo tratado com 0,01 mL/L de ON (Tabela 26).

Tabela 26. Alterações das enzimas analisadas na brânquia para cada tratamento do período de 7 dias.

	CAT	GPx	LP	GST	EROD
0,01 mL/L ON	↑	-	-	-	↓
0,1 mL/L ON	↑	-	-	-	-
0,01 mL/L OU	↑	-	-	↓	-
0,1 mL/L OU	-	-	-	-	-

A questão do decréscimo na atividade já foi relatada na literatura. Vários indutores da síntese de CYP1A também podem inibir a atividade catalítica de EROD (STEGEMAN; HAHN, 1994), quando presentes em elevadas doses (HAASCH et al., 1993). Além disso, outros componentes presentes no óleo lubrificante, tanto no novo como no usado, como os metais podem inibir a EROD (VIARENGO et al., 1997).

Algumas evidências sugerem que a indução da GST está além da proteção contra substâncias químicas de origem desconhecida. Elas também estão envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo. Estudos relacionam a resposta causada pela tentativa de infecção de microrganismos com uma rápida indução de GST causada pelo acúmulo de H_2O_2 (DUDLER et al., 1991; LEVINE et al., 1994).

No caso deste trabalho como a GPx não foi induzida e a CAT foi inibida na brânquia na maioria dos tratamentos com três dias de exposição, a GST pode ter sido induzida para compensar e combater o estresse oxidativo causado tanto pelo ON como pelo OU. Porém, após um tempo maior de exposição a expressão de determinadas proteínas pode se alterar. É o que os resultados dos grupos expostos por sete dias nos revela. Na maioria dos tratamentos a GST não responde à presença dos contaminantes, ou ainda é inibida, no caso do tratamento com a menor concentração de OU. Entretanto, nestes tratamentos onde a GST não possui sua atividade alterada, a CAT foi induzida para suprir a necessidade de uma defesa antioxidante.

No fígado a única enzima que sofreu alteração frente aos tratamentos foi a EROD. A alteração relatada foi uma indução nos dois tratamentos expostos ao OU por três dias e entre os animais tratados com 0,1 mL/L de OU durante sete dias (Tabela 27 e Tabela 28).

Tabela 27. Alterações das enzimas analisadas no fígado para cada tratamento do período de 3 dias.

	CAT	GPx	SOD	G6PDH	LP	GST	EROD
0,01 mL/L ON	-	-	-	-	-	-	
0,1 mL/L ON	-	-	-	-	↑	-	-
0,01 mL/L OU	-	-	-	-	-	-	↑
0,1 mL/L OU	-	-	-	-	-	-	↑

Tabela 28. Alterações das enzimas analisadas no fígado para cada tratamento do período de 7 dias.

	CAT	GPx	SOD	G6PDH	LP	GST	EROD
0,01 mL/L ON	-	-	-	-	-	-	-
0,1 mL/L ON	-	-	-	-	-	-	-
0,01 mL/L OU	-	-	-	-	-	-	-
0,1 mL/L OU	-	-	-	-	-	-	↑

Na literatura há diversos relatos que a exposição de peixes e outros organismos aquáticos a HPAs induz um aumento na concentração do CYP1A (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2006; ABRAHAMSON et al., 2008; HAGGER et al., 2006). Dessa forma, a EROD é considerada um biomarcador de exposição altamente sensível a este tipo de poluente (WHYTE et al., 2000). Os HPAs estão presentes no petróleo e seus derivados, como o

composto testado. A existência de HPAs mais concentrados ou em diferentes proporções no OU pode ter causado a elevação na atividade da EROD.

Entretanto, sabe-se que os HPAs mais leves (2-3 anéis benzênicos), como o naftaleno, acenafteno e fluoranteno, são mais hidrossolúveis, tornando-se mais biodisponíveis e causando uma maior toxicidade aguda nos organismos. Já os HPAs mais pesados (4-10 anéis benzênicos), como o pireno, benzo[*a*]pireno e benzo[*a*]antraceno, são menos hidrossolúveis e menos disponíveis, porém causam uma maior toxicidade crônica na biota, por serem mais lipossolúveis (MEIRE et al., 2007). Por este motivo, os peixes podem ter tido um comportamento não responsivo devido às elevadas concentrações destes HPAs no óleo.

Os dados disponíveis acerca da indução de CYP1A nos peixes, por HPAs de pequeno tamanho, com 4 ou menos anéis aromáticos fundidos, disponibilizaram resultados não consensuais, sendo essas respostas dependentes da espécie testada (SHAILAJA; D'SILVA, 2003).

A CAT e a SOD hepáticas demonstram um comportamento bem semelhante (Figura 13 e Figura 11). Isso porque elas estão diretamente relacionadas. Uma superexpressão da SOD resulta na excessiva produção de peróxido de hidrogênio, que pode mediar dano às membranas através da peroxidação lipídica ou reagir com ferro para gerar radical hidroxil via reação de Fenton, com diminuição da viabilidade celular (PODEROSO et al., 1996). A CAT sendo induzida também irá converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, diminuindo, portanto, possíveis danos celulares.

O substrato da SOD é o radical superóxido gerado normalmente nos organismos aeróbicos, durante o processo de oxidação. Por esse motivo, o primeiro impasse para a realização de um teste dessa enzima é a disponibilização do radical livre, que deverá ser gerado no processo de estudo (FLOHÉ; ÖTTING, 1984). Isso pode explicar o fato da SOD não ter sua atividade elevada no presente estudo.

A extensão dos danos biológicos causados pela geração de radicais livres pode ser minimizada pelas defesas antioxidantes, ou seja, a LP é normalmente observada na ausência de defesas antioxidantes eficientes. Assim, podemos notar uma relação entre uma baixa taxa, mesmo que não seja estatisticamente relevante, de atividade no fígado das enzimas antioxidantes CAT (Figura 13), GPx (Figura 15), SOD (Figura 11), e G6PDH (Figura 16) e um maior grau de peroxidação lipídica nos peixes dos grupos expostos as duas concentrações de ON e da maior concentração do OU.

Um dado interessante foi que nos pontos onde não houve aumento da GST ocorreu aumento da LP, sugerindo que os poluentes ali presentes não estão sendo conjugados. Resultado semelhante ocorreu em pesquisa realizada por Regoli e colaboradores (2005), em *Pleuragramma antarcticum*, onde foi evidenciado produtos da LP em grupos tratados com benzo[*a*]pireno sem que tenha ocorrido resposta da GST, isso por que uma conjugação inadequada leva a um acúmulo de metabólitos reativos de oxigênio causando lesão celular. No estudo de Shailaja e D'Silva (2003) realizado com exposição de *Oreochromis mossambicus* à HPAs, mostrou indução da atividade da GST quando submetidas a altas concentrações, entretanto, para as baixas concentrações de HPAs parece haver uma inadequada conjugação dos metabólitos reativos, levando a danos nos tecidos.

CONCLUSÕES FINAIS

1. No geral os resultados foram similares, inclusive considerando que a CAT aumentou nas brânquias após sete dias nos dois tratamentos, porém o aumento do MDA no ON e não no OU, sugere que houve estresse oxidativo apenas com o ON.
2. Observa-se que no fígado o estresse oxidativo foi mais evidente do que nas brânquias.
3. O nível de peroxidação lipídica nos animais expostos por três dias ao ON foi maior em relação ao OU na concentração de 0,1 mL/L.
4. Em relação à EROD e à GST, nota-se que o OU exerceu um maior efeito tóxico. A EROD no fígado foi induzida, enquanto nas brânquias o padrão foi de inibição. A GST nas brânquias apresentou um comportamento de indução nos grupos expostos por três dias e inibição nos grupos expostos por sete dias.
5. O teste *in vitro* da EROD mostrou que o óleo lubrificante tem um forte poder de inibição da enzima. A inibição é dose-dependente, sendo que o OU consegue inibir a EROD com maior eficiência do que o ON.
6. Ficou claro que os principais efeitos causados pelos dois contaminantes testados foram observados nos grupos expostos por três dias, sendo que com sete dias com a maioria das enzimas não foram observadas resposta exceto o aumento da CAT nas brânquias.
7. Em relação às concentrações utilizadas houve variação nas respostas dos animais, sendo que na maioria delas a menor concentração causou mais efeitos observáveis do que a maior concentração.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ecossistemas aquáticos são frequentemente impactados pelos mais diversos tipos de poluentes e os efeitos tóxicos destas moléculas em diferentes espécies precisam ser bem conhecidos para que se compreenda como evitar este impacto ou minimizá-lo, protegendo a vida e a saúde dos ecossistemas. Ainda que haja uma legislação que regularize o destino de óleos lubrificantes a contaminação do ambiente por estes compostos ocorre devido à falta de revisões e manutenções periódicas. Tais óleos podem ser posteriormente carregados pelas chuvas inserindo-se nos ambientes aquáticos e causando efeitos prejudiciais à biota.

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem com dados inéditos a respeito dos efeitos do óleo lubrificante novo e principalmente do óleo usado, sendo este a principal fonte de contaminação por esses compostos. A espécie *O. niloticus*, escolhida para a realização deste estudo foi de grande importância pelo fato de ser uma espécie bem conhecida, muito consumida pela população e que tem sido amplamente estudada pela toxicologia.

A interpretação das respostas obtidas neste estudo é um desafio porque são induzidas por muitos contaminantes. As análises bioquímicas mostraram que tanto o óleo lubrificante novo como o usado, interfere no metabolismo destes animais, podendo causar diferentes efeitos, sejam eles sinérgicos ou antagônicos. É importante ainda destacar que, apesar das dificuldades relacionadas à interpretação dos resultados, estudos como este que utilizam misturas complexas são extremamente relevantes para que se conheça o estado de saúde dos organismos expostos.

Outros estudos devem ser financiados para que se conheça melhor o potencial tóxico dos óleos lubrificantes em diferentes espécies. Isto porque os investimentos na área de toxicologia ainda são limitados, ao contrário dos crescentes investimentos relacionados à produção, utilização e melhoramento destes compostos, sendo que estes investimentos levam

ao aumento da aditivação e consequentemente a adição de mais substâncias potencialmente tóxicas em sua composição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSON, A. et al. Monitoring contaminants from oil production at sea by measuring gill EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Environmental Pollution**, v.153, p.169-175. 2008.
- 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 2003.
- ALMEIDA, E.A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.135C, n.3, p. 295-303, 2003.
- ALMEIDA, E.A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposure to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p.386-392, 2004.
- ALMEIDA, E.A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. **Jornal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.318, p.21-30, 2005.
- ALMEIDA, J.S.; MELETTI, P.C.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of sediments taken from an urbanstream on physiological and biochemical parameters of neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.140C, p.356-363, 2005.
- ALVES-COSTA, J.R.M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 2001. 125 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- AN, K.W.; SHIN, H.S.; CHOI, C.Y. Physiological responses and expression of metallothionein (MT) and superoxide dismutase (SOD) mRNAs in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposure to benzo[a]pyrene, **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v.149, p.534-539, 2008.
- APROMAC. Associação de Proteção ao Meio Ambiente de Cianorte. Gerenciamento de óleos lubrificantes usados ou contaminados. Curitiba: Senai, 2009.
- APROMAC. Associação de Proteção ao Meio Ambiente de Cianorte. Relatório de Gestão no Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA: justificativa da opção pelo rerrefino. Cianorte: APROMAC, 2005.

- ARIAS, A.R.L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e saúde coletiva**, v.12, p.61-72, 2007.
- ARINÇ, E.; SEN, A.; BOZCAARMUTLU, A. Cytochrome P4501A and associated MFO induction in fish as a biomarker for toxic, carcinogenic pollutants in the aquatic environment. **Pure and Applied Chemistry**, v.72, p.985-994, 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR1004: resíduos sólidos - classificação. Rio de Janeiro, 2004.
- ATLI, G. et al. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.143, n.2, p.218-224, 2006.
- ATLI G; CANLI M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.145, p.282-287, 2007.
- BALLESTEROS, M.L.; WUNDERLIN, D.A., BISTONI, M.A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.199-205, 2009.
- BAÑO, Y.; HASAN, M. Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish *Heteropneustes fossilis*. **Journal of Environmental Science and Health**, v.24, p.145-166, 1989.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.
- BAINY, A.C.D. et al. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a pollutant site. **Aquatic Toxicology**, v.34, p.151-162, 1996.
- BEBE, F.N.; PANEMANGALORE, M. Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissue of rats. **Journal of Environmental Science and Health**, v.38, p.349-363, 2003.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.47, p.233-261, 1996.
- BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, 1975.

- BIEGER, T.; HELLOU, J.; ABRAJANO, T.A. Petroleum biomarkers as traces of lubricating oil contamination. **Marine Pollution Bulletin**, v.32, p. 270-274, 1996.
- BOLS, N.C. et al. Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in a trout liver cell line. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, p.118-128, 1999.
- BORIN, A.; POPPI, R.J. Multivariate quality control of lubricating oils using Fourier transform infrared Spectroscopy. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.15, n.4, p.570-576, 2004.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA N° 326, DE 25 DE ABRIL DE 2003. Ministério do Meio Ambiente.
- BRASIL. Ministério do meio ambiente. Projeto programa piloto para a minimização dos impactos gerados por resíduos perigosos. Documento 3 – Gestão de óleo lubrificante automotivo usado em oficinas automotivas. SENAI, Pernambuco. 2006.
- BROWN, R.J. Determination of trace metals in petroleum and petroleum products using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.38, p.283-289, 1982.
- BUCHELLI, T.D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.25, p.201-268, 1995.
- BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. **Drug metabolism and Disposition**, v.2, p.583-588, 1974.
- BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. **Biochemical Pharmacology**, v.34, p.3337, 1985.
- CAIRNS, JR, J.; NIEDERLEHNER, B., BIDWELL, J.R. Ecological toxicity testing. In: MEYERS, R.A. (Ed.). **Encyclopedia of environmental analysis and remediation**. New York: John Wiley & Sons, 455p. 1998.
- CALOW, P. **Handbook of ecotoxicology**. Oxford: Blackwell Sciences, v.1, p.478, 1993.
- CAMARGO, A. Óleos Lubrificantes e Preservação. O Mundo da Usinagem, 4 ed. 2003. Disponível em <<http://www.omundodausinagem.com.br>>. Acesso em 14 mai. 2012.

- CANCIO, I.; ORBEA, A.; VÖLKL, A. Induction of peroxisomal oxidases in mussels. Comparison of effects of lubricant oil and Benzo(a)pyrene with two typical peroxisome proliferators on peroxisome structure and function in *Mytilus galloprovincialis*, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.149, p.64-72, 1998.
- CHANDRAN R, et al. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.140, p.422-426, 2005.
- CHEUNG, C.C.C. et al. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, v.52, p.189-203, 2001.
- COMMANDEUR, J.N.M., STIJNTJES, G.J.; VERMEULEN, N.P.E. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione Sconjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. **Pharmacological Review**, v.47, p.271-330, 1995.
- DAGGETT, D.A. et al. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. **Toxicology**, v.128, p.191-206, 1998.
- DAMIENS, G. et al. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. **Chemosphere**, v.66, p.574-583, 2006.
- Departamento de Tecnologia da Texaco Brasil LTDA., Fundamentos de Lubrificação. Jun. 2005.
- DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. Edgard Blucher (eds). São Paulo, p.521-523, 2003.
- DI GIULLIO, R.T. et al. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.8, p.1103-1123, 1989.
- DI GIULIO, R.T. et al. Biochemical Mecanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. London: Taylor & Francis, 1995.
- Disponível em: <http://www.orbiquimica.com.br/arquivos/boletim/36_30.pdf>, acessado em 14 de mai. De 2012.
- Disponível em: <www.fecombustiveis.org.br>, acessado em 14 de mai. de 2012.
- Disponível em: <www.petroquimicasul.com.br>, acessado em 14 de mai. de 2012.

- DIXON, D.P.; LAPTHORN, A. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v.3, p.1-10, 2002
- DUDLER, R. et al. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, p.14-18, 1991.
- EKANEM, E.J.; LORI, J.A.; THOMAS, S.A. The determination of wear metals in used lubricating oils by flame atomic absorption spectrometry using sulphanilic acid as ashing agent. **Talanta**, v.44, n.11, p.2103-2108, 1997.
- EGGENS, M.; et al. Hepatic EROD activity in dab *Limanda limanda* in the German Bight using an improved plate-reader method. **Marine Ecology Progress Series**, v.91, p.71-75, 1992.
- EPA Quality criteria for water 1986. EPA 440/5-86-001. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 1987.
- ESCOBAR, J.A.; RUBIO, M.A.; LISSI, E.A. SOD and Catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. **Free Radical in Biology and Medicine**, v.20, n.3, p.285-290, 1996.
- ESPÍNDOLA, E.L.G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C.B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J., ESPÍNDOLA, E.L.G. **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. p.129-148, 2003.
- FENET, H.; CASELLAS, C.; BONToux, J. Laboratory and field caging studies on hepatic enzymatic activities in european eel and rainbow trout. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.40, p.137-143, 1998.
- FERNANDES, D. et al. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). **Environmental Research Section**, v.90, p.169-78, 2002.
- FILHO, D.W. et al. Seasonal changes antioxidant defences of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). **Aquaculture**, v.203, 149-158, 2001.
- FITZPATRICK, P.J. et al. Assessment of a glutathione S-transferase and related protein in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as a potential organic pollution biomarkers. **Biomarkers**, v.2, p.51-56, 1997.
- FLOHÉ L.; ÖTTING F. Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*, v.105, p.93-104. 1984.
- FONTENELLE, T. Rerrefino: um enfoque ecológico. **Lubes em Foco**, Ano I, n.2, p.14-20. 2007.

- FORTUÑO, A. et al. Oxidative stress and vascular remodelling. *Experimental Physiology*, v.90, n.4, p.457-462, 2005.
- FOTH, H.; KAHL, R.; KAHL, G.F. Pharmacokinetics of low doses of benzo[*a*]pyrene in the rat. **Food Chemistry & Toxicology**, v.26, p.45-51, 1988.
- GLOCK, G.E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphste dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver, **Biochemical Journal**, v.55, p.400-408, 1953.
- GOKSØYR, A., SOLBAKKEN, J.E., KLUNGSØYR, J. Regioselective metabolism of phenanthrene in Atlantic cod (*Gadus morhua*): studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v.60, p.247-263, 1986.
- GOKSØYR, A. et al. Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone-inducible cytochrome P450 (P4501A) in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.9, p.1-13, 1991.
- GOKSØYR, A.; BJORNEVIK, M.; MAAGE, A. Effects of dietary iron concentrations on the cytochrome P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.51, p.315-319, 1994.
- GRAVATO, C. et al. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. – the influence of pre-exposure to β -naphthoflavone. **Chemosphere**, v.66, n.7, p.1284-1291, 2006.
- HAASCH, M.L. et al. Hepatic CYP1A induction in rainbow trout by continuous follow-through exposure to β -naphthoflavone. *Toxicology Science*, v.20, p.72-82, 1993.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Biological Chemistry**, v.249, p.7130-7139, 1974.
- HAGGER, J. et al. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.2, p.312-329, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, 851p. 2007.
- HANSEN, B.H. et al. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.143, p.263-274, 2006.

- HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Rahway, p.146-147, 1989.
- HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione Transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45, p.51, 2005.
- HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Review Biochemistry Molecular Biology**, v.30, p.445-600, 1995.
- HILLIGOSS, D.; O'LEAR, D. Analysis of wear metals and additive package elements in new and used oil using the optima 4300 DC ICP-OES. **Atomic Spectroscopy**, v.22, n. 2, p.276-279, 2001.
- HUGGETT, R.J. et al. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.
- HUTCHINSON, T.H.; FIELD, M.D.R.; MANNING, M.J. Evaluation of nonspecific immune functions in dab, *Limanda limanda* L., following short-term exposure to sediments contaminated with polyaromatic hydrocarbons and/or polychlorinated biphenyls. *Marine Environmental Research*, v.55, p.193-202, 2003.
- HYLLAND, K. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A: Current Issues**, v.69, p109-123, 2006.
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Polycyclic Aromatic Compounds. Part 1, **Chemical, Environmental and Experimental Data**, v.32. Lyon, France, 1983.
- JANSSENS, B. et al. Reduced enzymatic antioxidative defense in deep-sea fish. **Journal of Experimental Biology**, v.203, p.3717-3725, 2000.
- KANTONIEMI, A.; KIRSI, V.; OIKARI, A. The capacity of liver microsomes to form benzo[a]pyrene-diolepoxide DNA adducts and induction of cytochrome P450 1A in feral fish exposed to pulp mill effluents. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.35, p.136-141, 1996.
- KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAROBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v.251, p.6183-6188, 1976.
- KLAASSEN, C.D. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In: Goodman and Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill, p.1649-1672. 1996.

- KLAASSEN, C.D.; DOULL, J.; AMDUR, M.O. **Casarett and Doull's Toxicology – the basic science of poisons.** (5aEdition). McGraw-Hill. New York, 1996.
- KONO, Y.; FRIDOVICH I. Superoxido radical inibiths catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.257, n.10, p.5751-5754, 1982.
- KOPECKA-PILARCZYK, J.; CORREIA, A.D. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to *in vivo* exposure to a mix of selected PAHs. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.7272, n.4, p.1296-302, 2009.
- LANDIS, W.G.; YU, M.H. **Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems.** Boca Raton, Lewis Publishers, 328 p. 1995.
- LIOCHEV, S.I. The mechanism of Fenton-like reactions and their importance in biological systems. A biologist's view. In: Sigel, A., Sigel, H. (Eds.), **Metal ions in Biological Systems.** Marcel Dekker, New York, p. 1-39, 1999.
- LENÁRTOVÁ, V. et al. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. **Biomarkers**, v.2, p.247-252, 1997.
- LEVINE, A. et al. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v.79, p.583-93, 1994.
- LEWIS, M.A. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. **Environmental Pollution**, v.87, p.319-336, 1995.
- LIU, J.H.; KUEH, C.S.W. Biomonitoring of heavy metals and trace organics using the intertidal mussel *Perna viridis* in Hong Kong coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v.51, p.857-875, 2005.
- LIVINGSTONE, D.R. et al. Oxiradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. **Functional Ecology**, v.4, p.415-424, 1990.
- LÓPEZ-BAREA, J. Biomarcadores moleculares de estrés oxidativo y contaminación ambiental. **Critical Reviews in Toxicology**, p.8-12, 2000.
- LUSHCHAK, V. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, p.100-107, 2001.
- MAESTRO, R.F. Uma abordagem aos Radicais Livres em Medicina e Biologia. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.492, p.153-168, 1980.
- MALINS, D.C.; OSTRANDER, G.K. **Aquatic Toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1993.

- MANAHAN, S. E. **Environmental Chemistry**. 7.ed. Boca Raton : LEWIS, 2000.
- MARIGÓMEZ, I.; BAYBAY-VILLACORTA, L. Polluants-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. **Aquatic Toxicology**, p. 235-257, 2003.
- MARTINEZ, C.B.R. et al. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v.64, p.797-807, 2004.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, C. et al. A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. **Journal of Marine Science**, v.67, p.1105-1118, 2010.
- McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, p.6049-6055, 1969.
- MEIRE, R.O.; AZEREDO, A.; TORRES, J.P.M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v.11, n.2, p.188-201, 2007.
- MILLER, K.P.; RAMOS, K.S. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. **Drug Metabolism Reviews**, v.33, n.1, p.1-35, 2001.
- MOORE, M.N.E.; SIMPSON, M.G. Molecular and cellular pathology in environmental impact assessment. **Aquatic Toxicology**, v.22, p.313-322, 1992
- MOORE, M.N. et al. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research**, v.552, n.1-2, p.247-268, 2004.
- MOYLE, PB; CECH JR, J.J. **Fishes – an introduction to ichthyology**. 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 559 p. 1988.
- MUNRO, A.W.; GIRVAN, H.M.; McLEAN, K.J. Variations on a (t)heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 585-609, 2007.
- NAPIERSKA, D.; PODOLSKA, M. Biomarkers of contaminant exposure: results of a field study with flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v.50, p.758-767, 2005.
- NELSON, D.R. et al. The P450 superfamily - update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA Cell Biology**, v.12, p.1, 1993.

- NICARETA, L. Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis*. 74 f. (Dissertação) Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- NOGUEIRA, L. et al. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends, **Chemosphere**, v.85, n.1, p.97-105, 2011.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1311, 2001.
- OLIVEIRA, M. et al. Chromium effects on *Anguilla anguilla* liver organ culture. **Fresenius Environmental Bulletin**, v.12, p.349-352, 2003.
- OLIVEIRARIBEIRO, C.A. et al. Bioaccumulation and the Effects of Organochlorine Pesticides, PAHs and Heavy Metals in Ells (*Anguilla anguilla*) from the Camargue Biosphere Reserve. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.56-69, 2005.
- ORUÇ, E.O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-Dandazinphosmethyl. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.137, p.43-51, 2004.
- PARK, S. et al. The role of iron in reactive oxygen species generation from diesel exhaust particles. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.851-857, 2006.
- PATHIRATNE, A.; GEORGE, S. Comparison of xenobiotic metabolizing enzymes of Tilapia with those of other fish species and interspecies relationships between gene families. **Marine Environmental Research**, v.42, p.293-296, 1996.
- PEDERSEN, S.N. et al. Primary structures of decapod crustacean metallothioneins with special emphasis on freshwater and semi-terrestrial species. **Biochemical Journal**, v.319, p.999-1003, 1996.
- PEREIRA, R.S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**. IPH-UFRGS. v.1, n.1. p.20-36, 2004.
- PINTO, E. et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, v.39, p.1008-1018, 2003.
- PODEROSO, J.J. et al. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondrial and submitochondrial particles. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v.328, p.85-92, 1996.
- RAMOS, P. Revista Meio Ambiente Industrial, v.6, n.30, 2001. Disponível em: <<http://www.meioambienteindustrial.com.br>> Acesso em: 14 mai. 2012.

- RATTNER, B.A.; HEATH, A.G. Handbook of Ecotoxicology, Second Edition. In: **Environmental Factors Affecting Contaminant Toxicity in Aquatic and Terrestrial Vertebrates**. CRC Press, 2002.
- RAY, R.; SHAH, A.M. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science*, v.109, n.3, p.217-226, 2005.
- REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. ***Aquatic Toxicology***, v.50, p.351-361, 2000.
- REGOLI, F. et al. Antioxidant efficiency in early life stages of the antartic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice chemical exposure. ***Aquatic Toxicology***, v.75, p.43-52, 2005.
- REGOLI, F.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. ***Aquatic Toxicology***, v.40, p.375-392, 1998.
- RIBO, J.M. Interlaboratory comparison of studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. ***Environmental Toxicology and Water Quality***, v.12, n.4, p. 283-294, 1997.
- RIOL, M.J.M. et al. Glutathione Stransferases from rainbow liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. ***Comparative Physiology and Biochemistry Part C: Toxicology & Pharmacology***, v.1, p.227-235, 2000.
- ROCCA, A.C.C. **Resíduos sólidos industriais**. 2. ed. São Paulo: CETESB, 1993.
- ROMEO, M. et al. Heavy metal content and biotransformation enzymes in two fishspecies from NW Mediterranean. ***Marine Ecology Progress Series***, v.107, p.15-22, 1994.
- RONCO, A.; BÁEZ, M.C.D.; GRANADOS, Y.P. **Em Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**; MORALES, G.C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: cap.1. 2004.
- SALO, D.C.; DONOVAN, C.M.; DAVIES, K.J.A. HSP 70 and other possible heat shock proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver during exercise. ***Free Radical Biology & Medicine***, v.11, p.239-246, 1991.
- SARASQUETE, C.; SEGNER, H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. ***Science of The Total Environment***, v.247, p.313-332, 2000.

- SCHAFER, F.; BUETTNER, G. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology Medical**, v.30, n.11, p.1191-1212, 2001.
- SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, n.4, p.308-313, 2004.
- SHAILAJA, M.S.; D'SILVA, C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. **Chemosphere**, v.3, p.835-841, 2003.
- SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E. Increased biliary glutathione disulfide release. **Febs Letters**, v.103, p.287-290, 1979.
- SILVA, L.C. et al. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, p.375-383, 2000.
- ŠIMKO, P. Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hidrocarbons from smoked meat food and liquid smoke flavorings. **Molecular Nutrition & Food Research**, p.637-347, 2005.
- 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 Environmental Safety**, v.69, n.1, p.112-20, 2008.
- SOLÉ, M.; PORTE C.; ALBAIGES, J. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. **The Science Total Environmental**, v.159, n.2-3, p.147-153, 1995.
- STEGEMAN, J.J. et al. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (eds.), **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers, USA, pp. 2355. 1992.
- STEGEMAN, J.J. et al. Catalytic properties of scup cytochrome P4501A expressed in Chinese hamster V79 cells. **Marine Environmental Research**, v.46, p.395, 1998.
- 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: Ostrander, G.K.; Malins. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. New York: D. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1994.

- STOHS, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radicals Biology & Medicine**, v.18, p.321-336, 1995.
- STURVE, J. et al. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquatic Toxicology**, v.78, p.73-78, 2006.
- THOMAS, P., WOFFORD, H.W. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croacker tissues. **Aquatic Toxicology**, v.27, p.159-178, 1993.
- TRÍDICO, C.P. et al. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon., **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, n.5, p.858-863, 2010.
- USEPA. Understanding Oil Spills and Oil Spill Response in Freshwater Environments. United States Office of Emergency. **Environmental Protection and Remedial. Oil Programs Center**. Washington: D.C., 1999.
- VACCARO, E. et al. Effects of 17 β -estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquatic Toxicology**, v.75, p.293-305, 2005.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesement: a review. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 13, n.2, p.57-149, 2003.
- VAN DER WEIDEN, M.E.J. et al. Concurrence of P450 1A induction and toxic effects in the mirror carp (*Cyprinus carpio*), after administration of a low dose of 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Aquatic Toxicology**, v.19, p.147-162, 1994.
- VEGA-LÓPEZ, A. et al. Gender related differences in the oxidative stress response to PCB exposure in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.146, p.672-678, 2007.
- VERMEULEN, N.P. Role of metabolism in Chemical toxicity. Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects. C. Ioannides, p.29-54, 1996.
- VIARENGO, A. Biochemical effects of trace metals. **Marine Pollution Bulletin**, v.16, p.153-158, 1985.
- VIARENGO, A.; NOTT, J. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.104, p.355-372, 1993.

- VIARENGO, A. et al. Heavy metals effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.97, p.37-42, 1990.
- VIARENGO, A. et al. Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the Bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metals effects. **Marine Environmental Research**, v.44, p.1-11, 1997.
- VIDAL, M.L.; BASSERES, A.; NARBONNE, J.F. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.132C, p.93-104, 2002.
- VIEIRA, P.A. et al. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **Journal Hazard Mater**, v.140, n.1-2, p.52-59, 2007.
- VIG, E.; NEMSCOK, J. The effects of hypoxia and paraquat on superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L. **Journa Fish Biology**, v.35, p.23, 1989.
- VIJAYAN, M.M. et al. Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, v.199, p.2467-2475, 1996.
- WALKER, C.H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis. 1996.
- WANG, J.T. et al. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v.249, p.439-447, 2005.
- WHYTE, J.J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Review Toxicology**, v.30, n.4, p.347-570, 2000.
- WILLETT, K.L. et al. Evidence for and against the presence of polynuclear aromatic hydrocarbon and 2,3,7,8-tetrachloro-p-dioxin binding proteins in the marine mussels, *Bathymodiolus modiolus* and *Modiolus modiolus*. **Aquatic Toxicology**, v.48, p.51-64, 1999.
- WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R.T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v.19, p.137-161, 1991.
- WINZER, K., VAN NOORDEN, C.J.F., KOHLER, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: the key to sex-related xenobiotic toxicity in hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.) **Aquatic Toxicology**, v.56, p.275-288, 2002.

- WRIGHT, J. et al. Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line. **Marine Environmental Research**, v.50, p.503-508, 2000.
- XUE, W.; WARSHAWSKY, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.206, p. 73-93, 2005.
- YUN, C.H.; SONG, M.; KIM, H. Conformational changes of cytochrome P4501A2 induced by phospholipids and detergents. **Journal Biological Chemistry**, v.272, p.19725-19730, 1996.
- ZAR, J. **Biostatistical analyses**. Printice Hall, New Jersey, 663p. 1999.
- ZHANG, J.F. et al. Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidante defense system of fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.71, p.234-239, 2003.
- ZHANG, J.F. et al. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicological Environmental Safety**, v.58, n.1, p.110-116, 2004.