

Lílian Nogueira

Influência da hipóxia em respostas bioquímicas de mexilhões *Perna perna* expostos ao biodiesel B5.

São José do Rio Preto – SP
2013

Lílian Nogueira

Influência da hipóxia em respostas bioquímicas de mexilhões *Perna perna* expostos ao biodiesel B5.

Tese apresentanda para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, 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 – SP
2013

Lílian Nogueira

Influência da hipóxia em respostas bioquímicas de mexilhões *Perna perna* expostos ao biodiesel B5.

Tese apresentanda para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, 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
UNESP - São José do Rio Preto, SP
Orientador

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP - Santos, SP

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC - Florianópolis, SC

Prof. Dr. Igor Dias Medeiros
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP - Santos, SP

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina, UEL - Londrina, PR

São José do Rio Preto – SP
14 de março de 2013

Dedicatória

*Dedico esta dissertação a minha mãe Eloiza Nogueira,
a meus avós Hilda Martins Nogueira e Antonio Nogueira
e ao meu irmão João Alberto Saldanha Jr.*

*Se cheguei até aqui, foi graças ao apoio e carinho
que vocês sempre me oferecem!*

*A todos meus amigos, que por muita sorte em minha vida,
são tantos que não cabem nessa página!*

Neste último ano, percebi a imensa falta que cada um deles me faz!

*Dedico também ao meu marido Thiago Yukio Kikuchi Oliveira que,
sem ele, essa doce loucura desse último ano
que me trouxe grandes surpresas e um grande aprendizado,
não seria possível.*

Te amo!

Agradecimentos

Dedico meus sinceros agradecimentos:

– ao Professor Doutor Eduardo Alves de Almeida. Obrigada pela paciência ao longo de todos esses anos e por ter me ajudado e apoiado nas minhas escolhas. Você foi um excelente orientador me guiando até aqui e com certeza, aprendi muito com você!

– a todos os amigos da equipe do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática pela amizade, pelas risadas e por toda ajuda prestada em todos os momentos (sem vocês este trabalho seria impossível e menos divertido!), todos vocês contribuíram com alguma parte essencial do meu doutorado, até mesmo com um sorriso nas horas de desânimo!

– em especial a Danielly Garcia, que ajudou na realização de algumas análises bioquímicas. Sem você, com certeza, não teria como eu terminar essa tese!

– ao Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre do Laboratório de Defesas Celulares, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por ceder o espaço e me orientado para a realização da primeira etapa dos experimentos dessa tese.

– aos membros do Laboratório de Defesas Celulares da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis-SC, em especial a Daiane Acosta Silva e Rafael Trevisan, por terem me acolhido e me ajudado com a primeira parte experimental de meu trabalho com toda paciência do mundo!

– ao Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos-SP, por ceder o espaço e me orientado para a realização da segunda etapa dos experimentos e por ter colaborado com a análise do vermelho neutro, agregando mais conhecimento a esta tese.

– aos membros do Laboratório de Ecotoxicologia, da Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos-SP, em especial ao doutorando Fernando, e as alunas de graduação Jéssica, Lorena, Amanda e Bárbara, por terem me ajudado a montar os experimentos da segunda etapa e realizado a análise do vermelho neutro.

– ao meu marido Thiago Yukio Kikuchi Oliveira pela ajuda com a metodologia e estatística deste e outros tantos trabalhos durante a minha vida acadêmica.

– ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, em especial, a Profa. Dra. Lílian Casatti, pelo apoio ao longo desses anos. Ter feito parte deste grupo acrescentou muito à minha vida acadêmica.

– a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter financiado este trabalho e ter me concedido a bolsa de auxílio acadêmico (Processo número 2010/ 20365-5).

Resumo

O ambiente intertidal marinho sujeita seus habitantes à flutuações na disponibilidade de O₂ devido às marés. A hipóxia seguida de reoxigenação produz espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem gerar estresse oxidativo nos organismos. Moluscos bivalves, como mexilhões, possuem defesas antioxidantes que combatem as ERO formadas durante a reoxigenação. Porém, é desconhecido se o aumento das defesas antioxidantes gerado pela hipóxia também contribui no combate às ERO geradas pela exposição a poluentes e se a exposição a contaminantes pode afetar o metabolismo da hipóxia. No Brasil, o óleo diesel recebe obrigatoriamente a adição de 5% de biodiesel e essa mistura chamada de B5 é utilizada como combustível para veículos automotivos e poderá vir a ser utilizada em frotas marinhas. Dessa forma, torna-se necessário avaliar se este novo tipo de biocombustível pode gerar algum tipo de perturbação na biota aquática. Este estudo teve o objetivo de avaliar se em mexilhões *Perna perna* (1) a mistura B5 pode gerar respostas em parâmetros antioxidantes, (2) se a hipóxia induz diferenças nos parâmetros antioxidantes e (3) se a hipóxia seguida de reoxigenação em água limpa e em água contaminada influencia na indução de estresse oxidativo nestes animais, além de verificar se a pré-exposição ao B5 influencia nas respostas do metabolismo de hipóxia. Para alcançar os objetivos foram realizados três experimentos: (1) exposição ao biodiesel B5 (0,01 e 0,1 mL/L) por 6 h, 12 h, 48 h e 168 h, (2) exposição ao ar por 6 h, 12 h, 24 h e 48 h, (3) exposição ao ar por 24 h seguida de reoxigenação em água e em água contendo 0,01 mL/L de B5. Para os três experimentos foram avaliadas nas brânquias e glândulas digestivas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST), glutathione redutase (GR) bem como a concentração de glutathione (GSH) e concentração de malondialdeído (MDA) como indicativo de peroxidação lipídica. Para o terceiro experimento ainda realizamos o teste de tempo retenção do vermelho neutro em hemócitos. Nossos resultados, levando em consideração a espécie de mexilhão, as concentrações e o tempo de exposição utilizados nos experimentos, demonstram que o biodiesel B5 apresentou uma interferência no sistema antioxidante diminuindo a atividade da GST, SOD, GPx e dependendo do tratamento, aumentando ou diminuindo a GSH e a atividade da GR, mas não gerou peroxidação lipídica. Entretanto, foi capaz de alterar a estabilidade da membrana lisossomal, diminuindo o tempo de retenção do vermelho neutro. Além disso, pudemos observar que os níveis antioxidantes são mantidos elevados nesses mexilhões provavelmente como uma adaptação aos regimes de hipóxia e normóxia ditados pelas marés, tornando esse organismo muito resistente aos contaminantes de uma forma geral. Assim, essa adaptação, dependendo do período do ano, pode interferir em análises de biomonitoramento. Entretanto, períodos longos de hipóxia também podem ser prejudiciais, visto que diminuem a atividade de enzimas como a SOD e a catalase, tornando os animais mais susceptíveis a danos oxidativos.

Palavras-chaves: Moluscos bivalves, estresse oxidativo, defesas antioxidantes, hipóxia, biodiesel.

Abstract

The intertidal marine environment promotes fluctuations in the oxygen availability for its inhabitants. Hypoxia followed by reoxygenation produces reactive oxygen species (ROS) that can cause oxidative stress in organisms. Bivalve molluscs have antioxidative defenses to fight ROS generated during the reoxygenation. However, it is unknown if the increase in antioxidant system generated by hypoxia also contributes to neutralize ROS generated by exposure to pollutants and if contaminant exposure can affect the hypoxia metabolism. In Brazil B5 blend (5% biodiesel and 95% diesel oil) has been adopted as mandatory fuel for automotive vehicles and could become mandatory for marine fleet in the future. So it becomes necessary to assess whether this new fuel type can generate some kind of disturbance in aquatic biota. Thus, this study aimed to assess in mussels *Perna perna* (1) if B5 can generate modifications in antioxidant parameters, (2) if hypoxia induces alterations in antioxidant parameters and (3) if hypoxia followed reoxygenation in clean water and contaminated water with B5 promotes oxidative stress in these animals, and verify if the B5 pre-exposure modifies some parameters in the hypoxia metabolism. To achieve the objectives three experiments were performed: (1) mussels exposure to B5 (0.01 mL/L and 0.1 mL/L) for 6 h, 12 h, 48 h and 168 h, (2) mussels exposure to hypoxia for 6 h, 12 h, 24 h and 48 h, and (3) exposure to air for 24 h followed by reoxygenation in clean water and water with B5 0.01 mL/L. For the three experiments we evaluated the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) as well as glutathione concentration (GSH) and lipid peroxidation by measure the malondialdehyde concentration (MDA) in gills and digestive glands. For the third experiment we conducted the neutral red retention time assay (NR) in hemocytes. Taking into account the mussel species, the concentrations and exposure time used in the experiments our results demonstrate that B5 promoted an antioxidant system interference by decreasing the activity of GST, SOD, GPx and depending on the treatment, increasing or decreasing the GSH and GR activity, but did not cause lipid peroxidation. However, it was capable of altering the stability of the membrane lisossomal, decreasing the retention time in the NR assay, showing that B5 can affect the hypoxia metabolism. Furthermore, we found that antioxidant levels in *P. perna* are kept high probably as an adaptation to hypoxia and normoxia cycles promoted by the tides, making this species very resistant to pollution in general. Further, depending on the time of year this adaptation can interfere with biomonitoring analysis. However, long periods of hypoxia may also be harmful, since decrease the activity of enzymes such as SOD and catalase, making the animals more susceptible to oxidative damage.

Key-words: Bivalve molluscs, oxidative stress, antioxidative stress, hypoxia, biodiesel.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

1	Introdução	p. 18
1.1	Aspectos gerais sobre poluição e seus efeitos em organismos aquáticos	p. 18
1.2	Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	p. 19
1.3	Respostas bioquímicas geradas pela exposição à contaminantes	p. 21
1.3.1	Fase I	p. 22
1.3.2	Fase II	p. 23
1.3.2.1	Glutathione S-transferase (GST)	p. 24
1.4	Sistemas Antioxidantes	p. 24
1.4.1	Superóxido dismutase (SOD)	p. 25
1.4.2	Catalase (CAT)	p. 26
1.4.3	Glutathione peroxidase (GPx)	p. 26
1.4.4	Glutathione redutase	p. 27
1.5	Respostas bioquímicas geradas pela hipóxia	p. 27
1.6	Biodiesel	p. 30
2	Objetivos	p. 33
3	Material e Métodos	p. 35

3.1	Organismos teste	p. 35
3.2	B5	p. 35
3.3	Procedimentos experimentais	p. 36
3.3.1	Protocolo de exposição ao B5	p. 36
3.3.2	Protocolo do experimento de hipóxia	p. 36
3.3.3	Protocolo do experimento de combinação do efeito da hipóxia com a exposição ao B5	p. 37
3.4	Descarte de resíduos tóxicos	p. 38
3.5	Análises bioquímicas e citotóxica	p. 38
3.5.1	Preparo das amostras para análise das enzimas GST, SOD, CAT, GPx, GR	p. 38
3.5.2	Glutathione <i>S</i> -transferase (GST)	p. 38
3.5.3	Superóxido dismutase (SOD)	p. 39
3.5.4	Catalase (CAT)	p. 39
3.5.5	Glutathione peroxidase (GPx)	p. 39
3.5.6	Glutathione reductase (GR)	p. 39
3.5.7	Análise de proteínas	p. 39
3.5.8	Ensaio do tempo de retenção do Vermelho Neutro	p. 40
3.5.9	Peroxidação lipídica	p. 41
3.5.10	Glutathione reduzida (GSH)	p. 41
3.6	Análise estatística	p. 41
4	Resultados	p. 43
4.1	Efeitos da exposição à mistura B5	p. 43
4.1.1	Glutathione <i>S</i> -transferase	p. 43
4.1.2	Superóxido dismutase	p. 44
4.1.3	Catalase	p. 45

4.1.4	Glutationa peroxidase	p. 46
4.1.5	Glutationa redutase	p. 47
4.1.6	Glutationa	p. 48
4.1.7	Peroxidação lipídica	p. 49
4.2	Efeitos da hipóxia	p. 50
4.2.1	Glutationa S-transferase	p. 50
4.2.2	Superóxido dismutase	p. 51
4.2.3	Catalase	p. 52
4.2.4	Glutationa peroxidase	p. 53
4.2.5	Glutationa redutase	p. 54
4.2.6	Glutationa	p. 55
4.2.7	Peroxidação lipídica	p. 56
4.3	Combinação do efeito da hipóxia com a exposição ao B5	p. 57
4.3.1	Glutationa S- transferase	p. 57
4.3.2	Superóxido dismutase	p. 58
4.3.3	Catalase	p. 59
4.3.4	Glutationa peroxidase	p. 60
4.3.5	Glutationa redutase	p. 61
4.3.6	Glutationa	p. 62
4.3.7	Peroxidação lipídica	p. 63
4.3.8	Ensaio do tempo retenção do vermelho neutro	p. 64
5	Discussão	p. 66
5.1	Exposição ao biodiesel B5	p. 66
5.2	Experimento de hipóxia	p. 70
5.3	Combinação do efeito da hipóxia com a exposição ao B5	p. 72
5.4	Considerações gerais	p. 75

6 Conclusões	p. 78
Referências	p. 79
Apêndice A - Valores dos testes estatísticos para o experimento de biodiesel	p. 86
Apêndice B - Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação	p. 90
Apêndice C - Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia	p. 93

Lista de Figuras

1	Esquema simplificado das fases do metabolismo de destoxificação.	p. 22
2	Ciclo catalítico do citocromo P450.	p. 23
3	Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB.	p. 24
4	Esquema simplificado de sistemas oxidativos e antioxidantes dentro de uma célula.	p. 25
5	Esquema mostrando a atividade antioxidante da GPx sobre o peróxido de hidrogênio.	p. 27
6	Esquema mostrando o planejamento para o experimento de exposição de mexilhões ao B5.	p. 36
7	Esquema mostrando o planejamento para o experimento de hipóxia.	p. 37
8	Esquema mostrando o planejamento para o experimento do efeito combinado da hipóxia com a exposição ao B5	p. 38
9	Box plot mostrando a atividade de GST em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> expostos ao biodiesel.	p. 44
10	Box plot mostrando a atividade de SOD em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> expostos ao biodiesel.	p. 45
11	Box plot mostrando a atividade de CAT em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> expostos ao biodiesel.	p. 46
12	Box plot mostrando a atividade de GPx em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> expostos ao biodiesel.	p. 47
13	Box plot mostrando a atividade de GR em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> expostos ao biodiesel.	p. 48
14	Box plot mostrando a concentração de GSH em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> expostos ao biodiesel.	p. 49

15	Box plot mostrando a atividade de MDA em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> expostos ao biodiesel.	p. 50
16	Box plot mostrando a atividade de GST em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> após um período de hipóxia.	p. 51
17	Box plot mostrando a atividade de SOD em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> após um período de hipóxia.	p. 52
18	Box plot mostrando a atividade de CAT em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> após um período de hipóxia.	p. 53
19	Box plot mostrando a atividade de GPx em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> após um período de hipóxia.	p. 54
20	Box plot mostrando a atividade de GR em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> após um período de hipóxia.	p. 55
21	Box plot mostrando a concentração de GSH em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> após um período de hipóxia.	p. 56
22	Box plot mostrando a concentração de MDA em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i> após um período de hipóxia.	p. 57
23	Box plot mostrando a atividade de GST em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i>	p. 58
24	Box plot mostrando a atividade de SOD em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i>	p. 59
25	Box plot mostrando a atividade de CAT em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i>	p. 60
26	Box plot mostrando a atividade de GPx em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i>	p. 61
27	Box plot mostrando a atividade de GR em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i>	p. 62
28	Box plot mostrando a concentração da GSH em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i>	p. 63
29	Box plot mostrando a concentração de MDA em brânquia e glândula digestiva de <i>P. perna</i>	p. 64

30	Gráfico do tempo de retenção do corante vermelho neutro em hemócitos de <i>P. perna</i>	p. 65
----	--	-------

Lista de Tabelas

1	Critérios adotados para a análise celular no teste de retenção do vermelho neutro.	p. 40
2	Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para CAT	p. 86
3	Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para GPx	p. 87
4	Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para GR	p. 87
5	Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para GSH	p. 88
6	Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para GST	p. 88
7	Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para MDA	p. 89
8	Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para SOD	p. 89
9	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para CAT	p. 90
10	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para GPx	p. 90
11	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para GR	p. 91
12	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para GSH	p. 91
13	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para GST	p. 91
14	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para MDA	p. 92
15	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para SOD	p. 92

16	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para CAT	p. 93
17	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para GPx	p. 94
18	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para GR	p. 94
19	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para GSH	p. 95
20	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para GST	p. 95
21	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para MDA	p. 96
22	Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para SOD	p. 96

Lista de abreviaturas e siglas

ANP	Agência Nacional do Petróleo
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
B100	Combustível 100% biodiesel
B2	Combustível com 98% de óleo diesel e 2% de biodiesel
B3	Combustível com 97% de óleo diesel e 3% de biodiesel
B5	Combustível com 95% de óleo diesel e 5% de biodiesel
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
GST	Glutathione S-transferase
HIF	Hypoxia-inducible factor
HPA	Hydrocarbon polycyclic aromatic
HPLC	High performance liquid chromatography
MDA	Malondialdehyde
Mn-SOD	Superoxide dismutase dependent on manganese
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nmol/ mg de tecido	nanomol/ miligramma de tecido
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
U/mg de proteína	Unidade/miligramma de proteína
UV/ Vis	Ultra-violet/ visible light

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais sobre poluição e seus efeitos em organismos aquáticos

Compostos derivados do petróleo são uma classe generalizada de contaminantes ambientais que podem entrar no ambiente marinho através de descargas de efluentes urbanos e industriais, atividades de transporte, extração de petróleo em plataformas marinhas, derrames petrolíferos, combustão de combustíveis fósseis e vazamentos naturais (MEDEIROS *et al.*, 2005). Nas últimas décadas, o desenvolvimento de centros urbanos e industriais aumentou os níveis de produtos petroquímicos no ambiente, principalmente em estuários e zonas costeiras (LIMA *et al.*, 2007).

Produtos petrolíferos consistem principalmente de hidrocarbonetos cíclicos não-saturados, hidrocarbonetos cíclicos e policíclicos aromáticos, hidrocarbonetos olefínicos, compostos sulfurícos e metais. Em especial, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) estão dentre os compostos petrolíferos mais tóxicos, sendo conhecidos por seus efeitos carcinogênicos (PACHECO; SANTOS, 2001). Estes compostos hidrofóbicos podem ser facilmente absorvidos pelos organismos marinhos, devido a sua capacidade de interagir com moléculas presentes nas células e se ligarem em sítios lipofílicos (LIMA *et al.*, 2007). O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo formado basicamente por hidrocarbonetos olefínicos, parafínicos e aromáticos (VIEIRA *et al.*, 2007). A fração solúvel do diesel, composta por muitos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, está relacionada a efeitos tóxicos e danos oxidativos em organismos de água doce (NOGUEIRA *et al.*, 2011) e marinhos (LÜCHMANN *et al.*, 2011; ZANETTE *et al.*, 2011).

Após esses compostos serem absorvidos pelos organismos, esses tipos de poluentes são biotransformados por uma série de reações com a função de tornar tais substâncias mais hidrofílicas para serem excretadas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Durante a biotransformação de compostos químicos pode haver a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são capazes de reagir com biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA,

promovendo dano celular (NORDBERG; ARNER, 2001; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007).

Assim, vias bioquímicas capazes de produzir espécies reativas de oxigênio, além dos sistemas de defesa que combatem tais moléculas, são bastante utilizados como biomarcadores, pois são eficazes para se detectar respostas precoces relacionadas com a exposição a contaminantes. Os biomarcadores de contaminação podem ser qualquer resposta biológica a um poluente ambiental medida nos fluídos e tecidos corpóreos de um organismo ou em seus produtos, como fezes e urina (GESTEL; BRUMMELEN, 1996). Os biomarcadores são ferramentas capazes de detectar as primeiras mudanças nas respostas biológicas na fase inicial da contaminação ambiental (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), podendo ajudar na adoção de medidas para evitar efeitos irreversíveis. Entretanto, fatores abióticos podem interferir nas respostas dos biomarcadores (SANCHEZ *et al.*, 2008) e, assim, variáveis como temperatura, disponibilidade de oxigênio, ciclo sazonal, salinidade, entre outras, devem ser consideradas em estudos de biomonitoramento.

Moluscos bivalves marinhos são largamente empregados como organismos sentinelas para se avaliar níveis de poluição marinha pois são espécies sésseis e amplamente distribuídas (CAJARAVILLE *et al.*, 2000). Por serem filtradores, esses organismos podem acumular uma grande variedade de contaminantes, refletindo alterações nos níveis de contaminantes do ambiente (DAMIENS *et al.*, 2007). Além disso, possuem mecanismos adaptativos bioquímicos e fisiológicos para enfrentar flutuações em uma variedade de parâmetros ambientais tais como salinidade, níveis de oxigênio, dessecação (ALMEIDA *et al.*, 2007). Mexilhões da espécie *Perna perna* ocorrem naturalmente na costa da África e no lado atlântico da América do Sul, tendo sido introduzido no Golfo do México (ANANDRAJ *et al.*, 2002) e são organismos comercialmente importantes ao longo da costa brasileira (WILHELM FILHO *et al.*, 2001). Sendo assim, esta espécie é ideal para estudos envolvendo exposição a contaminantes e efeitos que variáveis abióticas podem exercer sobre as vias de destoxificação.

1.2 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas e degradadas por organismos aeróbios em níveis homeostáticos dentro das células em decorrência do metabolismo aeróbico (NORDBERG; ARNER, 2001). Tais espécies incluem o radical ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil ($\cdot OH$), além de moléculas derivadas do oxigênio que não apresentam elétrons desemparelhados, porém são reativas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; CROSS, 1994). Tais moléculas podem atuar como sinalizadoras em vias intracelulares (D'AUTRÉAUX;

TOLEDANO, 2007) modulando a atividade de quinases, fosfatases e fatores de transcrição na mitocôndria, no citosol ou no núcleo (MURPHY, 2009).

A formação das ERO se dá pela redução do oxigênio molecular em passos monoelétrônicos (Equação 1.1). As ERO geradas podem reagir rapidamente com a maioria das biomoléculas, gerando lesões oxidativas. Para que essa reação seja finalizada evitando danos oxidativos, o radical livre deve reagir com outro radical livre, eliminando os elétrons desemparelhados, ou ainda, reagir com um composto antioxidante (NORDBERG; ARNER, 2001).



Altos níveis de ERO podem promover um quadro de estresse oxidativo. Isso ocorre quando a taxa de produção dessas ERO excede a taxa de sua decomposição por sistemas antioxidantes, levando a um aumento do dano oxidativo em diferentes alvos celulares (ALMEIDA *et al.*, 2005), como DNA e lipídeos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Assim, num estado de estresse oxidativo o excesso de ERO pode gerar a perda da integridade celular, além da causar danos ao DNA, que se não for devidamente reparado pode levar à indução de mutações, aberrações cromossômicas, defeitos de nascimento e efeitos a longo prazo, como o câncer em vertebrados (FRENZILLI *et al.*, 2004). A interação do radical hidroxil com as bases do DNA pode levar à formação de bases modificadas como a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) (VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI; FIOTAKIS, 2009) e podem gerar transversões GC→TA (KUCHINO *et al.*, 1987).

Outra consequência do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é um processo no qual as membranas celulares podem ser oxidadas pelas ERO, levando a formação de produtos secundários como o malondialdeído (MDA), que é amplamente usado como indicador de injúrias causadas por estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2005, 2007). Além disso, processos oxidativos também são relacionados com danos lisossomais (WINSTON *et al.*, 1996; REGOLI; NIGRO; ORLANDO, 1998). Sob condições de estresse oxidativo, a membrana dos lisossomos pode ser danificada e, conseqüentemente, seu conteúdo hidrolítico é liberado no citosol, promovendo degradação celular. Dessa forma, testes de estabilidade da membrana lisossomal, como o teste de retenção do vermelho neutro são altamente utilizados para se verificar o nível de estresse oxidativo (WINSTON *et al.*, 1996).

O estresse oxidativo pode ser gerado em diversas situações, como exposição a contaminantes, infecções e estressores físicos como temperatura, concentração salina, disponibilidade de oxigênio e exposição à radiação ultra-violeta (WINSTON *et al.*, 1996; ERMAK; DAVIES,

2002; ABELE; PUNTARULO, 2004). As fontes antropogênicas relacionadas ao aumento da produção de ERO nos organismos expostos incluem contaminantes orgânicos, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), hidrocarbonetos halogenados, metais pesados (cádmio, cromo, mercúrio), entre outros (LIVINGSTONE, 2001).

Os fatores que promovem o aumento na produção de ERO não agem de maneira isolada. Assim, os organismos estão expostos simultaneamente a estes distúrbios, podendo haver uma interação nas respostas de várias vias bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo. Várias vias bioquímicas ativadas em resposta à hipóxia são as mesmas do metabolismo de destoxificação de compostos químicos, como alteração na atividade de sistemas antioxidantes (ALMEIDA *et al.*, 2005). Dessa forma, quando os organismos são expostos a todas essas variáveis em conjunto, as respostas desses sistemas podem ser diferentes do que quando eles são expostos a apenas uma variável isolada.

1.3 Respostas bioquímicas geradas pela exposição à contaminantes

Moluscos bivalves como os mexilhões possuem uma série de adaptações que lhes permitem sobreviver sob condições adversas, como mudanças nas taxas respiratória e metabólica, ativação de vias alternativas para produção de energia e indução de uma série de defesas bioquímicas e mecanismos de reparo (ALMEIDA *et al.*, 2007). O metabolismo de destoxificação apresenta várias dessas defesas bioquímicas que permitem combater ERO e modificar moléculas prejudiciais aos organismos facilitando sua excreção.

O metabolismo de destoxificação de compostos químicos possui três fases: na primeira ocorrem reações de oxidação, redução ou hidrólise, na segunda acontecem as reações de conjugação e na terceira há a excreção dos metabólitos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) (Figura 1). Durante o metabolismo de destoxificação, muitas ERO podem ser formadas e o sistema antioxidante pode ser ativado para manter os níveis dessas moléculas em homeostase. Além disso, algumas enzimas, como por exemplo a glutathione redutase e a glicose 6-fosfato desidrogenase, participam indiretamente do metabolismo de destoxificação e do sistema antioxidante, pois suprem as moléculas necessárias para o funcionamento do ciclo de reações dessas vias.

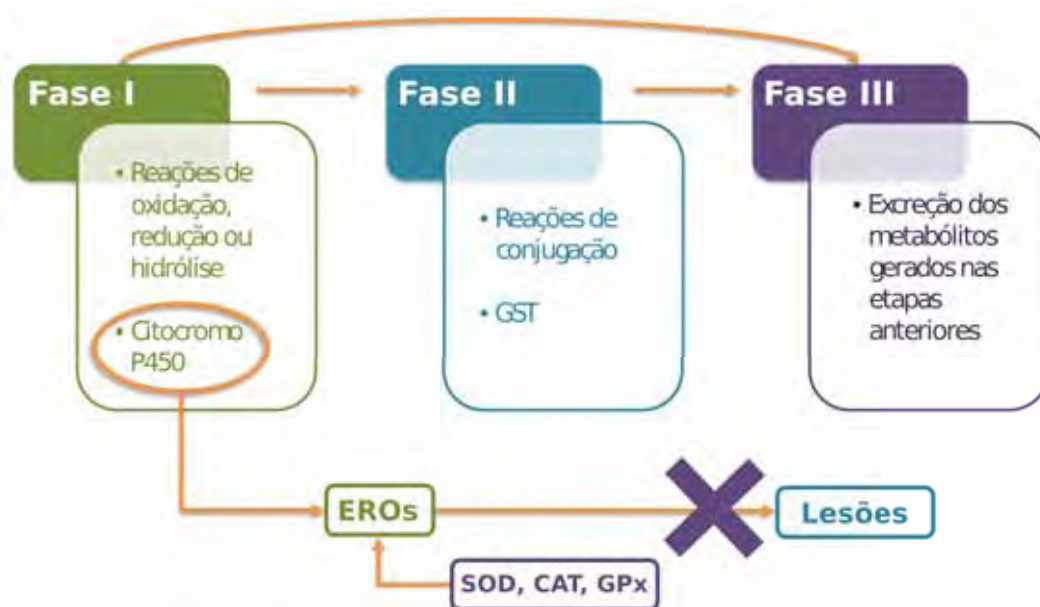


Figura 1: Esquema simplificado das fases do metabolismo de destoxificação. Quando as reações não estão bem acopladas, pode-se gerar EROs. Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) presentes nas células impedem que as EROs provoquem lesões em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

1.3.1 Fase I

Segundo revisado por Van der Oost, Beyer e Vermeulen (2003) a primeira fase do metabolismo expõe ou adiciona grupos funcionais reativos através de reações de oxidação, redução ou hidrólise nos compostos químicos. Dessa forma, a característica mais importante dessa fase é transformar compostos lipofílicos em produtos mais solúveis em água, facilitando a excreção destes metabólitos. Além disso, para a maioria dos compostos químicos as reações dessa fase são catalisadas por enzimas mono-oxigenases microsossomais, como o citocromo P450 (CYP), citocromo b₅ e NADPH citocromo P450 redutase. A família dos CYPs está envolvida com o metabolismo oxidativo de uma grande quantidade de substratos, como drogas e outras substâncias químicas, além de compostos endógenos como hormônios esteroides, ácidos graxos e prostaglandinas. Entretanto, alguns intermediários desse metabolismo são altamente reativos e podem reagir com muitas biomoléculas (SARASQUETE; SEGNER, 2000).

A fase I da biotransformação de compostos químicos via sistema mono-oxigenases microsossomais segue um ciclo de reações (Figura 2). Tal ciclo é um mecanismo para garantir a transferência de elétrons para o CYP, porém esta cadeia de reações também é responsável pela formação de ERO, quando há um excesso de substrato disponível para oxigenação (MUNRO; GIRVAN; MCLEAN, 2007).

CYP é uma família de enzimas amplamente utilizada como biomarcadores. Ainda pouco se conhece sobre essa classe de enzimas em moluscos bivalves, mas um recente estudo vem

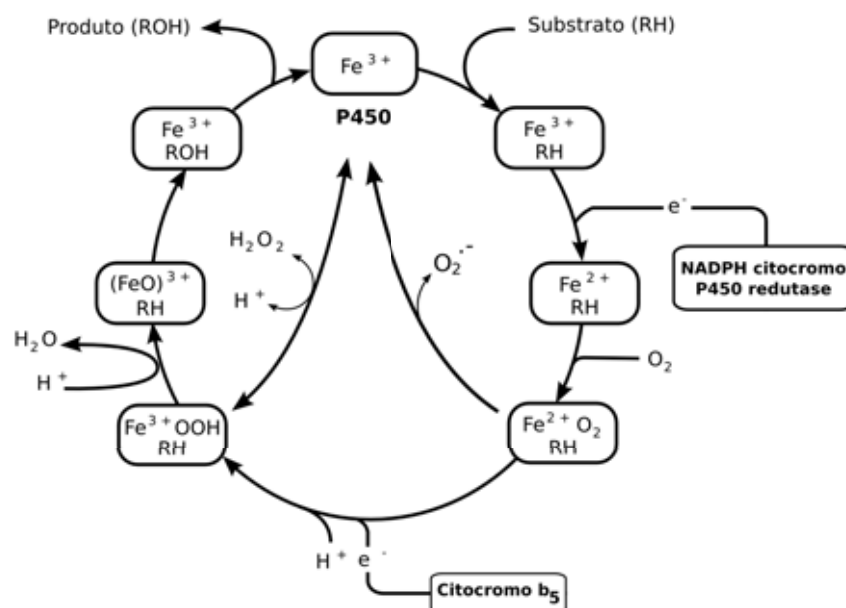


Figura 2: Ciclo catalítico do citocromo P450. O elemento Fe representa o átomo de ferro presente no grupo heme do P450. Em primeiro lugar, o substrato (RH) se liga ao sítio ativo da enzima. Em seguida, o ferro presente na porção heme é reduzido pela transferência de um elétron da flavoproteína NADPH citocromo P450 redutase. Depois, o O_2 é ligado. Neste ponto, o ciclo pode continuar ou ser interrompido, resultando na liberação de um ânion superóxido. O próximo passo envolve a transferência de um segundo elétron via citocromo b_5 , seguida pela quebra da ligação da molécula de O_2 , podendo haver liberação de peróxido de hidrogênio. Logo após, há a formação de um substrato-radical, seguida pela hidroxilação desse radical e consequente liberação do produto (ROH). Adaptado de Munro, Girvan e McLean (2007).

identificando genes CYP em moluscos dos gêneros *Mytilus* (mexilhão) e *Crassostrea* (ostra) sugerindo uma diversidade consistente com o encontrado em muitas outras espécies animais (ZANETTE *et al.*, 2010). Por exemplo, a subfamília CYP3A, que catalisa a hidroxilação da testosterona na posição 6β pode ser induzida em mexilhões da espécie *Mytilus edulis* expostos a estradiol (CUBERO-LEON *et al.*, 2012). Já em peixes, a atividade da isoforma 1A (CYP1A) é induzida na presença de agonistas de receptor aril hidrocarboneto, como HPA e bifenilas policloradas (BPC) (WHYTE *et al.*, 2000; PACHECO; SANTOS, 2001; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

1.3.2 Fase II

O metabolismo da fase II envolve a adição de um ligante endógeno, geralmente um grupo polar, ao composto químico parental ou a seus metabólitos, para facilitar sua excreção (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). As glutathione S-transferases apresentam esse tipo de função.

1.3.2.1 Glutathione S-transferase (GST)

As glutathione S-transferases são um grupo de enzimas da fase II que catalisam a reação de conjugação da glutathione (GSH) com uma variedade de compostos eletrofílicos, envolvendo a destoxificação de intermediários reativos. A maioria dos estudos que determinam a atividade de GST total utilizam o substrato artificial 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por ser substrato para a maioria das isoformas de GSTs (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) (Figura 3).

Comparações de sequências de DNA mostram que as diversas classes de GST existentes estão presentes numa gama surpreendentemente grande de organismos. Esta ampla distribuição taxonômica pode sugerir que as GSTs desempenham um papel fundamental na defesa contra compostos tóxicos (SHEEHAN *et al.*, 2001). Peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do óleo diesel por 96 horas (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008) e 15 dias (SIMONATO; ALBINATI; MARTINEZ, 2006; SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008) demonstraram o aumento significativo da atividade da GST hepática. Mexilhões *Mytilus galloprovincialis* coletados de áreas contaminadas com compostos petroquímicos também demonstraram o aumento na atividade da GST (LIMA *et al.*, 2007). Essa mesma espécie de mexilhão também apresentou aumento da atividade dessa enzima quando exposto por sete dias à mistura de cobre (5 $\mu\text{g/L}$) e benzo[a]pireno (10 $\mu\text{g/L}$) (MARIA; BEBIANNO, 2011). Tais resultados evidenciam que as GSTs exercem um papel fundamental na destoxificação de compostos químicos e, devido a isso, são utilizadas como biomarcadores de contaminação.

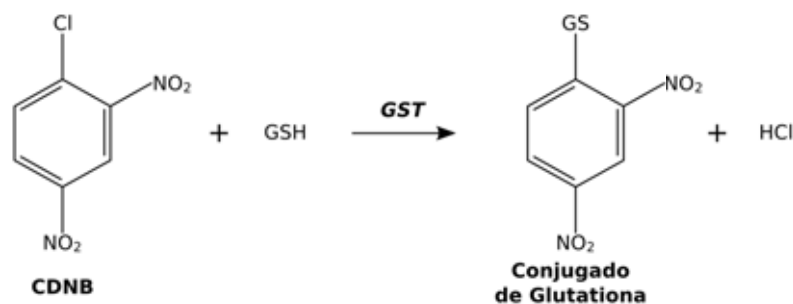


Figura 3: Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB. Notem que a GSH é introduzida na posição 1 no lugar do Cl, dando origem a um conjugado de glutathione.

1.4 Sistemas Antioxidantes

Os organismos possuem sistemas de defesa antioxidantes que ajudam a combater o estresse oxidativo (KOPECKA-PILARCZYK; CORREIA, 2009). Três importantes enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx)

(NORDBERG; ARNER, 2001; LIVINGSTONE, 2003). As GSTs também exercem indiretamente função antioxidante através da remoção de espécies reativas de oxigênio e regeneração de proteínas S-tioladas (SHEEHAN *et al.*, 2001). Dentre os antioxidantes não enzimáticos estão o ácido ascórbico, os tocoferóis e a glutathiona (GSH)(DAFRE *et al.*, 2004). A ação desses sistemas antioxidantes encontram-se resumidos na Figura 4.

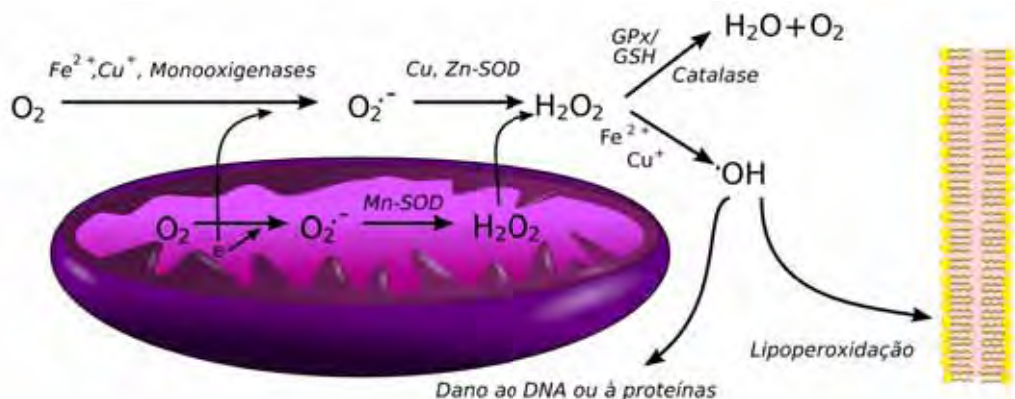
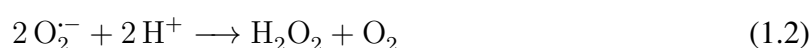


Figura 4: Esquema simplificado de sistemas oxidativos e antioxidantes dentro de uma célula. Ânion superóxido é produzido em quantidades significativas no citosol por mono-oxigenases, Fe^{2+} ou Cu^+ e na mitocôndria pelo escape de elétrons provenientes da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido reagem espontaneamente ou via SOD, produzindo peróxido de hidrogênio, o que irá permitir o fluxo de ERO entre compartimentos celulares. O peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado à água e ao oxigênio molecular por diversos sistemas enzimáticos ou convertido a radical hidroxil, o qual é muito reativo, através de reações catalisadas por metais. Adaptado de Nordberg e Arner (2001).

1.4.1 Superóxido dismutase (SOD)

As SODs são um grupo de metaloenzimas que catalisam a transformação de radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Equação 1.2). Em células eucarióticas, o radical superóxido pode ser metabolizado na mitocôndria pela SOD dependente de Mn (Mn-SOD) e no citosol pela SOD dependente de Cu ou Zn (Cu/Zn-SOD) (Figura 4) (NORDBERG; ARNER, 2001). Durante a biotransformação de compostos químicos, radicais superóxido podem ser produzidos e a atividade dessa enzima pode aumentar em função disso. Um exemplo disso é um estudo envolvendo peixes da espécie *Carassius auratus* que apresentaram aumento na atividade da SOD após quatro, sete e dez dias de exposição a 0,05 mg/L e 0,1 mg/L de óleo diesel (ZHANG *et al.*, 2004). Mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* coletados de áreas impactadas por derivados de petróleo também apresentaram aumento na atividade dessa enzima (LIMA *et al.*, 2007), indicando que esses tipos de compostos são capazes de aumentar a formação de ânion superóxido.



1.4.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma heme-enzima (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) encontrada dentro de peroxissomos e promove a redução do H_2O_2 em H_2O mais O_2 (Equação 1.3) (ZHANG *et al.*, 2004).



A vantagem da função antioxidante da catalase é que a eliminação do H_2O_2 impossibilita a formação do radical hidroxil, como acontece na reação de Fenton (Equação 1.4) produzida por metais de transição (NORDBERG; ARNER, 2001).



A catalase também é uma enzima muito usada como biomarcador de contaminação aquática, visto que o aumento em sua atividade já foi descrito em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* (NOGUEIRA *et al.*, 2011), mexilhões *Perna viridis* (CHEUNG *et al.*, 2001) e *Mytilus galloprovincialis* (LIMA *et al.*, 2007) expostos a derivados de petróleo e HPA.

1.4.3 Glutathiona peroxidase (GPx)

A família de enzimas GPx catalisa a redução de peróxido lipídicos e de hidrogênio (ZHANG *et al.*, 2004). Todas as isoformas utilizam a glutathiona como doadora de elétrons, transformando os peróxidos orgânicos em álcoois (Equação 1.5) (NORDBERG; ARNER, 2001).



Basicamente, a GPx reduz peróxidos utilizando os elétrons da GSH gerando, assim, glutathiona dissulfeto (GSSG). A GSSG pode ser novamente reduzida a GSH pela ação da glutathiona redutase (GR), que utiliza os elétrons do NADPH (Figura 5) (NORDBERG; ARNER, 2001; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A GPx é uma família de enzimas que possui um papel muito importante dentro do sistema antioxidante, visto que previne danos às biomembranas relacionados à peroxidação lipídica (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Dados na literatura mostram que essa enzima pode ser induzida na presença de HPA em *P. viridis* (CHEUNG *et al.*, 2001; RICHARDSON *et al.*, 2008), sendo utilizada em estudos de biomonitoramento.

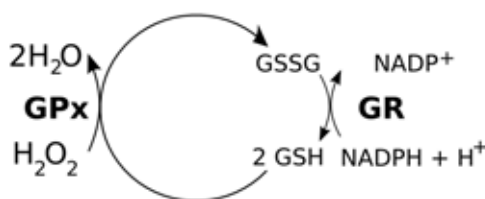


Figura 5: Esquema mostrando a atividade antioxidante da GPx sobre o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é reduzido pela GPx através da oxidação de duas moléculas de GSH formando GSSG. Em seguida, a GSSG pode voltar ao estado reduzido sob ação da GR sob o consumo de NADPH. Adaptado de Nordberg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

1.4.4 Glutathiona redutase

Apesar de não estar envolvida diretamente na defesa antioxidante do mesmo modo como as enzimas anteriormente descritas, a GR merece atenção devido a sua importância na manutenção do equilíbrio entre as formas reduzida e dissulfeto da glutathiona (GSH:GSSG) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; POMPELLA *et al.*, 2003), que além de combater diretamente ERO, serve de cofator para funcionamento de enzimas como a GST e GPx (REGOLI *et al.*, 2011). A GR catalisa a redução de GSSG em GSH por meio da oxidação do NADPH em NADP^+ . Já os níveis de NADPH são mantidos pela ação da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Maria e Bebianno (2011) relacionou a alteração na atividade da GR nas brânquias de mexilhões *M. galloprovincialis* expostos a ben-zopireno com a alteração na atividade da GST e GPx. Neste caso, o aumento na atividade da GR nas brânquias foi seguido pelo aumento na atividade da GST e da GPx e quando houve um declínio na GR na glândula digestiva desses animais, a GST e GPx também diminuíram a atividade. Tal fato ilustra claramente a importância desta enzima na manutenção dos níveis da glutathiona, que permitem o funcionamento adequado das enzimas que atuam no combate às ERO.

1.5 Respostas bioquímicas geradas pela hipóxia

O ambiente marinho sujeita seus habitantes a uma ampla variação nas concentrações de oxigênio, assim como flutuações na disponibilidade de O_2 ao longo do tempo. Em ambientes intertidais, os animais que habitam costões rochosos estão expostos a níveis extremamente flutuantes de O_2 que podem ir de zero até condições de hiperóxia ao longo do dia (ABELE *et al.*, 2007). Dependendo do estado da maré e da disposição vertical dos organismos nos costões, o estado de hipóxia ou anóxia pode durar algumas horas até vários dias (KUROCHKIN *et al.*,

2009; PIONTKIVSKA *et al.*, 2011).

Mexilhões costeiros são expostos periodicamente a essas mudanças na disponibilidade de oxigênio devido às oscilações da maré. Durante as marés baixas, moluscos bivalves são capazes de suportar os períodos de privação de oxigênio (ALMEIDA *et al.*, 2005). Quando a maré sobe, as conchas se abrem e os organismos são reoxigenados (reperfusão) (ABELE *et al.*, 2007). A exposição à hipóxia ou anóxia seguida de reoxigenação é responsável pela formação de ERO que podem levar os organismos a um estado de estresse oxidativo (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005, 2007).

Para lidar com esse tipo de situação de exposição ao ar, esses animais possuem várias adaptações que incluem tanto alterações no metabolismo e na fisiologia quanto mudanças comportamentais. Durante os períodos de exposição ao ar, bivalves podem fechar suas conchas e passarem para o metabolismo anaeróbico ou ainda alternar entre abertura e fechamento das valvas (*gaping*) permitindo a difusão de oxigênio na água presa dentro da cavidade do manto do mexilhão *Perna perna* (WIDDOWS *et al.*, 1979). Outra adaptação é a redução nos batimentos cardíacos. Moluscos da espécie *Choromytilus meridionalis* e *Perna perna*, por exemplo, apresentam uma rápida redução da taxa cardíaca (bradicardia) logo após serem expostos à hipóxia (MARSHALL; MCQUAID, 1993).

Invertebrados intertidais também conseguem lidar com hipóxia prolongada e anóxia pois podem temporariamente passar a produzir ATP anaerobicamente utilizando vias alternativas que produzem maior rendimento de ATP por unidade de substrato do que pela via da glicólise anaeróbica, além de reduzir o metabolismo para conservar os recursos energéticos (STOREY; STOREY, 1990).

Durante a hipóxia, apesar da baixa concentração de oxigênio molecular, a produção de ERO pode aumentar nas mitocôndrias, servindo como moléculas sinalizadoras que podem ativar fatores de resposta à hipóxia (CHANDEL *et al.*, 2000). Esse aumento de ERO acontece mais especificamente no complexo III de transporte de elétrons da mitocôndria, que paradoxalmente durante esse estado hipóxico, aumenta a produção de ânion superóxido, que subsequentemente é convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da superóxido dismutase dependente de manganês (CHANDEL *et al.*, 2000). Esse processo ocorre pois o complexo III aceita os elétrons doados à coenzima Q (ubiquinona) pelos complexos I e II e os transfere para o citocromo c. Enquanto que a coenzima Q aceita dois elétrons provenientes dos complexos I e II, o citocromo c aceita apenas um elétron por vez. Assim, o complexo III precisa remover um a um os elétrons para transferi-los para o citocromo c. A remoção do primeiro elétron da coenzima Q resulta na formação do radical semiquinona. Normalmente, o elétron desemparelhado da semiqui-

nona é transferido para o citocromo b do complexo III, porém, ele pode também reagir com o oxigênio molecular ainda presente para formar superóxido (MURPHY, 2009; HAMANAKA; CHANDEL, 2010). Acredita-se que a formação do peróxido de hidrogênio durante esse estado hipóxico atua como sinalizador de vários processos celulares como a estabilização do fator induzido por hipóxia (HIF-1, *hypoxia-inducible factor*) que regula a expressão de vários genes durante a escassez de oxigênio (CHANDEL *et al.*, 2000), como por exemplo aqueles envolvidos na via glicolítica como os genes da lactato desidrogenase e piruvato quinase (SEMENZA; ROTH; FANG, 1994; SEMENZA; JIANG; LEUNG, 1996).

A expressão do HIF é mediada pela dependência da subunidade HIF-1 α por oxigênio. Embora essa proteína seja produzida continuamente, durante a normóxia ela é rapidamente degradada. Em estado de hipóxia, essa proteína não sofre ubiquitinação e consequente degradação, mas se mantém estável. Assim, ela é transportada para o núcleo formando um dímero com o translocador nuclear receptor aril hidrocarboneto (ARNT - *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), o qual recruta ativadores transcricionais que regulam a expressão de diversos genes relacionados ao estado de hipóxia (NIKINMAA; REES, 2005). Kawabe e Yokoyama (2012) mostraram que os níveis de HIF-1 α mRNA e a respectiva proteína em ostras *Crassostrea gigas* foram induzidas por exposição ao ar, mostrando que em moluscos esse gene também ajuda no controle de mecanismos relacionados com a hipóxia.

Durante privação de oxigênio as defesas antioxidantes geralmente aumentam ou estão, pelo menos, em níveis similares ao do estado normóxico, uma resposta que pode ser associada a uma estratégia de defesa para proteger contra as ERO que são produzidas durante o estado hipóxico ou anóxico. Tal resposta pode também ser devido a um mecanismo de preparação para quando há a reintrodução do oxigênio, evitando a formação excessiva de ERO (ALMEIDA; DI MASCIO, 2011). De fato, algumas pesquisas demonstram que há alterações das defesas antioxidantes induzidas pelo período de escassez de oxigênio em invertebrados marinhos tais como aumento da catalase em poliquetas *Heteromastus filiformis* (ABELE; GROSSPIETSCH; PÖRTNER, 1998), aumento da atividade da Se-Gpx após 24 h de anoxia em gastrópodes *Biomphalaria tenagophila* (FERREIRA; ALENCASTRO; HERMES-LIMA, 2003), aumento da expressão dos genes da GPx em ostras *Crassostrea gigas* após 14 dias de exposição à água em condições hipóxicas (30% (v/v) saturação de O₂) (DAVID *et al.*, 2005) e aumento na atividade da GST em mexilhões *Perna perna* expostos ao ar por 18 horas (ALMEIDA *et al.*, 2005). Acredita-se que a ausência de aumento de danos oxidativos durante a reoxigenação é atribuída a pré-ativação desses sistemas antioxidantes durante a fase de hipóxia (GORR *et al.*, 2010). Porém, ainda são necessários muitos estudos para se entender tais mecanismos de defesa em bivalves.

Além disso, ainda pouco se sabe se estes níveis aumentados de enzimas antioxidantes induzidos pela hipóxia, também ajudam os organismos a se protegerem do aumento de ERO gerado pela exposição aos poluentes. Gorokhovaa *et al.* (2012) testaram a hipótese de que a co-exposição a contaminantes poderia aumentar o estresse oxidativo em animais bentônicos que vivem sobre condições de hipóxia, comprometendo a capacidade de recuperação após reoxigenação. Para isso, expuseram anfípodos *Monoporeia affinis* a sedimento coletado de áreas contaminadas por metais (Hg, Cd, Pb e Zn), HPA e BPC enquanto promovia condições flutuantes de hipóxia seguida de reoxigenação. A exposição aos contaminantes causou um aumento da CAT e da SOD, diminuição da razão GSH/ GSSG, aumento na peroxidação lipídica, e tornou lenta a recuperação pós-hipóxia. Estes resultados suportam a hipótese de que os contaminantes dificultam a capacidade dos animais para lidar com as flutuações na disponibilidade de oxigênio. Sendo assim, tais achados enfatizam a importância de compreender melhor as interações entre as respostas antioxidantes geradas por diferentes estressores e mecanismos fisiológicos de estresse oxidativo.

1.6 Biodiesel

De acordo com DeMello *et al.* (2007), uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis é o biodiesel, uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos derivados de gordura animal e óleos vegetais. O biodiesel é utilizado em soluções de B2 (2% de biodiesel com 98% de óleo diesel) até B100 (100% biodiesel, sem adição de combustível fóssil), sendo que quase todo o motor a diesel pode ser executado em B2 até B20 com características de desempenho comparáveis ao diesel 100% fóssil.

Quando comparado com combustíveis derivados do petróleo, o biodiesel apresenta muitas vantagens por ser mais biodegradável (PASQUALINO; MONTANÉ; SALVADÓ, 2006) e emitir menores concentrações de gases de efeito estufa (LEDUC *et al.*, 2009). No geral, as emissões de matéria particulada em suspensão e de monóxido de carbono diminuem com o aumento do conteúdo de biodiesel nas misturas com óleo diesel (XUE; GRIFT; HANSEN, 2011). Outro ponto positivo é que a combustão de curto prazo da mistura B20 também emite menos óxidos sulfúricos que o óleo diesel (LEE; HERAGE; YOUNG, 2004). Tais tipos de resultados nos levam a considerar o biodiesel como uma fonte de energia mais amigável ao ambiente. Entretanto, recentes pesquisas tem demonstrado que este biocombustível também aumenta a emissão de óxidos de nitrogênio (BASHA; GOPAL; JEBARAJ, 2009). Além disso, apesar da emissão de compostos aromáticos e policíclicos aromáticos ter sido considerada menor com o biodiesel (LAPUERTA; ARMAS; RODRÍGUEZ-FERNÁNDDZ, 2008), foi verificado que o biodiesel

misturado com óleo diesel em uma concentração de 3% (B3) pode aumentar os níveis de HPA na matéria particulada em suspensão (CÔRREA; ARBILLA, 2006).

Alguns efeitos tóxicos em organismos tem sido relacionados a exposição ao biodiesel puro ou a suas misturas com o óleo diesel. Brito *et al.* (2011) observaram que as partículas de escapamento geradas por esse biocombustível foram mais tóxicas que as de óleo diesel, pois promoveram mais alterações cardiovasculares, bem como inflamação pulmonar e sistêmica em camundongos. Além disso, foi demonstrado que o biodiesel promove efeitos mutagênicos e genotóxicos no teste com *Salmonella* (LEME *et al.*, 2012) e estresse oxidativo em peixes de água doce como *O. niloticus* (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

No Brasil, desde primeiro de janeiro de 2010, passou a ser obrigatório o uso do B5 em todo óleo diesel consumido (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2010). Já utilização de biodiesel puro e de suas misturas com óleo diesel em teores diversos do autorizado pela legislação vigente, de acordo com a Resolução ANP nº2, de 29 de janeiro de 2008, fica restrito ao uso específico, ou seja, a utilização em caráter experimental em frota cativa ou equipamento industrial locado em seu estabelecimento (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2008). Além disso, o diesel marítimo, que não recebe a adição de 5% de biodiesel, pode passar a ter a adição do biocombustível, visto que a Petrobras iniciou estudos para introduzi-lo como combustível para a frota marinha brasileira (BIODIESELBR ONLINE, 2011). Assim, derrames e vazamentos acidentais no ambiente aquático podem ocorrer durante o armazenamento, transporte e uso desse composto. Uma vez que o biodiesel provavelmente torna a mistura com o óleo diesel mais lipofílica, e portanto mais facilmente absorvida pelos organismos, esse combustível pode promover um aumento da biodisponibilidade de compostos tóxicos presentes no óleo diesel, tais como HPA, em organismos aquáticos (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Além disso, algumas pesquisas têm proposto a adição de biodiesel ao óleo derramado biorremediar sítios contaminados por petróleo e derivados (PASQUALINO; MONTANÉ; SALVADÓ, 2006; PEREIRA; MUDGE, 2004). Uma vez que o biodiesel pode promover alguns efeitos tóxicos, o custo-benefício dessa técnica de biorremediação para o meio ambiente deve ser avaliada.

Até o momento, há poucos estudos que demonstram os efeitos do biodiesel sobre os organismos marinhos. Um deles mostra que o metanol presente na fração solúvel em água do biodiesel produzido a partir de óleos vegetais provavelmente foi responsável pelos efeitos tóxicos em ouriço do mar *Echinometra lucunter* e microalgas *Tetraselmis chuii* (LEITE *et al.*, 2011). Uma vez que o ambiente marinho acaba sendo o destino final de muitos contaminantes, é importante saber se esta nova fonte de energia pode causar danos aos ecossistemas. Uma maneira de avaliar esse tipo de impacto é avaliar biomarcadores bioquímicos relacionados com

a biotransformação de xenobióticos e estresse oxidativo em organismos sentinelas.

2 *Objetivos*

A hipótese central que foi estudada neste estudo leva em consideração que, por estarem sujeitos durante toda sua vida às condições extremamente adversas nos costões rochosos devido às oscilações de maré que os submetem a ciclos periódicos de exposição ao ar e re-submersão em água (hipóxia/ reperusão), os mexilhões desenvolveram respostas extremamente rápidas em seus sistemas de defesa antioxidante para evitar o estresse oxidativo. Como um dos efeitos clássicos da exposição a contaminantes ambientais é o estresse oxidativo, foi verificado se as respostas antioxidantes acionadas nos mexilhões *Perna perna* (Mytilidae, Bivalvia) devido à exposição ao ar (hipóxia) contribuem para modificar a resposta também à exposição a contaminantes ambientais, no caso, o óleo diesel contendo 5% de biodiesel (B5) e também se esse contaminante afeta o metabolismo da hipóxia.

Assim, com este estudo pretendeu-se:

- Avaliar se em brânquias e glândula digestiva de mexilhões expostos às concentrações de 0,01 e 0,1 mL/L de B5 durante os tempos de exposição de 6 h, 12 h, 48 h e 168 h sofrem alteração nos seguintes parâmetros: enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione redutase (GR), nível de peroxidação lipídica quantificado pela concentração de malondialdeído (MDA) e concentração de glutathione (GSH).
- Analisar qual o efeito da exposição ao ar (hipóxia) por 6 h, 12 h, 18 h e 24 h nos seguintes parâmetros medidos nas brânquias e glândula digestiva dos mexilhões: enzimas SOD, CAT, GPx, GST e GR, nível de peroxidação lipídica quantificado pela concentração de MDA e concentração de GSH.
- Utilizando as informações geradas pelos experimentos de exposição ao B5 e à hipóxia, foi avaliado qual o efeito da reimersão por 48 h em água limpa e em água contaminada com B5 0,01 mL/L após um período de exposição ao ar (hipóxia) de 24 h, sobre os mesmos

parâmetros bioquímicos analisados nos dois experimentos anteriores, além do ensaio de retenção do vermelho neutro na hemolinfa.

- Também foi verificado se a exposição prévia por 48 h a 0,01 mL/L de biodiesel B5 seguida por 24 h de hipóxia afeta os parâmetros bioquímicos analisados nos dois experimentos anteriores, além do ensaio de retenção do vermelho neutro na hemolinfa.

3 *Material e Métodos*

Os experimentos de exposição ao biodiesel e à hipóxia foram realizados junto ao Laboratório de Defesas Celulares coordenado pelo Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre, na Universidade Federal de Santa Catarina em junho de 2011. Já o experimento de hipóxia seguida de reoxigenação em água limpa e água contaminada por B5 desse projeto mais o teste de retenção do vermelho neutro foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da UNISANTA em colaboração com o Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira em fevereiro de 2012. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, UNESP, São José do Rio Preto, SP.

3.1 Organismos teste

Nos experimentos deste projeto foi utilizada a espécie de mexilhão *Perna perna* (Bivalvia, Mytilidae). Antes dos experimentos os mexilhões passaram por período de aclimação de cinco dias. Cada aquário foi preenchido com 1 L de água do mar filtrada por animal, que ficou sob aeração constante e temperatura em torno de 15 °C. A água foi trocada a cada 24 horas. Nos experimentos de exposição ao B5 e à hipóxia os animais foram alimentados a cada dois dias (10 μ por animal) com mistura comercial a base de fitoplankton (Sera Coraliquid). No terceiro experimento, os animais não foram alimentados.

Para os experimentos de exposição ao B5 e à hipóxia realizados em junho de 2011, os mexilhões foram comprados de maricultura em Florianópolis-SC. Para o terceiro experimento, que foi realizado em fevereiro de 2012, os mexilhões foram coletados de costão rochoso situado na Ilha das Palmas, Santos-SP.

3.2 B5

Como desde janeiro de 2010, o B5 é obrigatório como óleo combustível no Brasil (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2010), essa mistura foi obtida em um posto de combustível

(Ipiranga). As concentrações do B5 utilizada neste estudo foram escolhidas de acordo com trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Protocolo de exposição ao B5

Os mexilhões foram expostos às concentrações de 0,01 mL/L e 0,1 mL/L de B5. Cada grupo foi exposto pelo período de 6 horas, 12 horas, 48 h e 168 h. Para cada grupo experimental foram utilizados oito mexilhões (Figura 6). Passados os tempos de exposição especificados, os mexilhões foram dissecados e suas glândulas digestivas e brânquias foram retiradas e armazenadas à -80 °C. A massa dos animais com concha utilizados neste experimento foi de $26,64 \pm 9,27$ g (média $\pm$ desvio padrão). O pH médio da água foi de 7,7.

	6 horas	12 horas	2 dias	7 dias
Controle	n= 8	n= 8	n= 8	n= 8
B5 0, 01 mL/L	n= 8	n= 8	n= 8	n= 8
B5 0,1 mL/L	n= 8	n= 8	n= 8	n= 8

Figura 6: Esquema mostrando o planejamento para o experimento de exposição de mexilhões ao B5. Cada retângulo representa um aquário contendo oito mexilhões.

3.3.2 Protocolo do experimento de hipóxia

Para verificarmos os efeitos da hipóxia gerada pela exposição aérea nas variáveis propostas, os mexilhões (n=8 por grupo) passaram 6 h, 12 h, 24 h e 48 h expostos ao ar, enquanto que os animais dos respectivos grupos controles ficaram imersos nos aquários (Figura 7). Passado os períodos de hipóxia determinados, os mexilhões foram dissecados e suas glândulas digestivas e brânquias foram retiradas e armazenadas à -80 °C para as análises bioquímicas. A massa dos animais com concha utilizados neste experimento foi de $23,61 \pm 5,58$ g (média $\pm$ desvio padrão). O pH médio da água dos aquários dos grupos controles foi de 7,7.

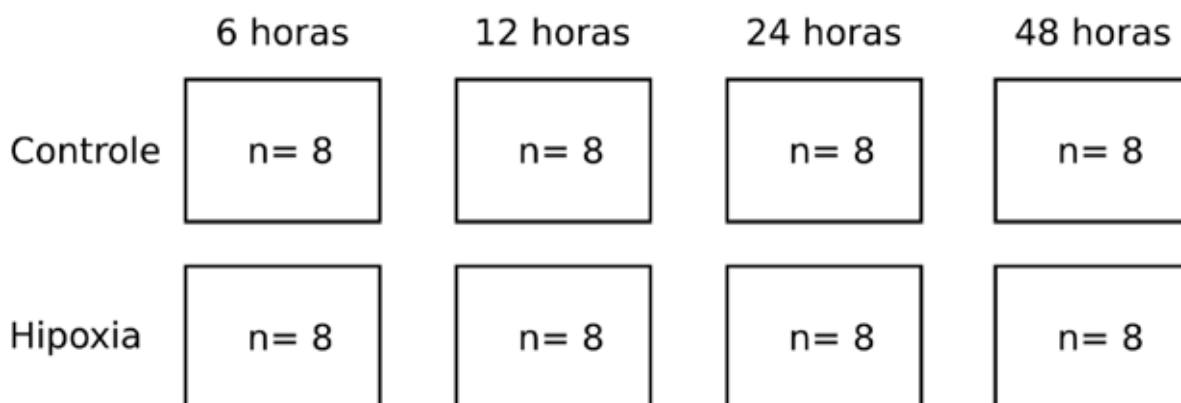


Figura 7: Esquema mostrando o planejamento para o experimento de hipóxia. Os grupos controles permaneceram imersos, enquanto os tratados permaneceram fora da água, simulando a condição de hipóxia. Cada retângulo representa um aquário contendo oito mexilhões.

3.3.3 Protocolo do experimento de combinação do efeito da hipóxia com a exposição ao B5

Uma vez realizados os experimentos de exposição ao B5 e à hipóxia, foi feito este terceiro experimento integrando os estressores, em que os animais foram expostos a condições de hipóxia seguida de exposição ao B5 e de exposição ao B5 seguida de exposição a hipóxia, de forma a avaliar se a hipóxia gerada pela exposição aérea interfere na maneira pela qual o mexilhão responde ao B5 e vice-versa. Para tanto, foram selecionados o tempo de hipóxia de 24 horas e o tempo de 48 horas de exposição à concentração de 0,01 mL/L de B5, conforme os resultados dos testes anteriores. Este experimento foi realizado com dez mexilhões por grupo experimental, totalizando 50 animais.

Os mexilhões foram divididos em cinco grupos, sendo um controle imerso por 48 h, um grupo que foi deixado em água limpa por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia, um grupo exposto ao B5 (0,01 mL/L) por 48 h seguido de 24 h de hipóxia, outro grupo foi colocado primeiramente em hipóxia por 24 h e depois colocado em água do mar limpa por 48 h e, finalmente, um grupo colocado em 24 h de hipóxia seguida de 48 h de exposição ao biodiesel B5 (0,01 mL/L). Ao término do experimento, os mexilhões foram coletados e as brânquias e glândulas digestivas foram extraídas e congeladas à -80 °C. A figura 8 mostra o esquema do planejamento para este experimento. A massa dos animais com concha utilizados neste experimento foi de $46,06 \pm 14,05$ g (média $\pm$ desvio padrão). O pH dos aquários ficou em torno de 8,5.

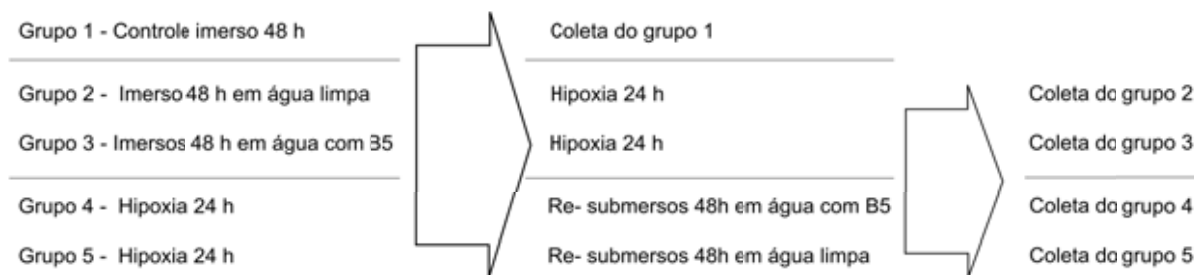


Figura 8: Esquema mostrando o planejamento para o experimento do efeito combinado da hipóxia com a exposição ao B5

3.4 Descarte de resíduos tóxicos

Todos os resíduos químicos produzidos durante as análises foram devidamente armazenados em recipientes apropriados para o descarte e recolhidos pela Comissão de Segurança Química da Unesp de São José do Rio Preto, que procedeu com o tratamento a todos eles.

3.5 Análises bioquímicas e citotóxica

3.5.1 Preparo das amostras para análise das enzimas GST, SOD, CAT, GPx, GR

Para as análises enzimáticas da GST, SOD, CAT, GPx e GR os tecidos foram homogeneizados (1:4, vol:vol) em tampão Tris 20 mM, pH 7,4, contendo sacarose 0,5 mM, KCl 0.15 mM e inibidor de protease (PMSF) 1 mM, e centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos a 2°C. A porção sobrenadante foi coletada e centrifugada novamente a 50.000 x g por uma hora a 3 °C. Em seguida, a porção sobrenadante foi coletada e armazenada a -80 °C para as posteriores análises da atividade enzimática utilizando espectrofotômetro.

3.5.2 Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada pelo método de Keen, Habig e Jakoby (1976). O volume de 10 µL de amostra foi adicionada em um meio de reação contendo 970 µL de tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 6,5, 10 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 100 mM e 10 µL de glutathione 100 mM. O aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm e a 30°C.

3.5.3 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida pelo método de McCord e Fridovich (1969). Tal método baseia-se em um sistema de geração de superóxido (xantina/xantina oxidase) acoplado à redução do citocromo c pelo radical ânion superóxido, provocando aumento de absorbância em 550 nm a 28 °C. A adição da amostra contendo a SOD promove uma inibição na velocidade de redução do citocromo c, uma vez que a SOD compete com o citocromo c pelo superóxido.

3.5.4 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, através do decréscimo de absorbância em 240 nm a 30°C. Para isso, adiciona-se 10 µL de amostra em 990 µL de meio de reação (pH 8,0) composto por tampão Tris 1 M contendo EDTA 5 mM e peróxido de hidrogênio 10 mM.

3.5.5 Glutathiona peroxidase (GPx)

A análise da GPx foi feita pela técnica de Sies *et al.* (1979). Este método baseia-se na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm e a 30 °C, promovido durante a redução da glutathiona oxidada (GSSG). A redução é catalisada por glutathiona redutase em presença de NADPH a 30°C. O ensaio foi feito adicionando-se 50 µL da amostra homogeneizada e 10 µL de peróxido de terc-butila 0,5 mM a 940 µL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 mM e pH 7,0, EDTA 5 mM e pH 7,0, 0,172 mg de NADPH/ mL do meio reação, glutathiona redutase 0,1 U/mL e 0,32 mg de GSH/ mL.

3.5.6 Glutathiona redutase (GR)

O método utilizado para avaliar a atividade da GR foi baseado em Carlberg e Mannervik (1985). O ensaio é realizado adicionando-se à cubeta o volume para completar 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, contendo EDTA 0,001 M, 20 µL de GSSG, 20 µL de NADPH e amostra no volume de 5 µL para glândula digestiva e 10 µL para brânquias. O método avalia o decréscimo da absorbância a 340 nm, a 30°C, gerado pelo consumo do NADPH.

3.5.7 Análise de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976).

3.5.8 Ensaio do tempo de retenção do Vermelho Neutro

O ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro (VN) (LOWE; FOSSATO; DEPLEDGE, 1995) foi realizado apenas no experimento de hipóxia seguida de reimersão em água contaminada por B5 e de exposição ao B5 seguida de hipóxia. Em torno de 0,5 mL de hemolinfa foi retirada do músculo adutor dos mexilhões por meio de uma seringa contendo solução fisiológica salina. Essa solução é preparada dissolvendo-se 0,477 g de Hepes, 2,54 g de cloreto de sódio, 1,30 g de sulfato de magnésio, 0,075 g de cloreto de potássio e 0,147 g de cloreto de cálcio em 10 mL de água destilada. A solução fisiológica contendo a hemolinfa foi transferida para tubos de centrífuga. Em seguida, 40 μ L de cada amostra foram colocados em lâminas pré-tratadas com poli-L-lisina para uma melhor aderência das células. As lâminas foram então colocadas em uma câmara úmida à prova de luz por 15 minutos para permitir a adesão dos hemócitos na superfície. Passado o período de incubação, 40 μ L de corante vermelho neutro foi colocado sobre as amostras e novamente as lâminas foram incubadas por mais 15 minutos na câmara escura e úmida, e então foram cobertas com uma lamínula. A solução estoque de VN foi previamente preparado dissolvendo-se 28,8 mg do corante em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) em um vidro âmbar. No dia da análise, para preparar a solução final do corante, pipetou-se 10 μ L da solução estoque de VN em 5 mL da solução fisiológica, que foi mantida em temperatura ambiente.

O exame das lâminas foi feito com um microscópio de luz (aumento= 40x) a cada 15 minutos até completar 180 minutos ou até que 50% ou mais das células tenham exibido extravasamento lisossomal e/ ou mudanças estruturais como aumento de tamanho. Quando isso acontecia, o tempo de retenção do corante pelos lisossomos era anotado. No intervalo entre cada exame, as lâminas foram mantidas dentro da câmara escura e úmida. Os critérios adotados para a análise das células são de acordo com as mudanças estruturais (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios adotados para a análise celular no teste de retenção do vermelho neutro.

Caracteres avaliados	Célula saudável	Célula estressada
Forma da célula	Irregular	Redonda
Tamanho da célula	Grandes	Tornam-se menores
Número de lisossomos	Muitos	Poucos
Tamanho dos lisossomos	Pequenos	Tornam-se maiores
Cor dos lisossomos	Vermelho claro, rosa	Vermelho escuro, rosa escuro, marrom ou alaranjado
Pseudopodia	Ausente	Presente
Extravasamento celular	Ausente	Pode estar presente

3.5.9 Peroxidação lipídica

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica nos tecidos, foi detectada a presença do produto formado entre o MDA e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), via cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector UV (HPLC/UV) (ALMEIDA *et al.*, 2003, 2004).

A massa de 100 mg de tecido foi homogeneizada em 300 μ L de tampão Tris 100 mM, pH 8,0. Em seguida, 300 μ L de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2 M foram adicionados. Este meio contendo as amostras foi incubado por 40 minutos a 90 °C. Depois deste período, as amostras contendo MDA-TBA foram extraídas com 1 mL de n-butanol após centrifugação a 3500 rpm por 3 minutos a 4 °C. No HPLC, as amostras foram injetadas diretamente (20 μ L) e monitoradas a 532 nm. A fase móvel utilizada foi solução fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% metanol, bombeada isocraticamente (0,9 mL/min). A coluna utilizada foi uma LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m de diâmetro de poro). A quantificação do MDA foi feita com base em uma curva de calibração utilizando como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano. A identificação e quantificação do pico de MDA foi realizada por meio do software EasyChrom (Agilent Technologies). Dados foram expressos em nmol/mg de tecido.

3.5.10 Glutathiona reduzida (GSH)

Os tecidos foram homogeneizados com ácido perclórico 0,5 M (1:10, massa:volume) e centrifugados por dez minutos a 5000 x g a 4 °C. Após a centrifugação, a fração sobrenadante foi coletada. A concentração de GSH foi determinada por HPLC acoplado a um detector eletroquímico coulométrico (Coulochem III ESA, Bedford, MA), associado a uma célula mantida em um potencial de + 900 mV e uma célula dual analítica fixada em 300 mV (primeira célula) e em 650 mV (segunda célula). As amostras foram separadas em coluna C-18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) a um fluxo isocrático de 0,9 mL/min e a identificação e quantificação do pico de GSH foi realizada por meio do software EasyChrom (Agilent Technologies). A concentração de GSH foi quantificada com base em uma curva padrão previamente injetada com concentrações conhecidas de GSH (RODRÍGUEZ-ARIZA; TORIBIO; LÓPEZ-BAREA, 1994).

3.6 Análise estatística

Para o experimentos de exposição ao biodiesel e de exposição ao ar seguida por reimersão em água com B5, foram aplicados testes para verificar a normalidade (Shapiro-Wilk) e homoge-

neidade das variâncias (Levene). Em caso de dados paramétricos, foi aplicado Anova One-Way seguido do teste de Tukey. Para dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Para o experimento de hipóxia, também foram verificadas a normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade da variância (Levene). No caso de dados paramétricos, os grupos controle e exposto ao ar foram comparados pelo teste t de Student. Para dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas foram aceitas somente para $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o programa R versão 2.15.2. No apêndice deste trabalho encontram-se as tabelas com todos os valores de p para os testes estatísticos realizados neste trabalho.

4 *Resultados*

4.1 Efeitos da exposição à mistura B5

4.1.1 Glutathione S- transferase

Houve diferenças na atividade da GST nas brânquias dos mexilhões expostos por 48 h ao biodiesel. Essa diferença se deve à diminuição da atividade da GST nas brânquias dos animais que foram tratados com a concentração de 0,01 mL/L de biodiesel quando comparados ao grupo controle (Figura 9). Nas glândulas digestivas dos mexilhões não houve alterações na GST em resposta aos tratamentos (Figura 9).

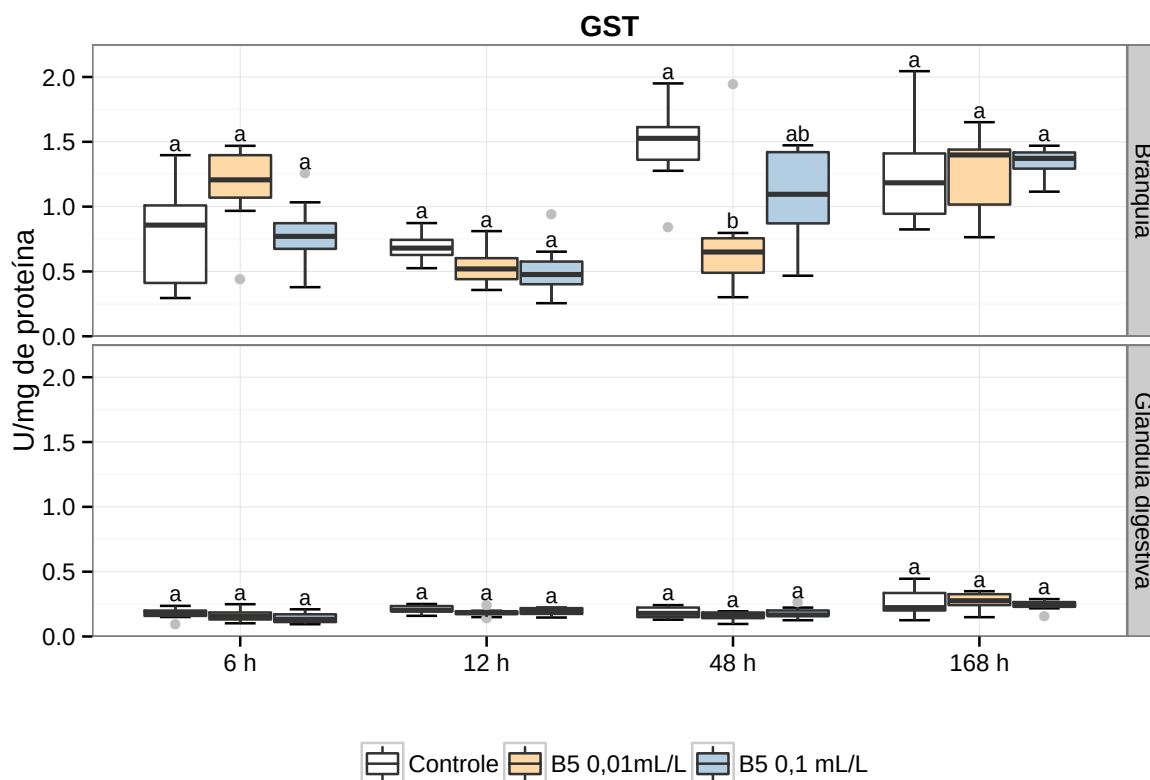


Figura 9: Box plot mostrando a atividade de GST em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* expostos ao biodiesel. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. A comparação foi feita apenas entre os grupos do mesmo período de exposição e não entre os grupos de diferentes períodos de exposição ao biodiesel.

4.1.2 Superóxido dismutase

Não houve alterações na atividade da SOD presente nas brânquias em nenhum período de exposição nos mexilhões expostos ao biodiesel (Figura 10). Contudo, a atividade da SOD na glândula digestiva apresentou diferenças entre tratamentos quando os mexilhões foram expostos por 12 h aos contaminantes. Para o tratamento de 12 h, a atividade da SOD ficou reduzida nos animais expostos ao B5 0,01 mL/L em relação ao controle e ao grupo B5 0,1 mL/L (Figura 10).

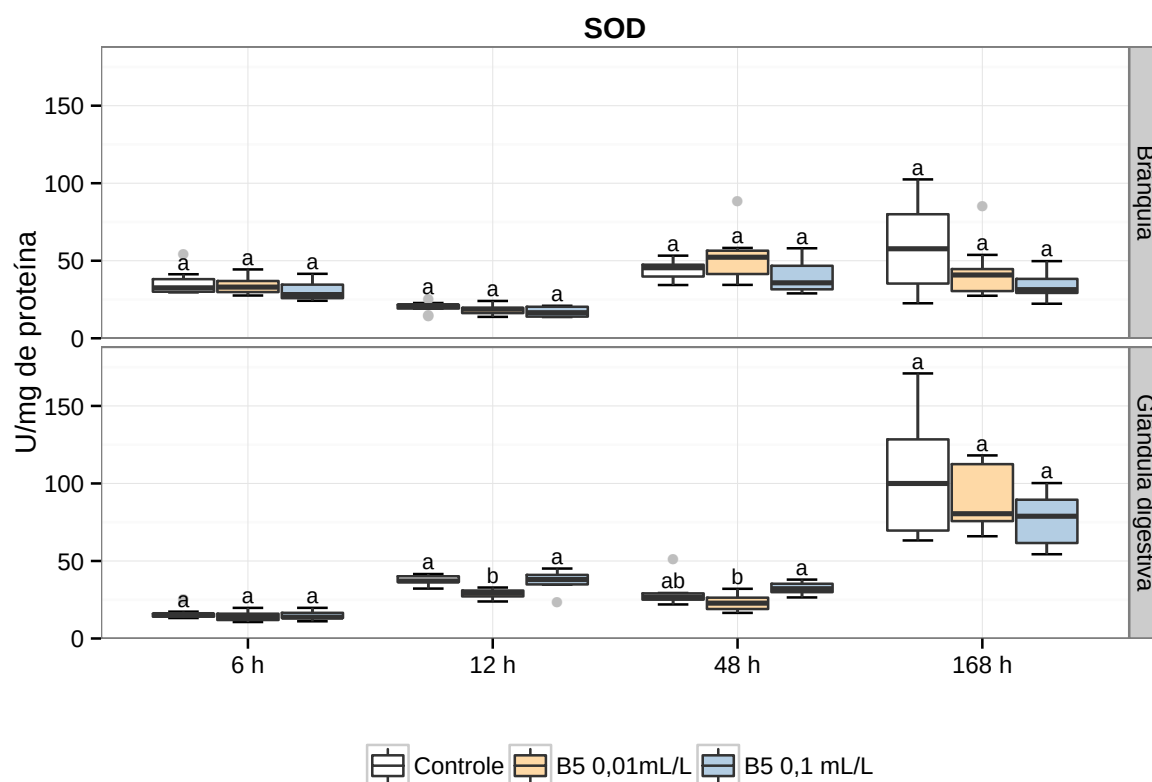


Figura 10: Box plot mostrando a atividade de SOD em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* expostos ao biodiesel. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. A comparação foi feita apenas entre os grupos do mesmo período de exposição e não entre os grupos de diferentes períodos de exposição ao biodiesel.

4.1.3 Catalase

A atividade da catalase, tanto nas brânquias quanto nas glândulas digestivas, não apresentou alterações entre os grupos expostos ao biodiesel em nenhum período de exposição (Figura 11).

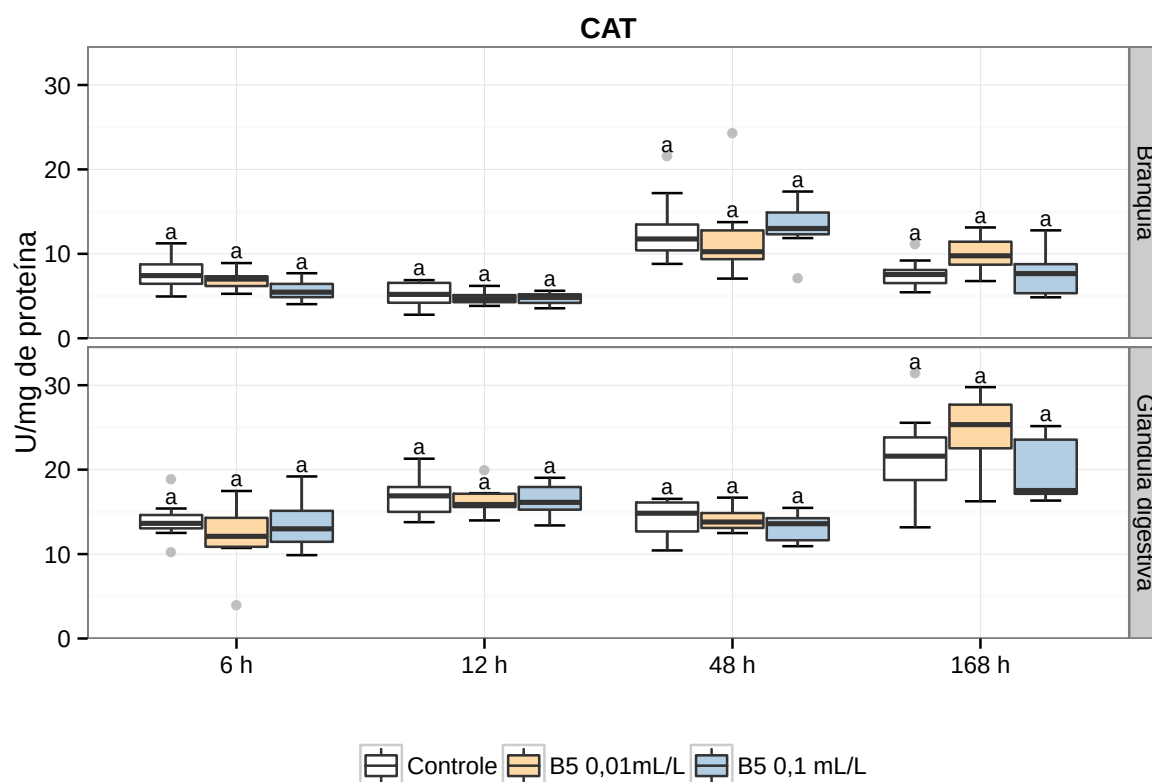


Figura 11: Box plot mostrando a atividade de CAT em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* expostos ao biodiesel. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. A comparação foi feita apenas entre os grupos do mesmo período de exposição e não entre os grupos de diferentes períodos de exposição ao biodiesel.

4.1.4 Glutathiona peroxidase

A atividade da GPx nas brânquias dos mexilhões expostos a ambas concentrações de biodiesel B5 não apresentou diferenças estatisticamente significativas em nenhum período de exposição (Figura 12). No entanto, a atividade dessa enzima na glândula digestiva sofreu alterações no período de 6 h e 48 h de tratamento. Após 6 h de exposição ao B5 0,1 mL/L houve redução na atividade da GPx e após 48 h, a atividade dessa enzima na glândula digestiva dos mexilhões expostos ao biodiesel 0,01 mL/L foi menor que no respectivo controle (Figura 12).

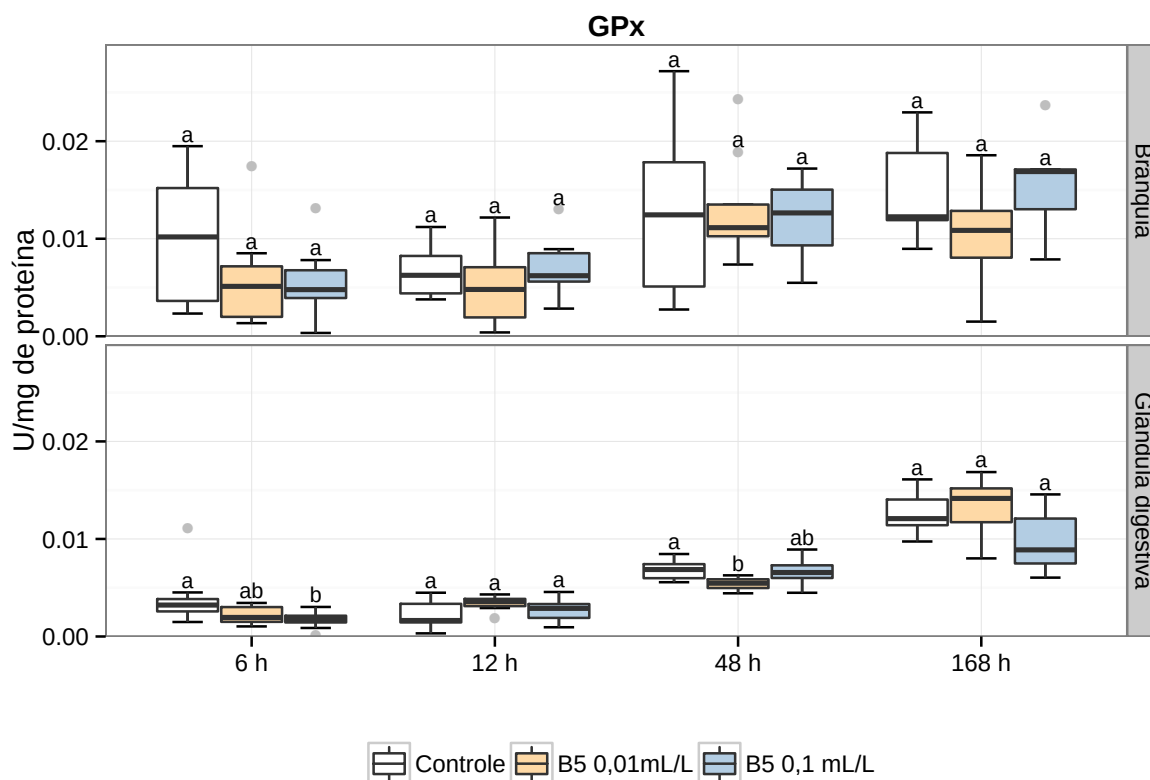


Figura 12: Box plot mostrando a atividade de GPx em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* expostos ao biodiesel. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. A comparação foi feita apenas entre os grupos do mesmo período de exposição e não entre os grupos de diferentes períodos de exposição ao biodiesel.

4.1.5 Glutathiona redutase

A atividade da GR nas brânquias apresentou diferenças significativas em relação aos tratamentos de 12 h de exposição. Neste caso, a atividade da GR ficou reduzida em relação ao controle nas brânquias dos animais expostos a ambas concentrações do contaminante (Figura 13).

A atividade desta enzima nas glândulas digestivas foi alterada nos períodos de 12 h e 168 h de tratamento. Em 12 h, a atividade da GR na glândula digestiva dos mexilhões expostos ao biodiesel 0,1 mL/L foi maior em relação ao controle e ao grupo exposto a 0,01 mL/L do combustível. Em 168 h, os mexilhões expostos a ambas concentrações de biodiesel apresentaram menor atividade da GR em relação ao controle (Figura 13).

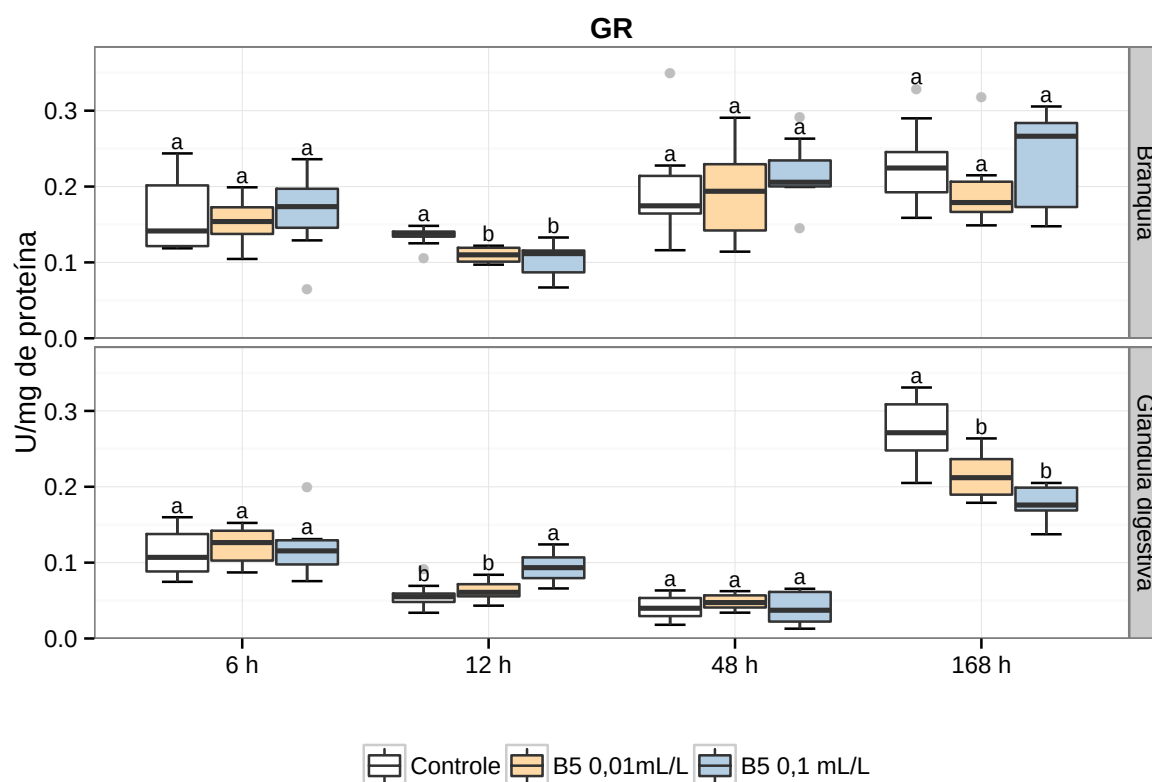


Figura 13: Box plot mostrando a atividade de GR em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* expostos ao biodiesel. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. A comparação foi feita apenas entre os grupos do mesmo período de exposição e não entre os grupos de diferentes períodos de exposição ao biodiesel.

4.1.6 Glutathiona

A GSH nas brânquias apresentou diferenças significativas em relação aos tratamentos de 48 h de exposição. Os níveis deste peptídeo aumentou no grupo exposto a maior concentração de biodiesel (Figura 14).

Já na glândula digestiva houve diferenças entre a concentração de GSH nos grupos expostos a 6 h, 12 h e 168 h ao biodiesel. Para os tratamentos de 6 h, a concentração de GSH aumentou para os animais expostos a maior concentração de B5. Em 12 h, os níveis de GSH ficaram reduzidos nos mexilhões expostos a 0,01 mL/L de biodiesel e aumentados naqueles expostos a 0,1 mL/L de biodiesel quando comparados aos respectivos controles. Após 168 h também podemos observar um aumento nos animais expostos a menor concentração de B5 (Figura 14).

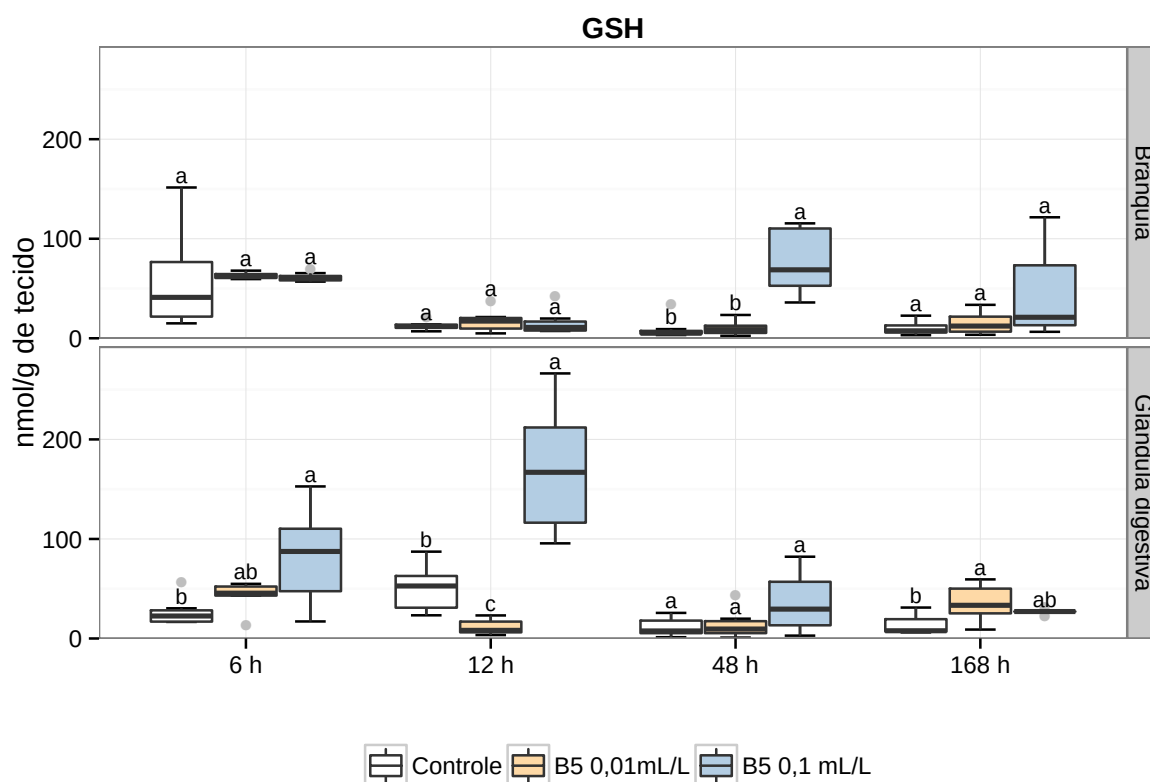


Figura 14: Box plot mostrando a concentração de GSH em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* expostos ao biodiesel. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. A comparação foi feita apenas entre os grupos do mesmo período de exposição e não entre os grupos de diferentes períodos de exposição ao biodiesel.

4.1.7 Peroxidação lipídica

Foram encontradas diferenças significativas na concentração de MDA nas brânquias dos animais expostos por dois dias ao B5. Durante esse período, a concentração de MDA foi menor nas brânquias expostas a ambas concentrações de biodiesel B5 quando comparamos ao respectivo grupo controle (Figura 15).

Na glândula digestiva, a concentração de MDA sofreu alterações apenas após seis horas de exposição ao biodiesel. Essa diferença está relacionada ao aumento da concentração de MDA no grupo exposto à 0,1 mL/L de B5 em relação ao grupo exposto à 0,01 mL/L do mesmo contaminante (Figura 15).

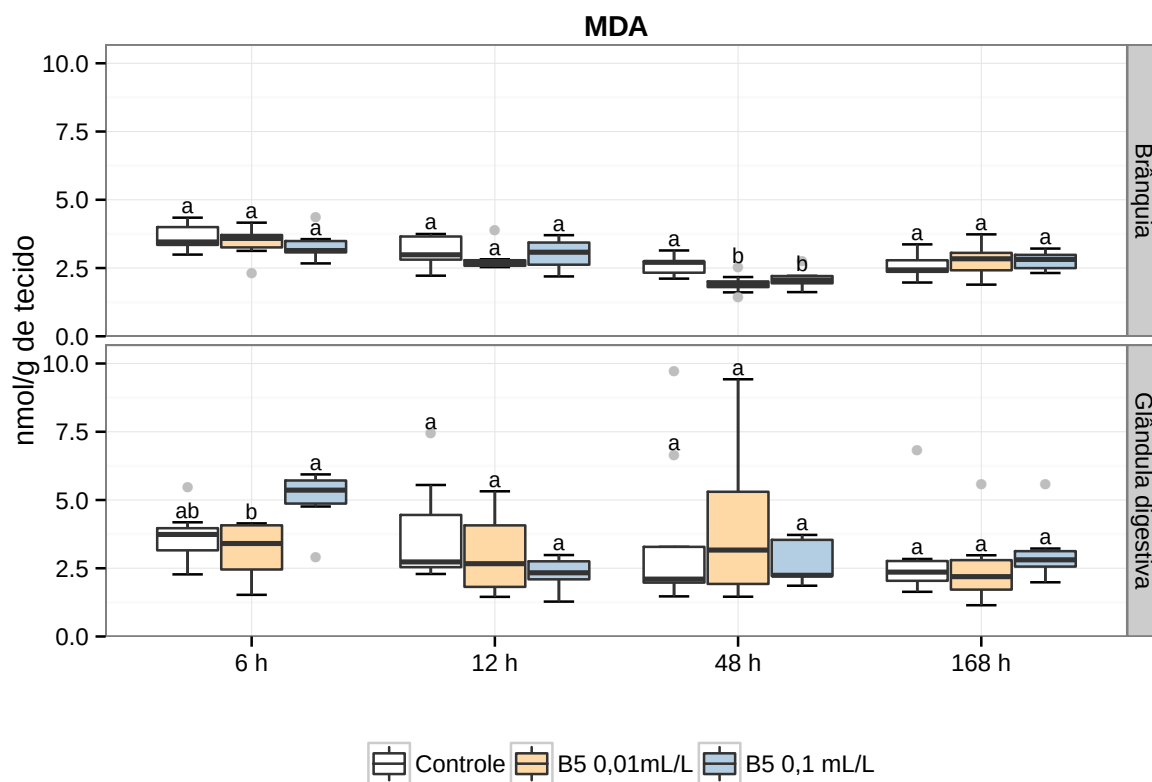


Figura 15: Box plot mostrando a atividade de MDA em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* expostos ao biodiesel. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. A comparação foi feita apenas entre os grupos do mesmo período de exposição e não entre os grupos de diferentes períodos de exposição ao biodiesel.

4.2 Efeitos da hipóxia

4.2.1 Glutathione S-transferase

Não houve diferenças na atividade da GST nas brânquias e nem na glândula digestiva dos mexilhões em hipóxia (Figura 16).

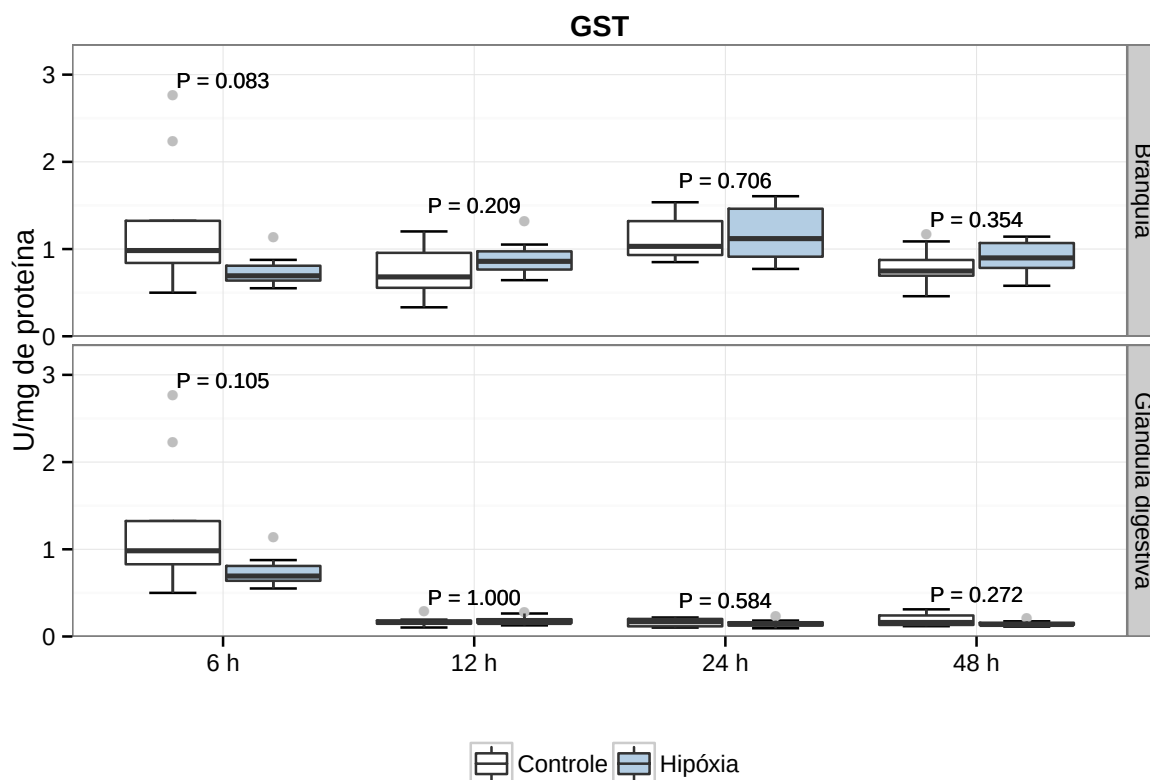


Figura 16: Box plot mostrando a atividade de GST em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* após um período de hipóxia.

4.2.2 Superóxido dismutase

A atividade da SOD nas brânquias foi significativamente menor nos mexilhões que permaneceram em hipóxia por 24 h e 48 h quando comparados com seus respectivos controles que permaneceram imersos em água (Figura 17).

Na glândula digestiva, após 12 h de hipóxia, a atividade da SOD foi menor que no controle submerso. Os períodos mais prolongados de hipóxia (24 h e 48 h) não alteraram a atividade dessa enzima na glândula digestiva (Figura 17).

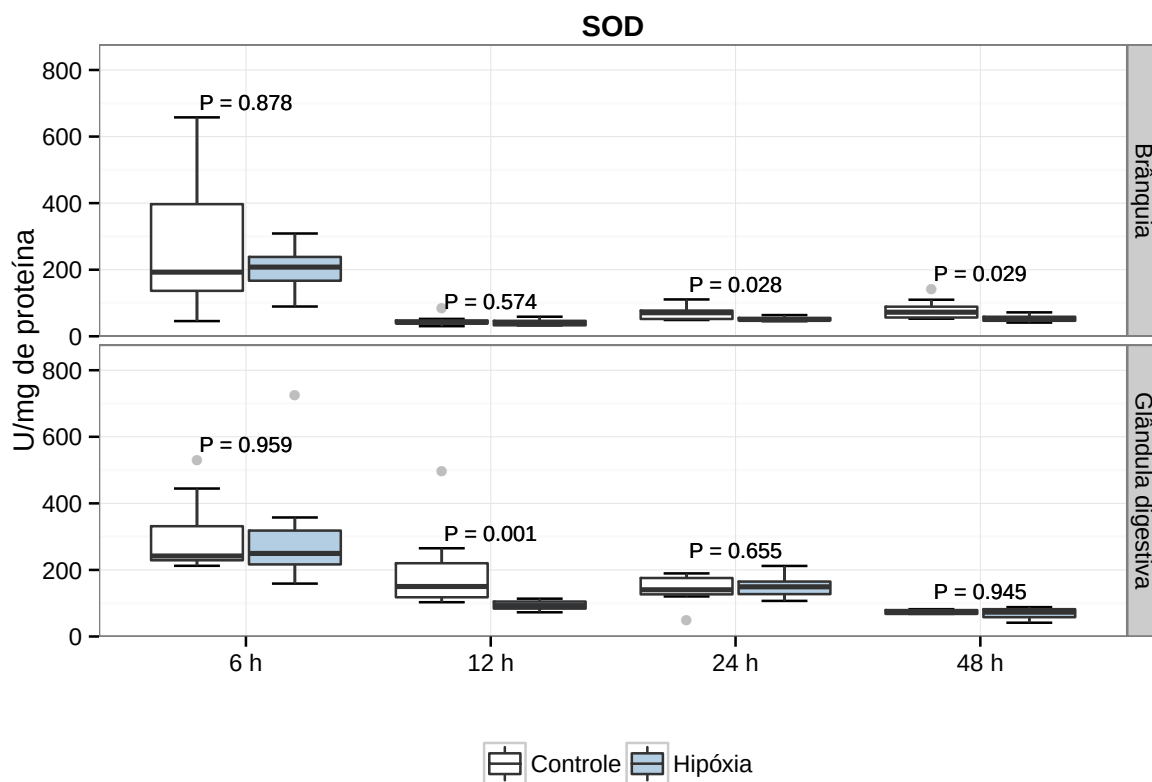


Figura 17: Box plot mostrando a atividade de SOD em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* após um período de hipóxia.

4.2.3 Catalase

Nas brânquias dos mexilhões que permaneceram 24 h em hipóxia, a atividade da catalase foi significativamente menor que no seu respectivo controle. Entretanto, na glândula digestiva não houve alteração na atividade dessa enzima em nenhum dos tratamentos (Figura 18).

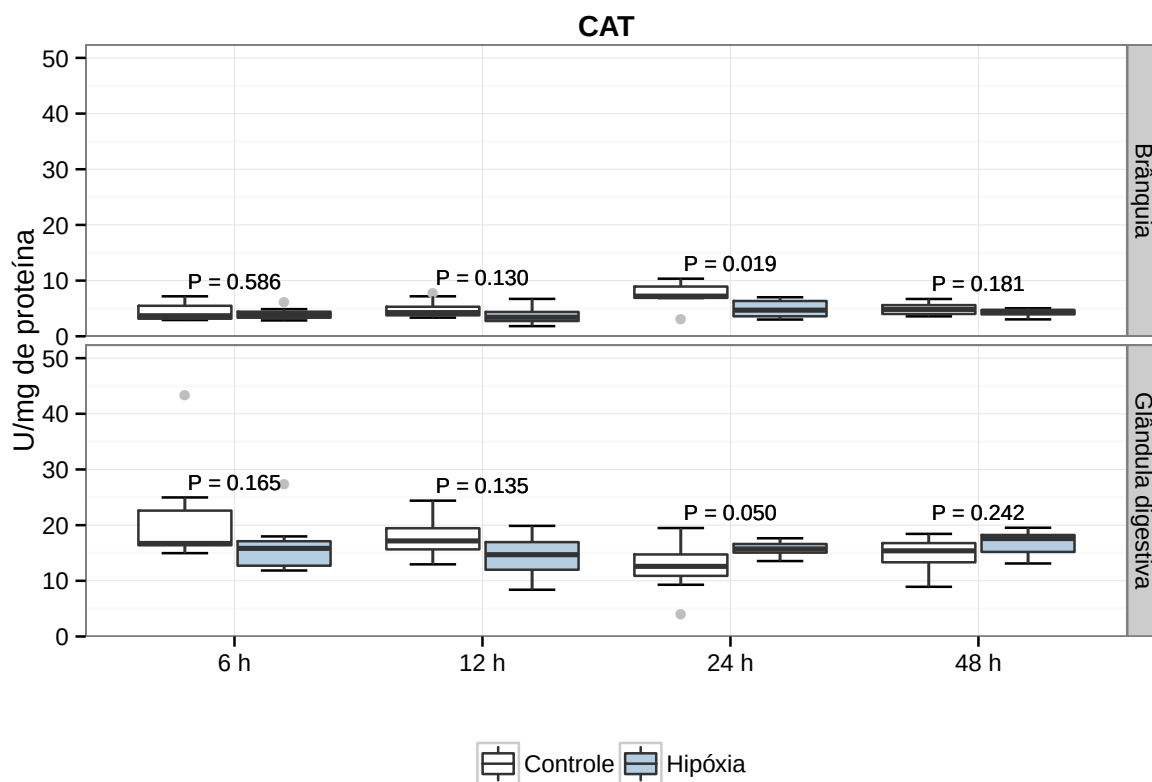


Figura 18: Box plot mostrando a atividade de CAT em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* após um período de hipóxia.

4.2.4 Glutathiona peroxidase

A atividade da GPx nas brânquias dos mexilhões expostos à hipóxia não sofreu alterações estatisticamente significativas em nenhum dos períodos experimentais. Entretanto, na glândula digestiva houve aumento significativo na atividade da GPx em relação ao controle no grupo de mexilhões que permaneceram por 48h em hipóxia (Figura 19).

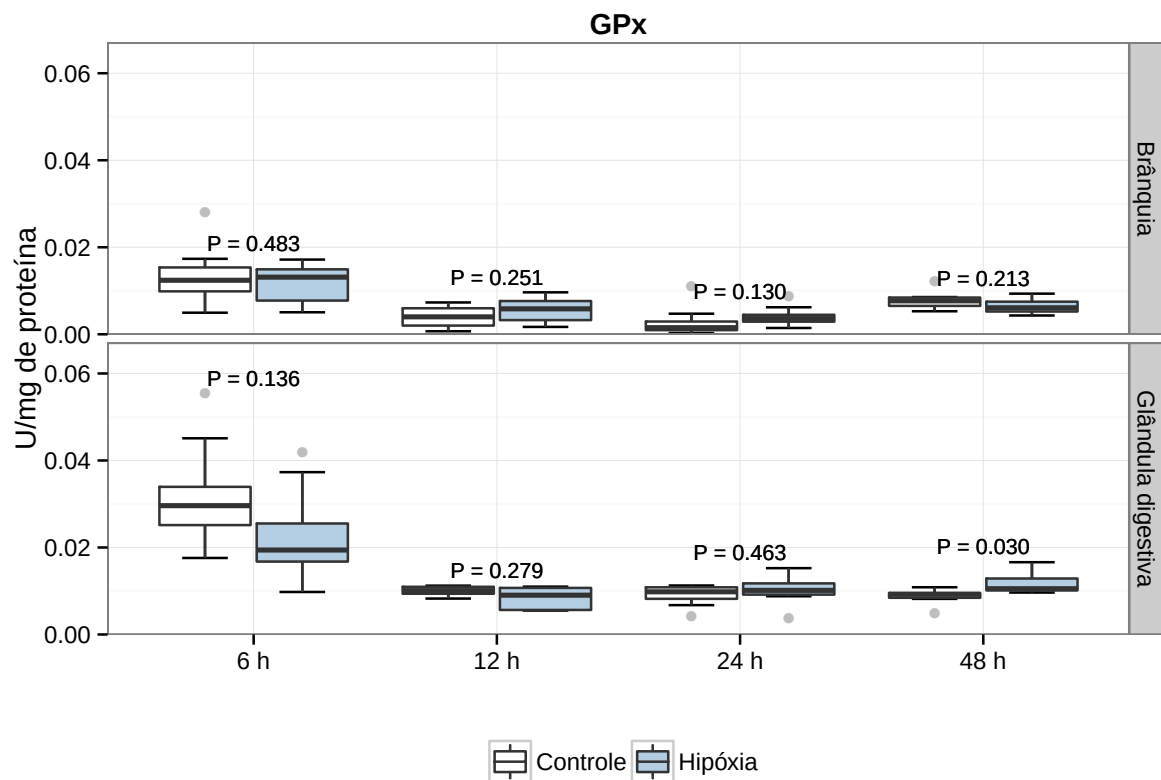


Figura 19: Box plot mostrando a atividade de GPx em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* após um período de hipóxia.

4.2.5 Glutathiona redutase

A atividade da GR nas brânquias não foi alterada por nenhum período de hipóxia. Contudo, a atividade dessa enzima na glândula digestiva diminuiu em relação ao controle no grupo de mexilhões que permaneceram por 12 h em hipóxia. Já no grupo que passou 48 h de privação de oxigênio, atividade dessa enzima foi maior em relação a seu respectivo controle (Figura 20).

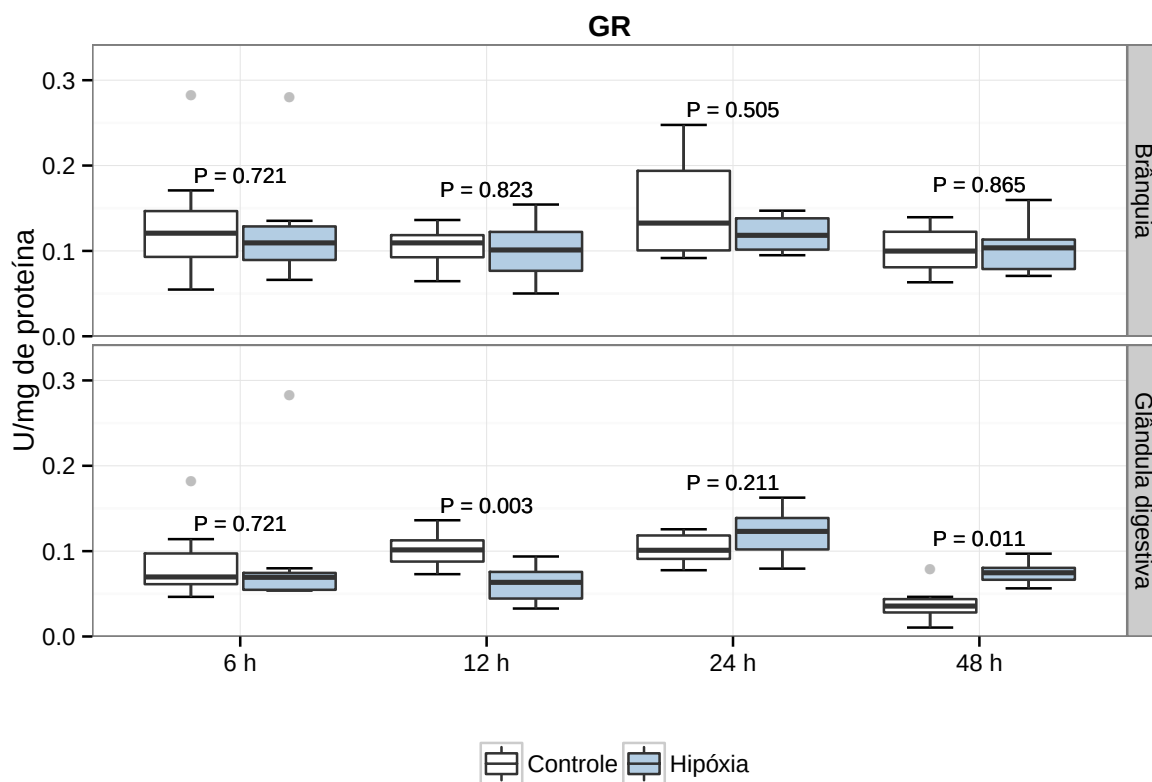


Figura 20: Box plot mostrando a atividade de GR em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* após um período de hipóxia.

4.2.6 Glutathiona

A hipóxia promoveu o aumento da concentração de GSH na maioria dos grupos experimentais, com exceção nas brânquias dos mexilhões expostos ao ar por 12 h e na glândula digestiva daqueles em hipóxia por 24 h cujo conteúdo de GSH não sofreu nenhuma alteração (Figura 21).

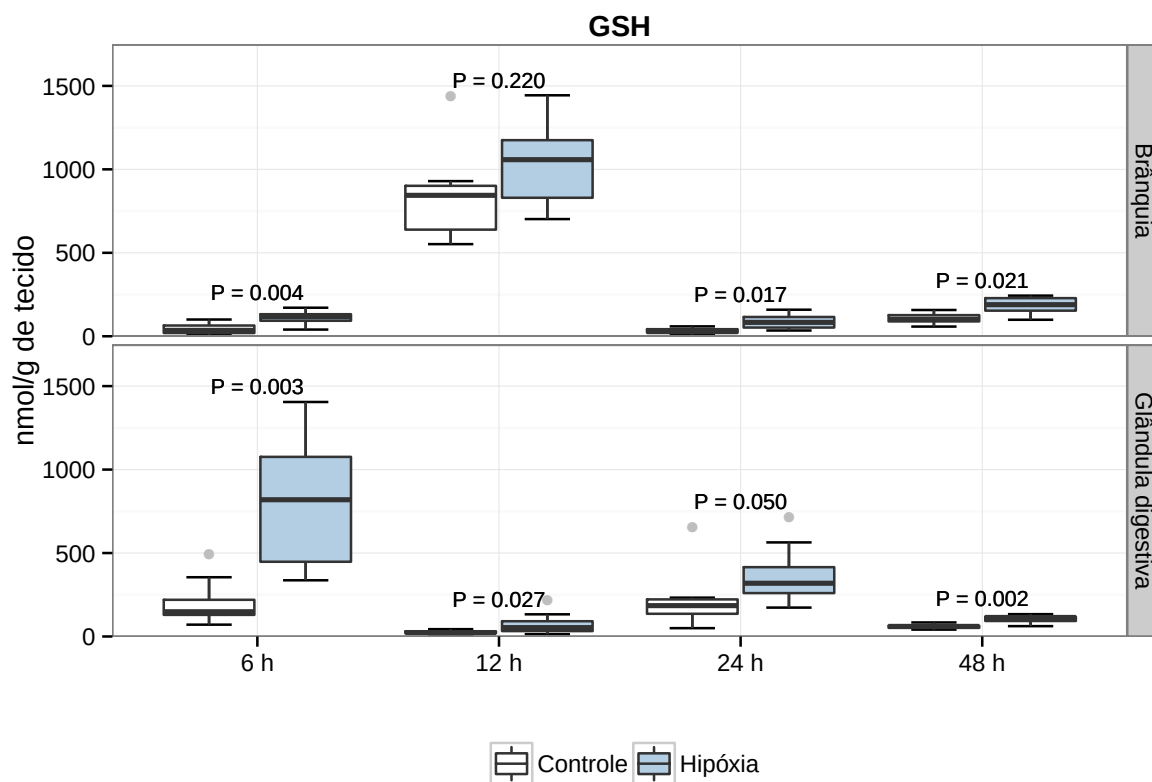


Figura 21: Box plot mostrando a concentração de GSH em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* após um período de hipóxia.

4.2.7 Peroxidação lipídica

Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de MDA nas brânquias dos mexilhões para nenhum período de hipóxia quando comparamos com seus respectivos controles. Já a concentração de MDA na glândula digestiva foi reduzida nos mexilhões após 6 h de exposição ao ar (Figura 22).

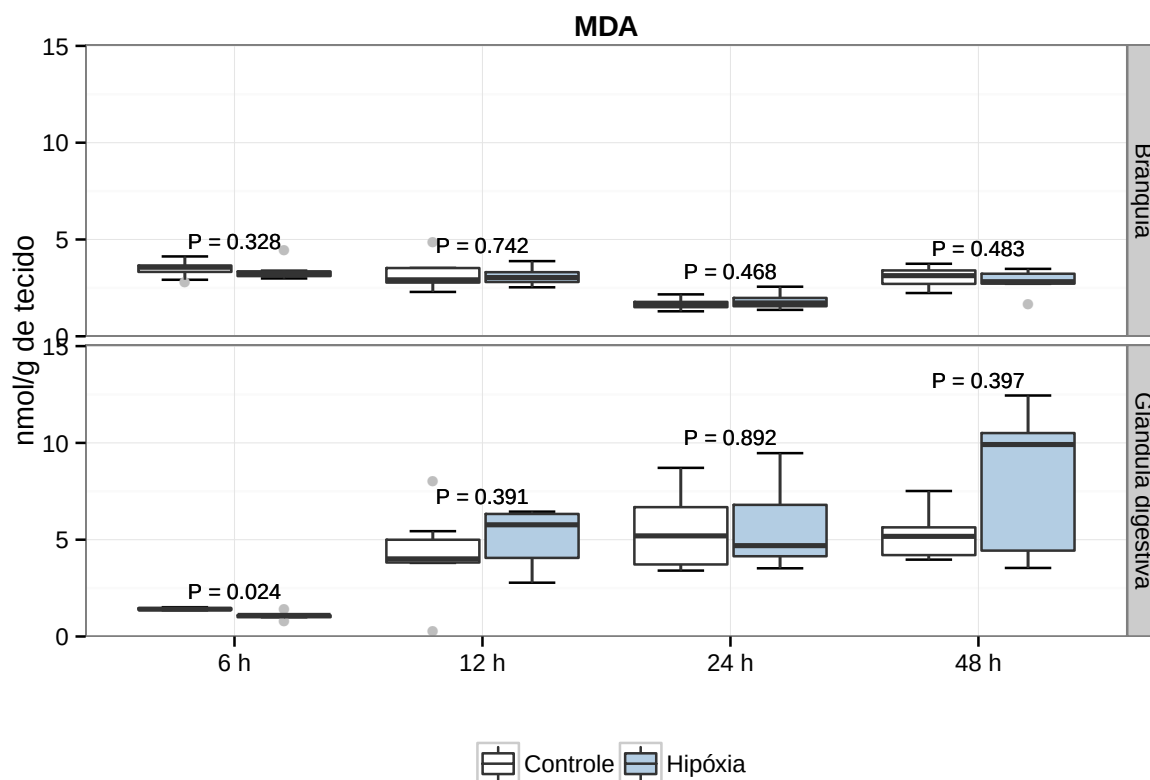


Figura 22: Box plot mostrando a concentração de MDA em brânquia e glândula digestiva de *P. perna* após um período de hipóxia.

4.3 Combinação do efeito da hipóxia com a exposição ao B5

4.3.1 Glutathione S-transferase

A atividade da GST nas brânquias dos mexilhões apresentou alterações neste experimento. Essa alteração se deve ao aumento da atividade da GST dos animais que foram expostos a 0,01 mL/L de biodiesel por 48 h seguido de 24h de hipóxia em relação ao grupo controle e aos grupos em que os animais foram primeiro expostos à hipóxia e depois imersos em água e água contaminada com B5. Além disso, a atividade da GST no grupo "Água+Hipóxia" foi mais elevada que no tratamento "Hipóxia+Água" (Figura 23).

Apesar de não serem diferentes do grupo controle, a atividade foi menor nos moluscos que permaneceram em hipóxia por 24 horas seguido de reimersão em água limpa quando comparada ao grupo que passou pelo mesmo tratamento na sequência inversa ("Água+Hipóxia") (Figura 23).

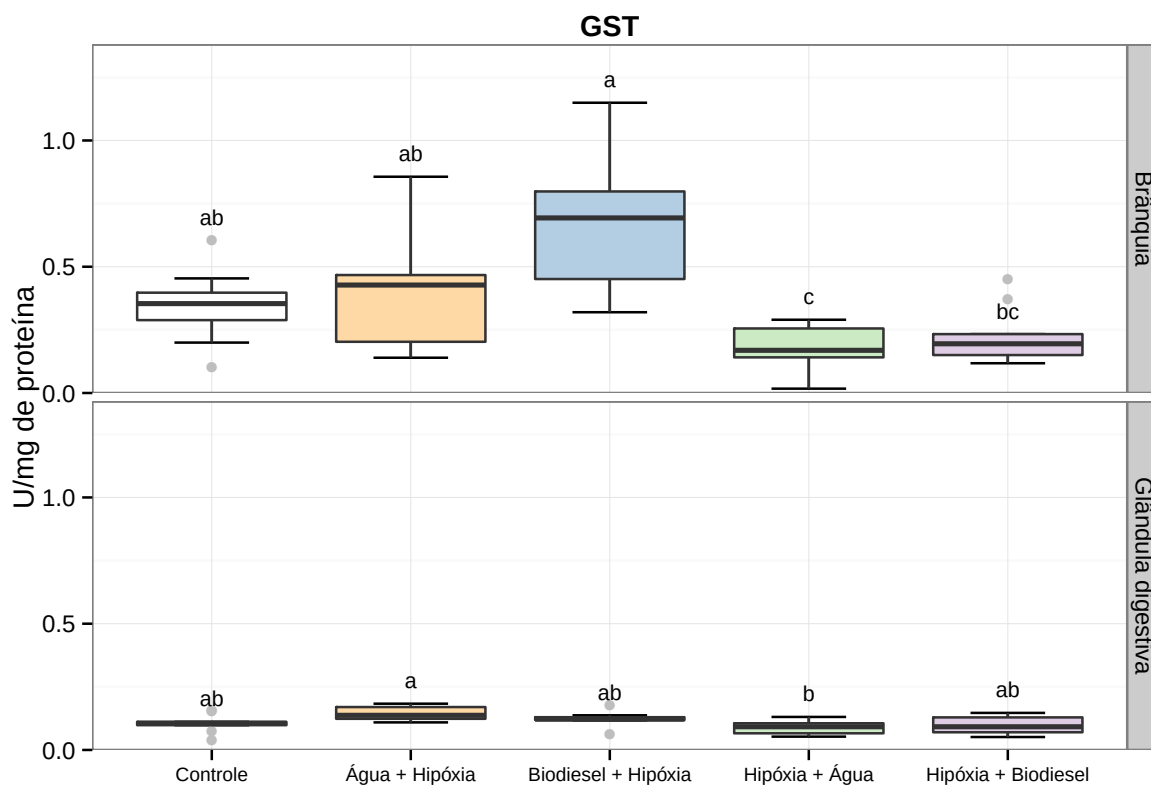


Figura 23: Box plot mostrando a atividade de GST em brânquia e glândula digestiva de *P. perna*. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. Água+hipóxia é o grupo que foi deixado em água limpa por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Biodiesel+hipóxia é o grupo que foi deixado em água com B5 (0,01 mL/L) por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Hipóxia+água é o grupo foi colocado primeiramente em hipóxia por 24 h e depois colocado em água do mar limpa. Hipóxia+Biodiesel é o grupo colocado em 24 h de hipóxia seguida de 48 h de exposição ao biodiesel B5 (0,01 mL/L).

4.3.2 Superóxido dismutase

A atividade da SOD nas brânquias dos mexilhões apresentou alterações neste experimento. Essa alteração se deve a uma menor atividade da enzima nos animais que foram expostos a hipóxia seguida de reimersão em água limpa em relação ao grupo controle e ao restante dos tratamentos (Figura 24). Já na glândula digestiva, não houve diferenças na atividade dessa enzima quando comparamos os tratamentos (Figura 24).

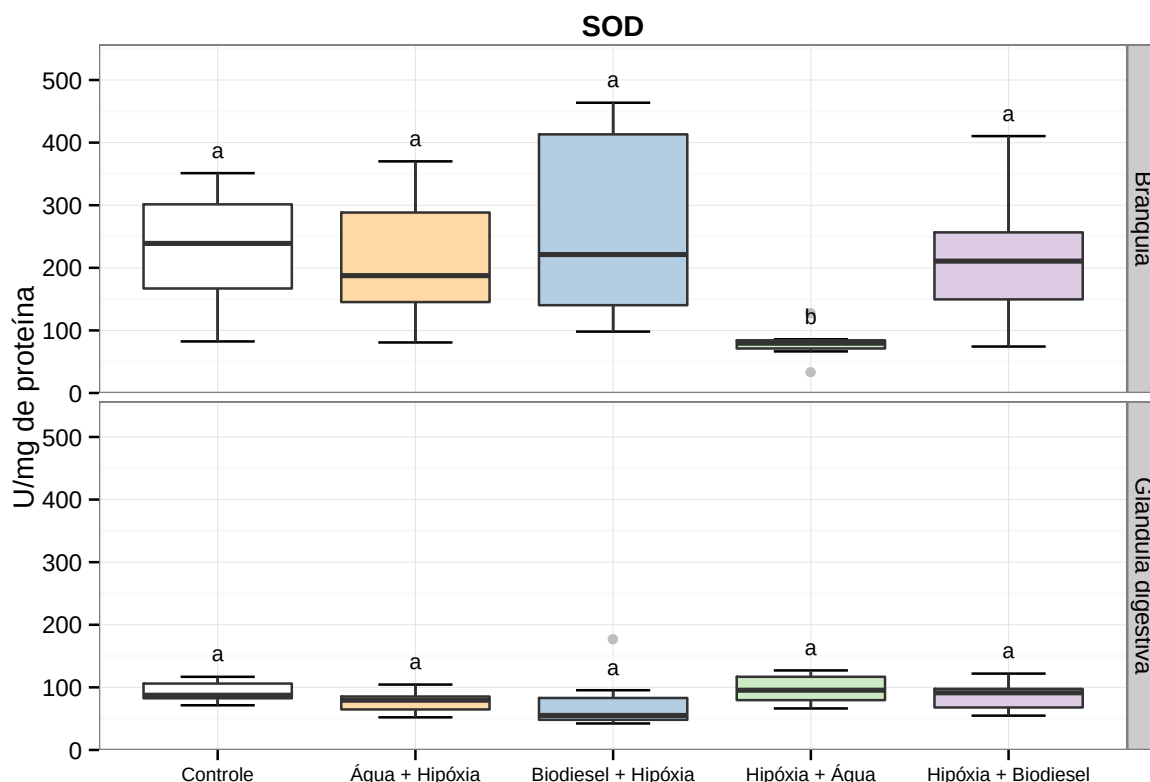


Figura 24: Box plot mostrando a atividade de SOD em brânquia e glândula digestiva de *P. perna*. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. Água+hipóxia é o grupo que foi deixado em água limpa por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Biodiesel+hipóxia é o grupo que foi deixado em água com B5 (0,01 mL/L) por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Hipóxia+água é o grupo foi colocado primeiramente em hipóxia por 24 h e depois colocado em água do mar limpa. Hipóxia+Biodiesel é o grupo colocado em 24 h de hipóxia seguida de 48 h de exposição ao biodiesel B5 (0,01 mL/L).

4.3.3 Catalase

A CAT apresentou diferenças entre os tratamentos nas brânquias dos mexilhões. Neste caso, a atividade da enzima foi maior no grupo que permaneceu em água limpa por 48 h e depois passou para a hipóxia em relação ao demais grupos, com exceção do grupo exposto ao biodiesel seguido por hipóxia. Além disso, no grupo exposto a hipóxia seguida de reoxigenação em água, a atividade da catalase foi inferior ao do controle imerso (Figura 25).

Nas glândulas digestivas dos mexilhões, a catalase apresentou diferenças significativas quando comparados os tratamentos. Os mexilhões que ficaram em hipóxia seguida de imersão em água limpa e em água contaminada com B5 tiveram menor atividade em relação ao controle imerso e aos demais grupos. Esses dois grupos também foram diferentes entre si, visto que a atividade da catalase foi maior no grupo exposto a hipóxia seguida de reimersão em biodiesel

(Figura 25).

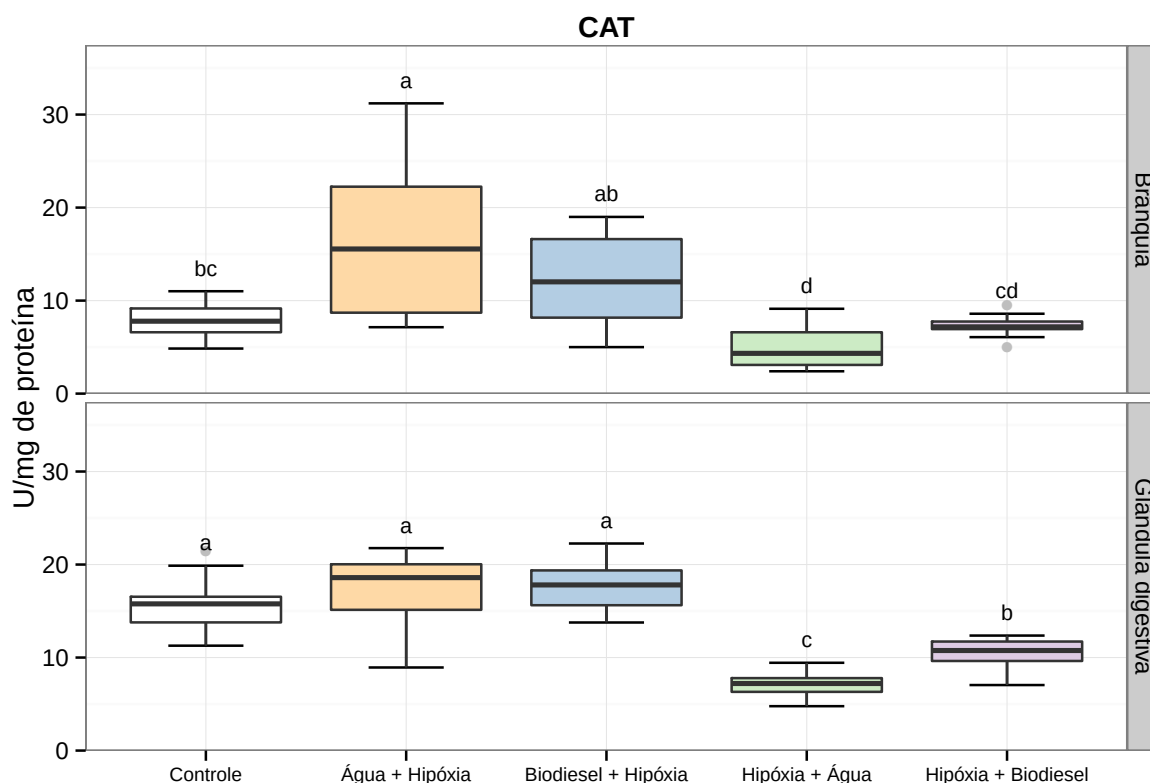


Figura 25: Box plot mostrando a atividade de CAT em brânquia e glândula digestiva de *P. perna*. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. Água+hipóxia é o grupo que foi deixado em água limpa por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Biodiesel+hipóxia é o grupo que foi deixado em água com B5 (0,01 mL/L) por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Hipóxia+água é o grupo foi colocado primeiramente em hipóxia por 24 h e depois colocado em água do mar limpa. Hipóxia+Biodiesel é o grupo colocado em 24 h de hipóxia seguida de 48 h de exposição ao biodiesel B5 (0,01 mL/L).

4.3.4 Glutathiona peroxidase

A GPx apresentou maior atividade nas brânquias dos mexilhões expostos ao biodiesel seguido por exposição ao ar em relação ao controle. Na glândula digestiva dos mexilhões imersos em água limpa e na sequência colocados em hipóxia, a atividade dessa enzima foi diminuída em relação ao controle (Figura 26).

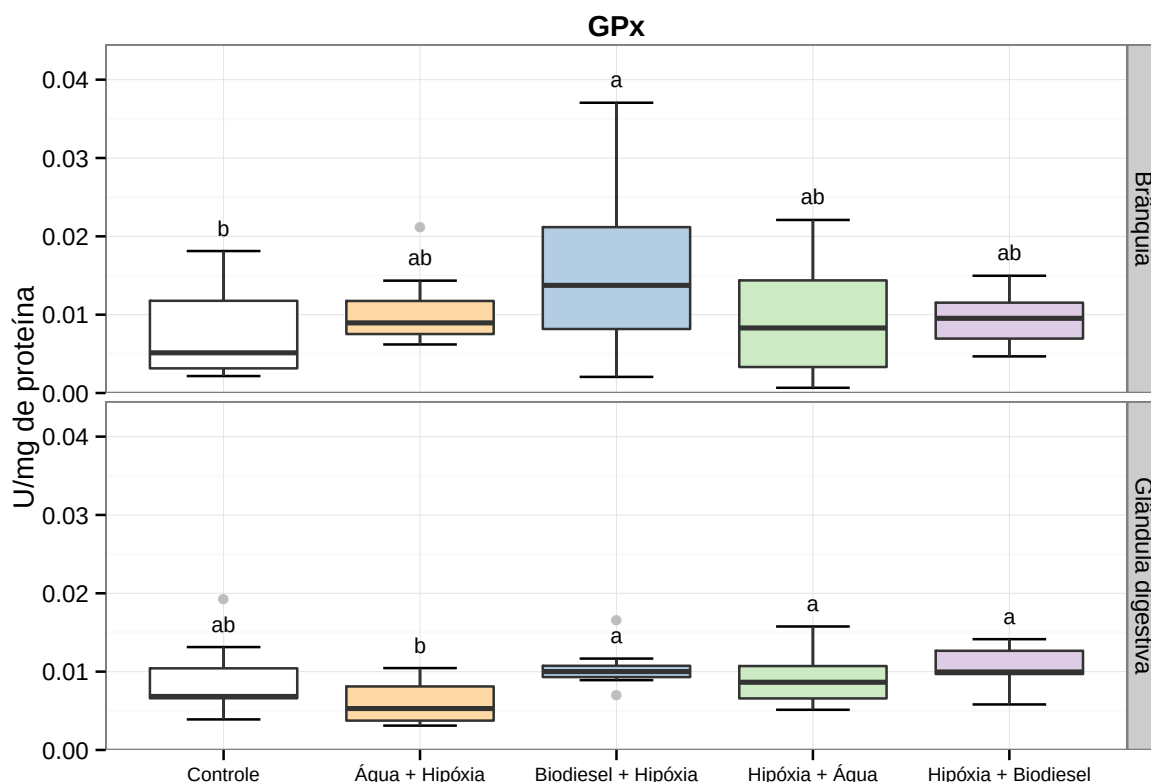


Figura 26: Box plot mostrando a atividade de GPx em brânquia e glândula digestiva de *P. perna*. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. Água+hipóxia é o grupo que foi deixado em água limpa por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Biodiesel+hipóxia é o grupo que foi deixado em água com B5 (0,01 mL/L) por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Hipóxia+água é o grupo foi colocado primeiramente em hipóxia por 24 h e depois colocado em água do mar limpa. Hipóxia+Biodiesel é o grupo colocado em 24 h de hipóxia seguida de 48 h de exposição ao biodiesel B5 (0,01 mL/L).

4.3.5 Glutathiona redutase

A GR apresentou diferenças entre os tratamentos nas brânquias dos mexilhões. Como podemos observar, os grupos que passaram primeiro por hipóxia seguida de reoxigenação em água e em B5 apresentaram uma menor atividade da enzima quando comparado ao controle e aos demais grupos. Entretanto, apesar de na glândula digestiva não ter sido encontrada nenhuma diferença significativa para a atividade da GR quando comparamos o controle com os tratamentos, a atividade dessa enzima foi maior no grupo "Água+Hipóxia" em relação ao mesmo tratamento com a ordem inversa de exposição ("Hipóxia+Água") (Figura 27).

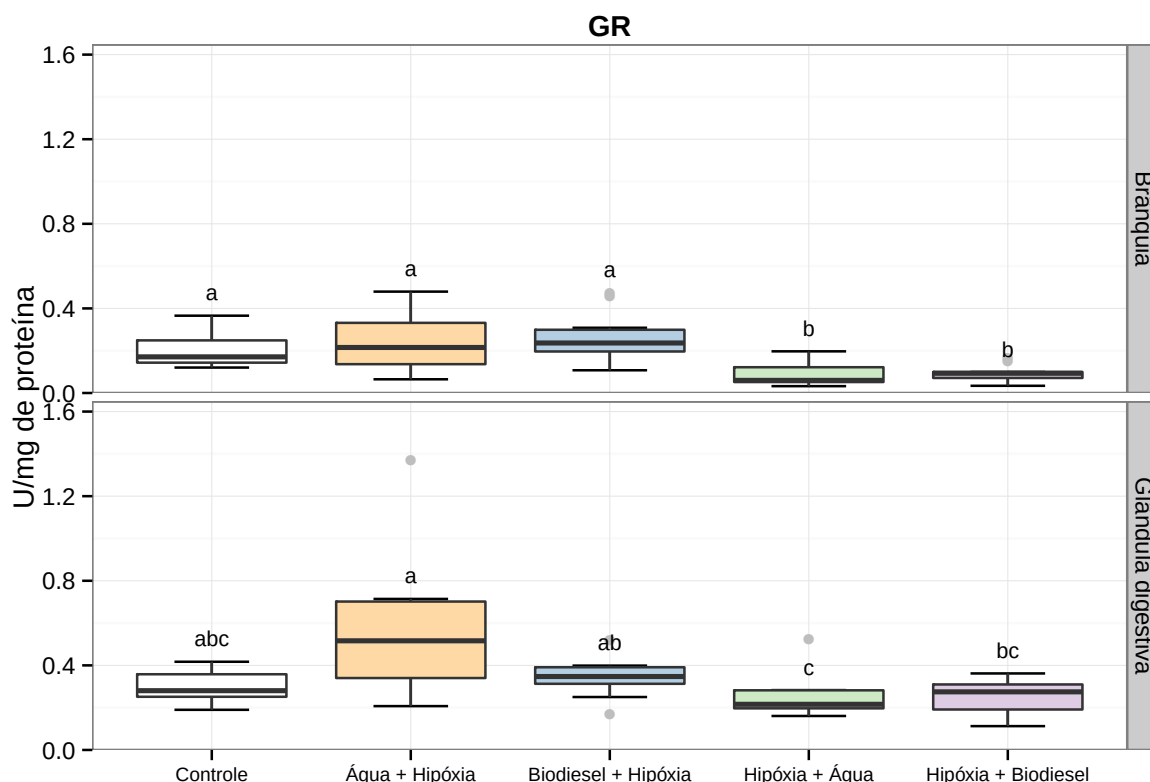


Figura 27: Box plot mostrando a atividade de GR em brânquia e glândula digestiva de *P. perna*. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. Água+hipóxia é o grupo que foi deixado em água limpa por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Biodiesel+hipóxia é o grupo que foi deixado em água com B5 (0,01 mL/L) por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Hipóxia+água é o grupo foi colocado primeiramente em hipóxia por 24 h e depois colocado em água do mar limpa. Hipóxia+Biodiesel é o grupo colocado em 24 h de hipóxia seguida de 48 h de exposição ao biodiesel B5 (0,01 mL/L).

4.3.6 Glutathiona

Nas brânquias, a concentração de GSH foi maior nos mexilhões do tratamento "Hipóxia+Água" quando comparado aos demais grupos, com exceção do grupo "Biodiesel+Hipóxia".

Na glândula digestiva, a GSH ficou menor no tratamento de exposição à hipóxia seguido por reimersão em B5 em relação ao controle imerso e ao grupo "Hipóxia+Água". A GSH também ficou reduzida no grupo previamente imerso em água seguido de exposição ao ar em relação ao controle imerso e ao grupo "Biodiesel+Hipóxia". (Figura 28).

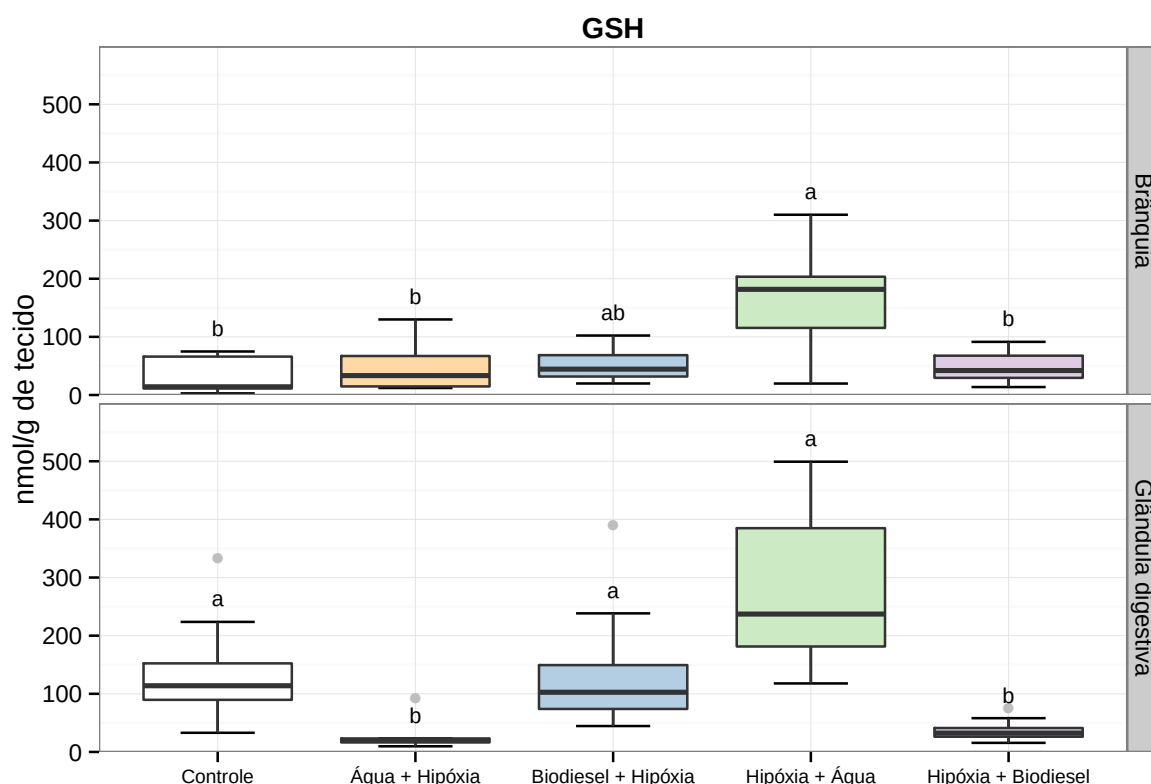


Figura 28: Box plot mostrando a concentração da GSH em brânquia e glândula digestiva de *P. perna*. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. Água+hipóxia é o grupo que foi deixado em água limpa por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Biodiesel+hipóxia é o grupo que foi deixado em água com B5 (0,01 mL/L) por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Hipóxia+água é o grupo que foi colocado primeiramente em hipóxia por 24 h e depois colocado em água do mar limpa. Hipóxia+Biodiesel é o grupo colocado em 24 h de hipóxia seguida de 48 h de exposição ao biodiesel B5 (0,01 mL/L).

4.3.7 Peroxidação lipídica

Peroxidação lipídica na brânquia e na glândula digestiva foi evidenciada pelo aumento significativo da concentração de MDA apresentou diferença significativa entre os grupos. Essa diferença se deve ao aumento da peroxidação lipídica nos grupos expostos à hipóxia seguida por reimersão em água e em água contaminada com B5 em relação ao controle. Além disso, estes grupos foram diferentes entre si, pois os níveis de MDA foram maiores nos mexilhões em hipóxia seguida de reimersão em água que naqueles que foram reimersos em água com 0,01 mL/L de biodiesel (Figura 29).

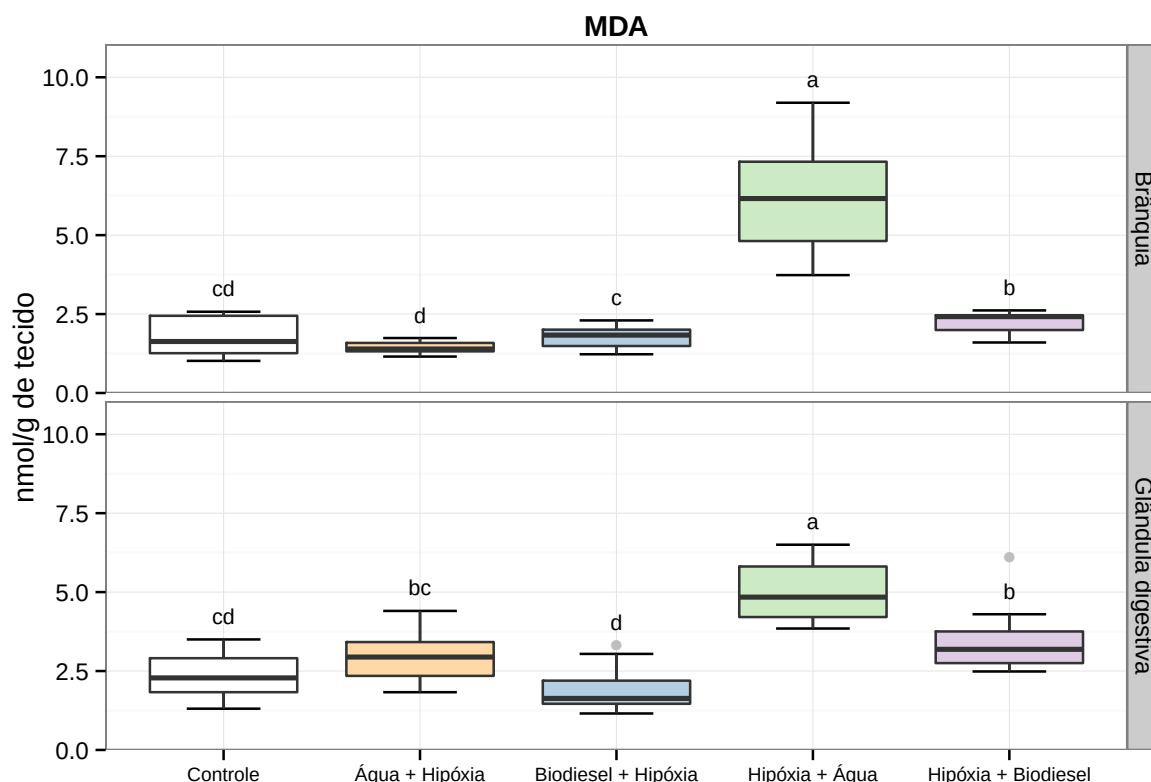


Figura 29: Box plot mostrando a concentração de MDA de *P. perna*. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. Água+hipóxia é o grupo que foi deixado em água limpa por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Biodiesel+hipóxia é o grupo que foi deixado em água com B5 (0,01 mL/L) por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Hipóxia+água é o grupo foi colocado primeiramente em hipóxia por 24 h e depois colocado em água do mar limpa. Hipóxia+Biodiesel é o grupo colocado em 24 h de hipóxia seguida de 48 h de exposição ao biodiesel B5 (0,01 mL/L).

4.3.8 Ensaio do tempo retenção do vermelho neutro

Neste teste houve diferenças significantes no tempo de retenção do corante entre os grupos, de acordo com a análise de variância. Podemos observar que o tempo de retenção dos grupos expostos à água limpa e à água contaminada por B5 seguidas por um período de hipóxia de 24 h e o grupo exposto à hipóxia de 24 h seguida por reoxigenação na água com biodiesel foi menor que o tempo de retenção do grupo controle. Além disso, o tempo de retenção também foi maior no grupo que passou por 24 h de hipóxia seguida de reoxigenação na água quando comparamos com o grupo com a ordem inversa de tratamento (Figura 30).

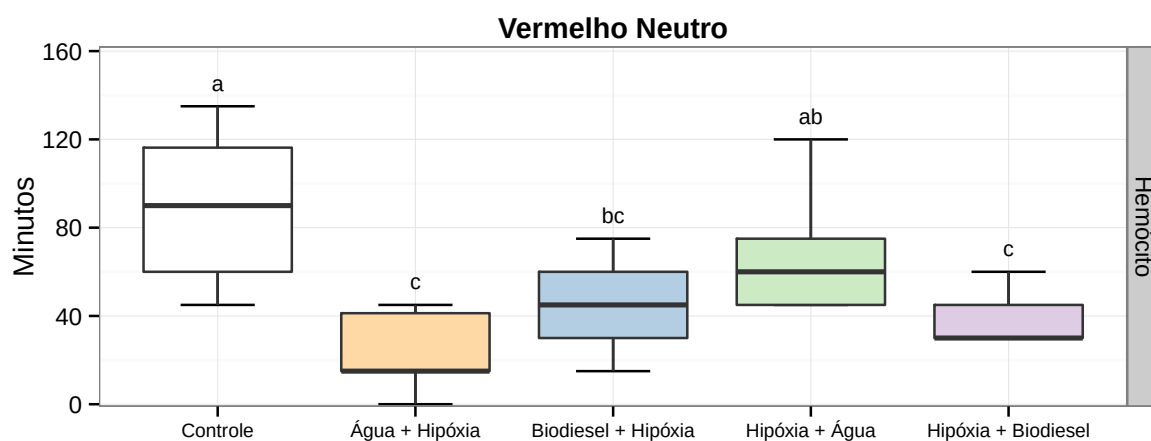


Figura 30: Gráfico do tempo de retenção do corante vermelho neutro em hemócitos de *P. perna*. Letras iguais: sem diferença estatística significativa. Letras diferentes: diferença estatística significativa entre os grupos. Água+hipóxia é o grupo que foi deixado em água limpa por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Biodiesel+hipóxia é o grupo que foi deixado em água com B5 (0,01 mL/L) por 48 horas seguido de 24 h de hipóxia. Hipóxia+água é o grupo foi colocado primeiramente em hipóxia por 24 h e depois colocado em água do mar limpa. Hipóxia+Biodiesel é o grupo colocado em 24 h de hipóxia seguida de 48 h de exposição ao biodiesel B5 (0,01 mL/L).

5 *Discussão*

5.1 **Exposição ao biodiesel B5**

Espécies reativas de oxigênio são continuamente produzidas nos sistemas biológicos como produtos do metabolismo celular (ALMEIDA *et al.*, 2003) e a biotransformação de compostos químicos pode gerar uma quantidade excessiva destes compostos, levando o organismo a uma situação de estresse oxidativo (LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998).

A GSH está entre as mais eficientes defesas celulares que participam na destoxificação de compostos químicos, pois por ser um composto nucleofílico e redutor, pode reagir com espécies eletrofílicas e oxidantes antes que se liguem a ácidos nucleicos e proteínas levando a danos irreversíveis (POMPELLA *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a concentração da GSH foi maior nas brânquias dos animais após dois dias de exposição a 0,1 mL/L de B5 e na glândula digestiva após 6h e 12h de exposição a 0,1 mL/L de B5 e em 168 h de exposição ao B5 0,01 mL/L quando comparados com os respectivos controles. Esses resultados indicam que a exposição ao B5 induziu a síntese de GSH,

Sabe-se que a concentração da forma reduzida da glutathiona pode ser mantida devido ao aumento da atividade da GR ou da síntese de GSH (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A síntese da GSH se dá pela ação de duas enzimas, a γ -glutamylcisteína-sintetase e a glutathiona sintetase durante o ciclo do gama-glutamyl (MEISTER; ANDERSON, 1983). Esse aumento da concentração na GSH na glândula digestiva dos animais tratados por 6 h e 168 h e nas brânquias daqueles do tratamento de 48 h deve ter se dado mais pelo aumento na síntese desse tripeptídeo do que pela redução da forma dissulfeto realizada pela GR, visto que no grupo onde houve o aumento da GSH não há o aumento da atividade dessa enzima. Simonato, Fernandes e Martinez (2011) também chegaram a essa mesma hipótese quando observaram uma diminuição da atividade da GR e um aumento do conteúdo de GSH nas brânquias do peixe *Prochilodus lineatus* expostos a fração solúvel da gasolina. Elevados níveis de GSH não é um sinal para que a atividade de GR aumente, mas sim o aumento da glutathiona dissulfeto (LÓPEZ-BAREA; LEE, 1979; PINTO; MATA; LÓPEZ-BAREA, 1984), o que não foi testado

neste trabalho e assim, não temos como afirmar se a atividade da GR não aumentou devido a baixa concentração de GSSG ou ainda se o biodiesel exerce algum efeito na via de síntese ou na atividade da GR. Já no caso do aumento dos níveis de GSH na glândula digestiva dos mexilhões expostos por 12 h, a GR deve ter contribuído para manter o status da GSH elevado, visto que neste grupo essa enzima estava elevada. Isso também pode nos sugerir que pode ter havido um aumento na concentração de GSSG para estimular o aumento da atividade da GR e que este aumento também pode indicar que a biotransformação do biodiesel de alguma forma está gerando espécies reativas de oxigênio.

Além disso, a atividade da GR nas brânquias dos mexilhões expostos por 12 h e nas glândulas digestivas dos mexilhões expostos por 168 h a ambas as concentrações do B5 diminuiu em relação ao controle, porém a diminuição na atividade da GR nesses grupos também não afetou o funcionamento da GPx e da GST e nem a concentração de GSH. Esse resultado reforça mais a hipótese dos níveis de GSH serem mantidos pela síntese desse peptídeo e não pela conversão da forma dissulfeto em reduzida realizada pela ação da GR.

Por outro lado, podemos observar um decréscimo na concentração da GSH na glândula digestiva após 12h de exposição a menor concentração de biodiesel. Nesse grupo, apesar de não haver um aumento da atividade das enzimas dependentes da GSH, como a GST e GPx, que faria com que os níveis de GSH fosse reduzidos, também não há um aumento na atividade da GR para manter os níveis da glutathione. Nesse caso, pode estar havendo um consumo de GSH, mas que ainda não foi suficiente para ativar mecanismos de reciclagem ou de produção de novas moléculas de GSH. Altos níveis de estresse oxidativo podem diminuir a capacidade ciclo-redox da célula levando a um acúmulo de GSSG, que pode ser bombeado ativamente para fora da célula ou então reagir com grupos sulfidrílicos proteicos e formar dissulfeto (LU, 1999). Porém, não encontramos aumento na peroxidação e as ERO eventualmente formadas, podem ter sido neutralizadas. A GSH também pode se ligar espontaneamente a produtos eletrofílicos e irreversivelmente é consumida neste caso (LU, 2009), diminuindo assim sua concentração celular. Um fato ajuda a reforçar essa hipótese é o não aumento da atividade da GR, que é diretamente modulada pelas concentrações de GSSG (LÓPEZ-BAREA; LEE, 1979; PINTO; MATA; LÓPEZ-BAREA, 1984), como já citado. Se a GR não aumenta, pode ser que não haja altas concentrações de GSSG na célula para aumentar a atividade da enzima. Sendo assim, é possível que a GSH pode ter conjugado com compostos eletrofílicos e por isso não há GSSG sendo formada de maneira suficiente para a GR aumentar sua atividade e ajudar a manter a concentração de glutathione nos níveis basais. Mas como já observado, como as concentrações de GSSG não foram avaliadas, mais testes são necessários para se avaliar essa hipótese.

A indução da glutathione S-transferase é parte de um mecanismo de resposta adaptativa a

estressores químicos (GADAGBUI; JAMES, 2000), envolvendo a destoxificação de intermediários reativos e de radicais oxigênio (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Alguns estudos observaram que essa enzima apresenta aumento da atividade nas brânquias de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* após exposição por sete dias ao benzo[a]pireno (10 µg/L) (MARIA; BEBIANNO, 2011) ou quando coletados de áreas contaminadas com derivados de petróleo (LIMA *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, após 48 horas de exposição à menor concentração de biodiesel B5, houve uma redução na atividade da GST nas brânquias dos mexilhões quando comparada com a atividade da enzima do respectivo grupo controle. Sabe-se que a atividade da GST é dependente dos níveis de GSH para catalisar a reação de conjugação desse tripeptídeo. A GSH, por sua vez, tem seus níveis mantidos pela síntese promovida pelas enzimas do ciclo gama-glutamil ou pela ação da GR, como já discutido anteriormente. Dessa forma, como nesse grupo, a concentração de GSH e a atividade da GR permaneceram em níveis basais, essa diminuição da atividade da GST pode estar relacionada a presença de compostos tóxicos presentes no biodiesel B5 que fazem contato direto com as brânquias e, que em altas concentrações, podem inibir de alguma forma a atividade da enzima. De acordo com Cheung *et al.* (2001), intermediários tóxicos produzidos durante o metabolismo de destoxificação podem inativar a enzima, resultando em atividade reduzida da GST. No entanto, ainda são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese.

Nas glândulas digestivas dos mexilhões expostos ao B5 não houve alteração da atividade da GST. O mesmo resultado também foi encontrado nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* por Lima *et al.* (2007) e Maria e Bebianno (2011). Em *Perna viridis*, a atividade dessa enzima na glândula digestiva não mostrou um aumento relacionado à presença de HPA nos sítios onde os animais foram transplantados por 30 dias (CHEUNG *et al.*, 2001). Uma possível causa para nossos resultados é que as concentrações de biodiesel testadas nesse experimento não foram efetivas para aumentar a atividade da enzima, sendo que seus níveis basais na glândula digestiva já são suficientes para biotransformar esse contaminante.

As principais defesas antioxidantes enzimáticas são superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, que promovem a inativação do ânion superóxido e peróxidos, respectivamente (HALLIWELL; CROSS, 1994). Todas essas enzimas antioxidantes não apresentaram diferenças significativas nas brânquias dos mexilhões expostos a ambas concentrações de B5, em nenhum período de exposição, quando comparados aos respectivos controles. Tais resultados podem nos indicar que talvez as concentrações de B5 testadas por 6 h, 12 h, 48 h e 168 h não sejam suficientes para promoverem alterações nas respostas bioquímicas nas brânquias dessa espécie de mexilhão. Contudo, talvez como um mecanismo adaptativo que o mexilhão *P. perna* possui para enfrentar períodos cíclicos de hipóxia seguida de reoxigenação, a ativi-

dade das enzimas antioxidantes são bem mais elevadas constantemente quando comparamos com espécies que não passam com frequência por esses períodos de escassez de oxigênio. Por exemplo, em brânquias de peixes da espécie *O. niloticus* não expostos a nenhum contaminante, a atividade média aproximada da SOD e CAT é respectivamente 6,5 U/mg de proteína e 6,4 U/mg de proteína (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Já nos mexilhões dos grupos controles deste estudo, a atividade da SOD e da CAT nas brânquias foi de 39,7 U/mg de proteína e 8,4 U/mg de proteína. Podemos observar que a atividade basal dessas enzimas é maior nos mexilhões, sendo que a SOD chega a ser em torno de seis vezes maior nesses moluscos. Almeida *et al.* (2005) também observou valores basais ainda mais elevados em brânquias de *P. perna* para as mesmas enzimas.

Nas glândulas digestivas, com exceção da redução da atividade da GPx após 6 h de exposição ao B5 0,1 mL/L e após 48 h de exposição ao B5 0,01 mL/L e da SOD no tratamento de 12 h de exposição ao B5 0,01 mL/L, a atividade das enzimas antioxidantes neste tecido também não apresentaram alterações devido aos tratamentos nos períodos testados. A SOD neste mesmo tecido, apesar de apresentar uma diferença na atividade entre os animais tratados com biodiesel de menor e maior concentração por 48 horas, nenhum dos grupos tratados foi diferente do controle, ou seja, não teve sua atividade induzida ou reduzida. Da mesma forma que nas brânquias, a atividade basal da SOD e da catalase foi bem elevada, como também observado por Almeida *et al.* (2005).

Sendo assim, uma hipótese para a ausência de diferenças significativas na atividade das enzimas entre os mexilhões dos grupos controles e dos grupos expostos ao biodiesel B5 seria que a elevada atividade basal delas, em especial a SOD, observadas nesses animais seria suficiente para combater as ERO que porventura estejam sendo formadas, evitando danos oxidativos. Com algumas exceções, podemos observar que não houve peroxidação lipídica nas brânquias e glândulas digestivas. Além disso, o nível de MDA nas brânquias dos mexilhões expostos por 48 horas a ambas as concentrações de biodiesel foi menor em relação ao respectivo controle. Tal redução nos níveis do MDA das brânquias é um indicativo que possivelmente processos oxidativos foram iniciados devido à exposição ao biodiesel B5 e que algum sistema antioxidante deve ter interferido para terminar tal processo a ponto de reduzir a peroxidação a níveis menores do que os basais. Pode ser que outras vias antioxidantes não testadas neste trabalho, como tiorredoxinas peroxidases e antioxidantes de membrana como carotenoides, alfa-tocoferol, podem ter atuado para prevenir danos.

5.2 Experimento de hipóxia

Hipóxia, mesmo que por breves períodos, pode ser prejudicial ou fatal para os seres humanos e para a maioria dos mamíferos e aves. No entanto, muitas espécies de invertebrados, peixes, anfíbios e répteis, bem como alguns mamíferos que mergulham estão adaptadas para suportar a exposição à hipóxia ou anoxia por períodos de horas a meses (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002). Uma das adaptações para lidar com esse período de hipóxia, é o aumento no status antioxidante desses organismos para que possam combater as ERO formadas pela subsequente reintrodução de oxigênio.

Em nossos resultados relativos às brânquias dos mexilhões, podemos observar que houve uma redução na atividade da SOD após 24 h e 48 h de hipóxia. Tal redução na atividade da SOD pode ter sido responsável por diminuir a atividade da catalase nas brânquias dos animais em 24 h de hipóxia, visto que menos peróxido de hidrogênio estava sendo formado. Já foi demonstrado que a CAT pode ser inibida por radical superóxido (KONO; FRIDOVICH, 1982), e que a SOD é inibida pelo excesso de peróxido de hidrogênio (MAO *et al.*, 1993). Assim, uma outra hipótese para explicar a diminuição dessas duas enzimas neste experimento seja que, inicialmente, houve um rápido aumento da SOD logo nas primeiras horas de hipóxia com consequente formação de excesso de peróxido, causando diminuição da SOD. Nesse caso, é possível que o radical superóxido deixe de ser combatido e passe a inibir a catalase.

Além disso, a catalase e a GST na glândula digestiva não sofreram mudanças e houve uma redução na atividade da SOD após 12 h de hipóxia. Esses resultados diferem do trabalho de Gorokhovaa *et al.* (2012), que observaram o aumento na atividade da SOD e da catalase após submeter anfípodes da espécie *Monoporeia affinis* a quatro dias de hipóxia. Contudo, já foi observado a ausência de alterações na atividade da GST, SOD, catalase e GPx das brânquias de mexilhões *Perna perna* expostos por 18 h à hipóxia (ALMEIDA *et al.*, 2005). A GR também diminuiu a atividade passadas 12 h de hipóxia, porém, após 48 h de hipóxia a atividade dessa enzima aumentou juntamente com a GPx. Possivelmente, o aumento na atividade dessas enzimas deve estar relacionado, visto que a GR converte a GSSG em GSH às custas de NADPH (POMPELLA *et al.*, 2003) para que a GPx possa degradar os hidroperóxidos que eventualmente foram formados durante esse período.

Vários invertebrados marinhos que respiram por brânquias são adaptados para suportar longos períodos de anoxia. Muitas espécies intertidais, como o gastrópode *Littorina littorea*, tem que lidar com a privação de O₂ de uma a duas vezes por dia, quando a maré recua e os deixa expostos ao ar (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002). Pannunzio e Storey (1998) estudaram a possibilidade de adaptação ao estresse oxidativo depois de períodos de anoxia nessa

espécie de gastrópode. Eles observaram que um período de seis dias de anoxia suprimiu a atividade de enzimas como a catalase, SOD, GPx, GR e GST no hepatopâncreas desse animal. A supressão de enzimas antioxidantes em *L. littorea* durante a anoxia pode ter sido causada pelo longo período de privação de oxigênio. Porém, durante a anoxia, os níveis de hidroperóxidos lipídicos permaneceram baixos e também não diferiram do grupo controle após um período de recuperação em normóxia. Nestes animais houve um aumento da glutathiona (GSH), que pode estar protegendo o organismo contra as ERO. Da mesma forma como ocorreu com essa espécie de gastrópode, o longo período de hipóxia pode ter suprimido a atividade da SOD. Já nas brânquias, a GST, a GPx e a GR permaneceram inalteradas, o que pode nos indicar mais uma vez que esses animais possuem níveis basais constantemente elevados dessas enzimas antioxidantes para que não ocorra nenhum dano aos tecidos quando a disponibilidade de oxigênio voltar para a normóxia.

Em nosso trabalho também houve um aumento na concentração de GSH em ambos os tecidos analisados, exceto nas brânquias dos animais expostos ao ar por 12 h e na glândula daqueles em hipóxia por 24 h. Assim como proposto por Pannunzio e Storey (1998), esta pode ser uma resposta protetora que pode diminuir danos oxidativos que eventualmente possam acontecer durante a reperfusão do oxigênio nas células, ou ainda estar envolvido com a detoxificação de produtos pró-oxidantes que podem ser acumulados durante esse período de hipóxia. Mais uma vez também, é possível que esse aumento da GSH tenha se dado mais pela ativação das enzimas do ciclo gama-glutamil que sintetizam esse peptídeo do que pela função de "reciclagem" exercida pela GR, visto que essa enzima só aumentou sua atividade nos animais expostos por 48 h ao ar.

Após os períodos de 6 h, 12 h, 24 h e 48 h de hipóxia, os mexilhões de nosso experimento também não apresentaram aumento na peroxidação lipídica tanto nas brânquias bem como nas glândulas digestivas, sendo que após 6 h os níveis de MDA na glândula foram ainda menores que no controle. Como a produção de espécies reativas de oxigênio pode ser menor durante esse período, é esperado que o nível de peroxidação lipídica não seja aumentado. Além disso, o aumento da concentração de GSH pode ter exercido um efeito protetor evitando danos oxidativos que por ventura possam ocorrer. Ainda, em relação as glândulas digestivas do grupo que permaneceu em hipóxia por 48 h, o aumento da atividade da GPx deve ter contribuído para prevenir a peroxidação lipídica, visto que, sobra menos peróxido para que ocorra reação de Fenton e sejam liberados radicais hidroxil que se ligam às biomembranas, promovendo esse tipo de lesão.

5.3 Combinação do efeito da hipóxia com a exposição ao B5

Os organismos adaptados a períodos cíclicos de privação de oxigênio apresentam meios para se recuperar com sucesso quando o oxigênio é reintroduzido, como mecanismos para reduzir o estresse oxidativo durante a transição entre hipóxia e normóxia (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002; GOROKHOVAA *et al.*, 2012). Entretanto, a combinação de exposição a contaminantes e hipóxia podem dificultar as respostas antioxidantes durante a exposição ao ar, resultando em danos oxidativos como foi observado em anfípodes por Gorokhovaa *et al.* (2012).

Experimentos que avaliaram parâmetros relacionados com estresse oxidativo em organismos sujeitos a esses ciclos na disponibilidade de oxigênio mostraram que, durante a hipóxia, há um aumento de defesas oxidantes como aumento dos níveis de GSH em *L. littorea* (PANNUNZIO; STOREY, 1998) e da SOD e catalase em *Monoporeia affinis* (GOROKHOVAA *et al.*, 2012). Entretanto, quando em normóxia, os níveis desses antioxidantes diminuem retornando para níveis basais.

Nas brânquias dos mexilhões deste experimento, podemos observar que a atividade das enzimas GST, SOD, catalase e GR foi mais elevada no grupo "Água+Hipóxia" em relação ao grupo "Hipóxia+Água". O mesmo ocorreu para as enzimas GST, GR e catalase na glândula digestiva. Isto nos mostra que a hipóxia foi responsável por induzir um aumento nas defesas antioxidantes, porém o grupo que passou pelo tratamento água seguida de hipóxia manteve os mesmos níveis de atividade que o controle imerso, com exceção da catalase nas brânquias. Além disso, no grupo exposto primeiro à hipóxia e depois à água limpa para reoxigenação, as enzimas GST, GR, CAT e SOD nas brânquias e a CAT na glândula ficaram reduzidas em relação ao controle. Tal resultado é diferente dos trabalhos citados anteriormente (PANNUNZIO; STOREY, 1998; GOROKHOVAA *et al.*, 2012) em que os níveis enzimáticos dos animais que passaram por hipóxia são maiores que o controle e quando eles são novamente reoxigenados, os níveis enzimáticos retornam ao estado basal. No caso dos mexilhões *P. perna* de nosso estudo, a ausência do aumento da atividade enzimática durante a hipóxia reforça a ideia de que esses animais mantêm os níveis antioxidantes elevados. O que pode ter acontecido no caso da diminuição da atividade das enzimas após o período de 48 h de recuperação em água, é que o longo período na ausência de ciclos de hipóxia faz com que a atividade antioxidante desses animais seja diminuída.

Contudo, a GSH aparentemente exibiu um comportamento oposto. Nos mexilhões do grupo "Água+Hipóxia" a GSH permaneceu como no controle imerso nas brânquias e diminuiu na glândula digestiva, mas aumentou em ambos os tecidos no tratamento de ordem inversa ("Hipó-

xia+Água"). Neste caso, é possível que o grande período de hipóxia tenha afetado alguma via de síntese da GSH. Depois quando os mexilhões passam por um período de recuperação na água, a concentração de GSH aumenta para conseguir neutralizar as ERO que são formadas durante a reoxigenação. No caso do grupo que ficou em hipóxia e seguiu para reoxigenação em água com B5, a concentração da GSH diminuiu na glândula digestiva. Assim, o que pode ter ocorrido é que a biotransformação do B5 pode ter gerado metabólitos reativos e ERO, que devem ter se conjugado com a GSH, reduzindo seus níveis em relação ao grupo que ficou se recuperando na água limpa.

Em relação a GST, nas brânquias a atividade dessa enzima foi maior no grupo "B5+Hipóxia" em relação ao grupo "Hipóxia+B5". Pode-se supor que a hipóxia induziu um aumento na atividade da GST, mas a presença do B5 antes da hipóxia teve um efeito somatório, aumentando ainda mais a atividade dessa enzima.

No caso da SOD nas brânquias, observamos uma diminuição na sua atividade no grupo que ficou em hipóxia e depois voltou para a água em relação a todos os outros tratamentos. Entretanto, no grupo que ficou em hipóxia e depois voltou para a água contaminada por B5, a atividade da SOD ficou no mesmo nível que o grupo controle. É possível que a presença do B5 tenha ativado vias de biotransformação e ter gerado ânion superóxido e induzido a atividade da SOD, impedindo a diminuição em sua atividade SOD como aconteceu no tratamento em que após a hipóxia os mexilhões voltam para a água limpa.

A catalase na glândula digestiva dos mexilhões do tratamento "Hipóxia + B5" ficou diminuída da mesma forma que no grupo "Hipóxia + água" em relação ao grupo controle. A SOD neste tecido também não foi alterada nesse grupo, não promovendo um aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio, que se ocorreu, pode ter se dado por outras vias de formação, como por exemplo, durante a ação de CYP450 (MUNRO; GIRVAN; MCLEAN, 2007). Assim, a diminuição da catalase nesses grupos pode estar relacionada com o período de exposição ao ar seguida pela reoxigenação. Ainda assim, podemos observar que a atividade da catalase no grupo "Hipóxia + B5" foi maior que no grupo "Hipóxia + água", mostrando que o B5 pode ter sido responsável pelo aumento da atividade da enzima. Também, nesses mesmos grupos a concentração de MDA foi elevada em relação ao controle, o que pode estar relacionado com essa diminuição da atividade da catalase.

No teste do vermelho neutro, o tempo de retenção dos grupos expostos à água limpa e à mistura B5 seguidos de hipóxia e do grupo exposto primeiro à hipóxia seguida de exposição ao B5 foram bem menores que o tempo do grupo controle.

Em primeiro lugar, o estado de hipóxia deve exercer algum efeito sobre a estabilidade li-

ossosomal, visto que os mexilhões que estavam em água limpa por 48 h e passaram por 24 h de hipóxia tiveram o menor tempo médio de retenção e foi significativamente menor também que o tempo do grupo que passou primeiramente por hipóxia seguido de reoxigenação em água limpa. Como esse grupo volta para a água depois do período de hipóxia e seu tempo de retenção é igual ao controle, o retorno para água promove uma recuperação no organismo desse animal. Em mexilhões da espécie *Perna viridis*, a taxa de excreção diminuiu com a diminuição da disponibilidade de oxigênio, indicando que o processo de excreção é dependente da presença de oxigênio (WANG *et al.*, 2011). O acúmulo de compostos nitrogenados que não são excretados podem ser prejudiciais para os tecidos, influenciando na estabilidade lisossomal, o que poderia explicar nossos resultados. Neste caso, são necessárias mais pesquisas para elucidar quais os mecanismos relativos ao metabolismo da hipóxia que levam à instabilidade da membrana lisossomal.

Em segundo lugar, a presença do biodiesel na água também deve afetar a estabilidade da membrana do lisossomo, visto que os dois grupos que foram expostos ao biodiesel também apresentaram tempo de retenção do vermelho neutro inferior ao grupo controle. Os hemócitos tem um grande potencial de retirar compostos químicos estranhos ao organismo, como metais e moléculas orgânicas presentes na hemolinfa de moluscos e concentrá-los dentro do compartimento lisossomal (WINSTON *et al.*, 1996). Os lisossomos são capazes de produzir ERO para combater patógenos endocitados, mas a presença de compostos tóxicos pode aumentar essa produção de radicais, promovendo a instabilidade da membrana lisossomal e, conseqüentemente, o extravasamento do interior repleto de enzimas hidrolíticas, causando auto-degeneração celular (WINSTON *et al.*, 1996). Dessa forma, compostos orgânicos presentes no B5, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, podem estar sendo endocitados pelos lisossomos e promovendo um aumento de ERO, os quais podem ter promovido os danos nas membranas dessa organela, diminuindo o tempo de retenção do corante em nossos experimentos.

Almeida *et al.* (2005) demonstrou que após 24 h de hipóxia seguida por um período de recuperação em água limpa, os níveis de MDA voltam ao estado basal igual ao controle. Em nossos achados, podemos observar que os grupos que permaneceram 24 h de hipóxia seguido por 48 h de recuperação em água limpa e em água com B5 apresentaram aumento da concentração de MDA tanto na brânquia quanto na glândula digestiva em relação ao controle imerso. Ainda, quando comparamos esses dois grupos, o nível de peroxidação lipídica foi maior para aquele que fez a reoxigenação em água limpa. Uma hipótese para isso ter acontecido é que o período de 48 h de reoxigenação na água com biodiesel pode ter ativado antioxidantes nos mexilhões devido à presença do contaminante, o que diminuiu a peroxidação lipídica, ao contrário do que ocorreu com o grupo que passou por reoxigenação por água limpa. Outro fator que poderia ter

permitido esse aumento na peroxidação lipídica, como já discutido, seria a redução da atividade da catalase, o que torna o peróxido de hidrogênio disponível para reações de Fenton e, portanto, para a formação de radical hidroxil.

Durante a exposição ao ar, mexilhões da espécie *Perna perna* apresentam um comportamento denominado "gapping", no qual abrem e fecham suas conchas, promovendo um baixo influxo de oxigênio na água presente na cavidade do manto (NICASTRO *et al.*, 2010). Uma outra hipótese em relação ao aumento da peroxidação lipídica nos mexilhões do grupo "Hipóxia + água" seria que a presença periódica de oxigênio durante esses períodos de hipóxia pode estabelecer quadros semelhantes a isquemia em mamíferos seguida de reoxigenação (ALMEIDA *et al.*, 2005).

5.4 Considerações gerais

O B5 é uma mistura de 95% de óleo diesel e 5% de biodiesel puro de origem vegetal ou animal. O óleo diesel presente nesse combustível é uma mistura de hidrocarbonetos olefínicos, parafínicos e aromáticos (VIEIRA *et al.*, 2007). Dentre esses compostos aromáticos do óleo diesel, incluem-se uma grande variedade de HPA (naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno, benz(a)antraceno, criseno) (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Como já foi observado em tilápias do Nilo, a concentração de 0,1 mL/L de B5 pode diminuir a atividade do citocromo P450 1A, já que o óleo diesel presente na mistura quando em alta concentração tem efeito inibitório sobre essa enzima (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Da mesma forma, compostos presentes na mistura B5, mesmo em menores concentrações, podem ser responsáveis pela diminuição da atividade branquial da GR após 12 h e da GST após 48 h e da atividade na glândula digestiva da GPx após 6 h e 48 h e da GR após 168 h como ocorreu no experimento de exposição ao biodiesel. Porém, como o nível basal de enzimas antioxidantes é elevado nesses animais, danos oxidativos não foram observados nos mexilhões expostos ao biodiesel B5. Além disso, a concentração da GSH aumentou nas brânquias após 48 h e na glândula digestiva após 6 h e 12 h, o que pode também ter contribuído para prevenir as lesões.

No caso do terceiro experimento, a redução em relação ao controle imerso na atividade enzimática da GST, GR e CAT nas brânquias dos grupos expostos primeiro à hipóxia deve estar mais relacionada ao fato dos animais terem passado por um período prolongado de hipóxia e depois voltado para a reoxigenação e não à presença do biodiesel, visto que entre os grupos "Hipóxia+Água" e "Hipóxia+B5" não houve diferenças para a atividade dessas enzimas nas brânquias. Estressores ambientais comumente alteram as respostas bioquímicas durante a biotransformação em animais expostos a contaminantes. Um exemplo disso, é o estudo envolvendo salinidade

e exposição de ostras *Crassostrea gigas* ao óleo diesel (ZANETTE *et al.*, 2011). Neste experimento houve aumento na atividade da GST em ostras expostas ao óleo diesel (1 mL/L) na salinidade de 25 ppt, mas houve ausência de indução da GST em resposta ao diesel nas demais salinidades testadas (35, 15 e 9 ppt) e aumento dos níveis de MDA. Kurochkin *et al.* (2009) observaram que em ostras (*Crassostrea virginica*) expostas previamente por 30 dias a cádmio (50 µg/L), que depois passaram por 6 h de exposição ao ar seguida por reoxigenação, houve inibição do metabolismo anaeróbico, diminuição da captação de oxigênio pelas mitocôndrias durante a reoxigenação, aumento de danos oxidativos no DNA, quando comparadas a ostras não expostas a esse metal. Assim, a hipóxia como um estressor ambiental, também pode estar modulando as respostas bioquímicas durante a biotransformação, gerando essa diferença nas respostas encontradas em nosso trabalho. Entretanto, em alguns casos o biodiesel pareceu interferir em alguns parâmetros relacionados com a condição de hipóxia quando observamos, por exemplo, as diferenças nos níveis de GSH e MDA entre os grupos "Água + Hipóxia" e "B5 + Hipóxia" ou ainda quando comparamos a atividade da CAT e da SOD e concentração de GSH e MDA entre os grupos "Hipóxia + Água" e "Hipóxia + B5".

Com relação ao experimento de hipóxia (segundo experimento), o período prolongado de escassez de oxigênio promoveu a diminuição da atividade da SOD, mas mesmo assim, não foram encontrados danos oxidativos. Já no caso do experimento hipóxia e reoxigenação, os grupos que ficaram imersos na água e depois passaram por hipóxia, apresentaram resultados diferentes, em que os níveis de defesas antioxidantes aumentaram (GST) ou permaneceram nos mesmo níveis que o controle (SOD, CAT e GPx). A diminuição na atividade enzimática, de uma maneira geral, se deu nos grupos que ficaram em hipóxia e depois voltaram para a reoxigenação, o que pode ter resultado no aumento da peroxidação lipídica. Assim, temos que considerar que condições onde o meio aquático está contaminado cronicamente, situações em que a hipóxia persista por mais tempo pode vir a resultar em lesões oxidativas nos organismos.

Variações sazonais também podem influenciar as respostas bioquímicas desses animais como foi observado por WILHELM FILHO *et al.* (2001). Esse grupo de pesquisa mostrou que no mês de maio há um aumento das enzimas GST, catalase e SOD e um aumento da peroxidação lipídica. Nesta época, os mexilhões *P. perna* estão no auge da época reprodutiva e toda mudança no metabolismo durante esse período pode ter acarretado em aumento da peroxidação, apesar do aumento das defesas antioxidantes naquele estudo. Os experimentos de exposição ao biodiesel e à hipóxia foram realizados no mês de junho, época em que essa espécie ainda está em período de reprodução. Tal fato poderia explicar os altos níveis basais encontrados nos grupos desses dois experimentos, ajudando a prevenir os danos oxidativos, visto que não houve alteração nos níveis de MDA.

Podemos observar também que houve diferenças nas respostas dos dois primeiros experimentos que foram realizados em junho de 2011 e no terceiro experimento, realizado em fevereiro de 2012. Na terceira etapa de testes, os grupos que foram mortos logo depois do período de hipóxia apresentaram uma manutenção ou um aumento dos níveis de atividade enzimática relativos à privação de oxigênio ou à presença do biodiesel. Além das variações sazonais que podem ter influenciado os parâmetros bioquímicos, o fato dos mexilhões dos primeiros experimentos serem de cultivo e os do último experimento serem de costão pode ser mais uma variável para gerar respostas diferentes. Animais de costão estão mais sujeitos a sazonalidade e aos períodos cíclicos das marés, tendo suas defesas antioxidantes sempre colocadas à prova. Já os animais de cultivo ficam constantemente submersos. Portanto, tais fatores podem ser responsáveis pelas diferentes respostas entre os experimentos.

A GSH é um antioxidante não enzimático que está muito relacionado a destoxificação de compostos químicos e ERO. Pudemos observar o aumento na concentração desse peptídeo em vários dos grupos experimentais. Aparentemente, os sistemas bioquímicos relacionados a GSH, como a GR e a GST são os principais responsáveis pela biotransformação de compostos químicos e pelo combate a ERO nesta espécie de mexilhão.

O metabolismo de hipóxia, por ser muito afetado por variações sazonais e ambientais, pode ser um fator que afeta a destoxificação de compostos químicos levando a um maior estresse oxidativo ou, por outro lado, gerando uma proteção extra frente uma situação de aumento de ERO devido a contaminação. Ainda, a pré-exposição ao B5 também pode interferir no período de recuperação pós-hipóxia, deixando o organismo mais susceptível ao ataque das ERO, pois no primeiro experimento, algumas enzimas antioxidantes tiveram suas atividades reduzidas. Sendo assim, quando se utiliza mexilhões *P. perna* como organismos sentinelas em biomonitoramento, o metabolismo de hipóxia, além das condições ambientais e sazonais, devem ser levados em consideração para que sejam evitados falsos positivos ou falsos negativos.

6 *Conclusões*

Nossos resultados, levando em consideração a espécie de mexilhão, as concentrações e o tempo de exposição utilizados nos experimentos, demonstram que a mistura B5 apresentou uma leve interferência no sistema antioxidante alterando parâmetros como GSH, GST, GR, SOD e GPx, mas não gerou peroxidação lipídica. Entretanto, foi capaz de alterar a estabilidade da membrana lisossomal. Embora a adição de 5% de biodiesel ao óleo diesel torne mais biodegradável e emita menos gases de efeito estufa que o óleo diesel puro, essa mistura deve ser manuseada com cuidado para evitar derramamento e descargas indevidas para o meio ambiente.

Também pudemos observar que os níveis antioxidantes são mantidos elevados nesses mexilhões provavelmente como uma adaptação aos regimes de hipóxia e normóxia ditados pelas marés, tornando esse organismo menos susceptíveis ao B5 de uma forma geral.

A alteração da atividade enzimática de alguns grupos foi relacionada ao fato dos animais terem passado por um período prolongado de hipóxia e depois voltado para a reoxigenação e não à presença do B5, mostrando que a concentração testada pode não ser adequada para este tipo de teste. Entretanto, em alguns casos o B5 pareceu interferir em alguns parâmetros relacionados com a condição de hipóxia quando observamos, por exemplo, as diferenças nos níveis de GSH e MDA entre os grupos "Água + Hipóxia" e "B5 + Hipóxia" ou ainda quando comparamos a atividade da CAT e da SOD, tempo de retenção do vermelho neutro e concentração de GSH e MDA entre os grupos "Hipóxia + Água" e "Hipóxia + B5".

Além disso, a GSH parece ser uma via muito importante na destoxificação de compostos químicos e combate a espécies reativas de oxigênio em mexilhões *P. perna*, visto que em grande parte dos grupos experimentais esse parâmetro avaliado sofreu alguma alteração. Tais achados evidenciam a importância de maiores estudos relacionados à exposição de organismos aquáticos à mistura B5 e do efeito que estressores ambientais como a hipóxia pode influenciar nas análises ambientais.

Referências

- ABELE, D.; GROSSPIETSCH, H.; PÖRTNER, H. O. Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental PO₂, temperature, H₂O₂ and H₂S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*. *Mar Ecol Prog Ser*, v. 163, p. 179–191, 1998.
- ABELE, D. *et al.* Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Front Biosci*, v. 12, p. 933–946, 2007.
- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol A*, v. 138, p. 405–415, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. *Resolução ANP n. 2 de 29.1.2008*. [S.l.], 2008. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/janeiro/ranp%202%20-%202008.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$q=\\$x=\\$nc=8806](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/janeiro/ranp%202%20-%202008.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$q=$x=$nc=8806)>. Acesso em: 02 set. 2010.
- ALMEIDA, E. A. *et al.* Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. *J Exp Mar Biol Ecol*, v. 318, p. 21–30, 2005.
- ALMEIDA, E. A. *et al.* Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 146, n. 4, p. 588–600, 2007.
- ALMEIDA, E. A.; DI MASCIO, P. Hypometabolism and antioxidative defense systems in marine invertebrates. In: _____. *Hypometabolism: Strategies of Survival in Vertebrates and Invertebrates*. [S.l.]: Research Signpost, 2011. cap. 3, p. 39–55.
- ALMEIDA, E. A. *et al.* DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 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* exposed to different metals. *Mar Pollut Bull*, v. 49, n. 5-6, p. 386–92, 2004.
- ANANDRAJ, A. *et al.* Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 132, n. 3, p. 355–363, 2002.
- BASHA, S.; GOPAL, K.; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. *Renew Sust Energ Rev*, v. 13, p. 1628–1634, 2009.

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

BIODIESELBR ONLINE. Petrobras começa pesquisas para usar biodiesel em navios. 2011. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/petrobras-pesquisas-biodiesel-navios-160310.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248–54, 1976.

BRITO, M. *et al.* Acute Cardiovascular and Inflammatory Toxicity Induced by Inhalation of Diesel and Biodiesel Exhaust Particles. *Toxicol Sci*, v. 116, p. 67–68, 2011.

CAJARAVILLE, M. *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the iberian peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ*, v. 247, p. 295–311, 2000.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. *Methods Enzymol*, v. 113, p. 484–490, 1985.

CHANDEL, N. *et al.* Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia. *J Biol Chem*, v. 275, p. 25130–25138, 2000.

CHEUNG, C. *et al.* Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat Toxicol*, v. 52, p. 189–203, 2001.

CÔRREA, S.; ARBILLA, G. Aromatic hydrocarbons emissions in diesel and biodiesel exhausts. *Atmos Environ*, v. 40, p. 6821–6826, 2006.

CUBERO-LEON, E. *et al.* Two CYP3A-like genes in the marine mussel *Mytilus edulis*: mRNA expression modulation following short-term exposure to endocrine disruptors. *Mar Environ Res*, v. 74, p. 32–39, 2012.

DAFRE, A. *et al.* Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. *Chem-Biol Interact*, v. 149, n. 2-3, p. 97–105, 2004.

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, 2007.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Bio*, v. 8, p. 813–824, 2007.

DAVID, E. *et al.* Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J*, v. 272, n. 21, p. 5635–5652, 2005.

DEMELLO, J. A. *et al.* Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. *Mar Pollut Bull*, v. 54, p. 894–904, 2007.

ERMAK, G.; DAVIES, K. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol*, v. 38, p. 713–721, 2002.

- FERREIRA, M.; ALENCASTRO, A.; HERMES-LIMA, M. Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Can J Zool*, v. 81, n. 7, p. 1239–1248, 2003.
- FRENZILLI, G. *et al.* DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutat Res*, v. 552, n. 1-2, p. 187–95, 2004.
- GADAGBUI, B.; JAMES, M. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquatic Toxicol*, v. 49, p. 27–37, 2000.
- GESTEL, C. A. M.; BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, v. 5, n. 4, p. 217–225, 1996.
- GOROKHOVAA, E. *et al.* Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia. *Aquatic Toxicol*, 2012.
- GORR, T. A. *et al.* Hypoxia Tolerance in Animals: Biology and Application. *Physiol Biochem Zool*, v. 83, n. 6, 2010.
- HALLIWELL, B.; CROSS, C. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, v. 102, p. 5–12, 1994.
- HAMANAKA, R. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*, v. 35, p. 505–513, 2010.
- HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 133, n. 4, p. 537–556, 2002.
- KAWABE, S.; YOKOYAMA, Y. Role of hypoxia-inducible factor α in response to hypoxia and heat shock in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol*, v. 14, p. 106–119, 2012.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J Biol Chem*, v. 251, n. 20, p. 6183–8, 1976.
- KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem*, v. 257, 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. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 72, n. 4, p. 1296–302, 2009.
- KUCHINO, Y. *et al.* Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature*, v. 327, p. 77–79, 1987.
- KUROCHKIN, I. O. *et al.* Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia and re-oxygenation in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 297, p. R1262–R1272, 2009.
- LAPUERTA, M.; ARMAS, O.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDDZ, J. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. *Prog Energ Combust*, v. 34, p. 198–223, 2008.
- LEDUC, S. *et al.* Optimizing biodiesel production in India. *Appl Energy*, v. 86, p. 125–131, 2009.

- LEE, S. W.; HERAGE, T.; YOUNG, B. Emission reduction potential from the combustion of soy methyl ester fuel blended with petroleum distillate fuel. *Fuel*, v. 83, p. 1607–1613, 2004.
- LEITE, M. *et al.* Toxicity of water soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. *Environ Toxicol Chem*, v. 30, p. 893–897, 2011.
- LEME, D. *et al.* Genotoxicity assessment of water soluble fractions of biodiesel and its diesel blends using the *Salmonella* assay and the in vitro MicroFlow[®] kit (Litron) assay. *Chemosphere*, v. 86, p. 512–520, 2012.
- LIMA, I. *et al.* Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere*, v. 66, p. 1230–1242, 2007.
- LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull*, v. 42, n. 8, p. 656–666, 2001.
- LIVINGSTONE, D. R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev Med Vet*, v. 154, n. 6, p. 427–430, 2003.
- LÓPEZ-BAREA, J.; LEE, C. Mouse-liver glutathione reductase. *Eur J Biochem*, v. 98, p. 487–499, 1979.
- LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat Res*, v. 399, n. 1, p. 3–15, 1998.
- LOWE, D.; FOSSATO, V.; DEPLEDGE, M. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice lagoon: an in vitro study. *Mar Ecol Prog Ser*, v. 129, p. 189–196, 1995.
- LU, S. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concept and controversies. *FASEB J*, v. 13, p. 1169–1183, 1999.
- LU, S. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, v. 30, p. 42–59, 2009.
- LÜCHMANN, K. H. *et al.* Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. *Aquat Toxicol*, v. 105, p. 652–660, 2011.
- MAO, G. D. *et al.* Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *J Biol Chem*, v. 268, p. 416–420, 1993.
- MARIA, V.; BEBIANNO, M. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 154, p. 53–63, 2011.
- MARSHALL, D. J.; MCQUAID, C. D. Differential physiological and behavioural responses of the intertidal mussels, *Choromytilus meridionalis* (kr.) and *Perna perna* L., to exposure to hypoxia and air: a basis for spatial separation. *J Exp Mar Bio Ecol*, v. 171, p. 225–237, 1993.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, v. 244, n. 22, p. 6049–55, 1969.

- MEDEIROS, P. M. *et al.* Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of patos lagoon estuary. *Brazil Environ Int*, v. 31, p. 77–87, 2005.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Ann Rev Biochem*, v. 52, p. 711–760, 1983.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. B5 passa a ser obrigatório a partir de primeiro de janeiro. 2010. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/mme/noticias/destaque3/destaque_0081.html>. Acesso em: 02 set. 2010.
- 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. *Nat Prod Rep*, v. 24, n. 3, p. 585–609, 2007.
- MURPHY, M. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, v. 417, p. 1–13, 2009.
- NICASTRO, K. R. *et al.* The role of gaping behaviour in habitat partitioning between coexisting intertidal mussels. *BMC Ecol*, v. 10, p. 1–11, 2010.
- NIKINMAA, M.; REES, B. B. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 288, p. 1079–1090, 2005.
- 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, p. 97–105, 2011.
- NORDBERG, J.; ARNER, E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thio-redoxin system. *Free Radic Biol and Med*, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 49, n. 1, p. 64–75, 2001.
- PANNUNZIO, T. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J Exp Mar Biol Ecol*, v. 221, p. 277–292, 1998.
- PASQUALINO, J.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biom Bioen*, v. 30, n. 10, p. 874–879, 2006.
- PEREIRA, M.; MUDGE, S. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels. *Chemosphere*, v. 54, p. 297–304, 2004.
- PINTO, M.; MATA, A.; LÓPEZ-BAREA, J. Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch Biochem Biophys*, v. 228, p. 1–12, 1984.
- PIONTKIVSKA, H. *et al.* Molecular characterization and mrna expression of two key enzymes of hypoxia-sensing pathways in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmlin): Hypoxia-inducible factor α (HIF- α) and HIF-prolyl hydroxylase (PHD). *Comp Biochem Physiol D*, v. 6, p. 103–114, 2011.

- POMPELLA, A. *et al.* The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*, v. 66, p. 1449–1503, 2003.
- REGOLI, F. *et al.* Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat Toxicol*, v. 105S, p. 56–66, 2011.
- REGOLI, F.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat Toxicol*, v. 40, p. 375–392, 1998.
- RICHARDSON, B. J. *et al.* Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels integrate biomarker responses? *Mar Pollut Bull*, v. 57, p. 503–514, 2008.
- RODRÍGUEZ-ARIZA, A.; TORIBIO, F.; LÓPEZ-BAREA, J. Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr*, v. 656, p. 311–318, 1994.
- SANCHEZ, W. *et al.* Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environ Int*, v. 34, p. 791–798, 2008.
- SARASQUETE, C.; SEGNER, H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci Total Environ*, v. 247, n. 2-3, p. 313–32, 2000.
- SEMENZA, G.; JIANG, B.; LEUNG, S. Hypoxia response elements in the adolase a, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters containing essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, v. 271, p. 32529–32537, 1996.
- SEMENZA, G.; ROTH, P.; FANG, H. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, v. 269, p. 23757–23763, 1994.
- SHEEHAN, D. *et al.* Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*, v. 360, p. 1–16, 2001.
- SIES, H. *et al.* Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett*, v. 103, n. 2, p. 287–90, 1979.
- SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. *Bull Environ Contam Toxicol*, v. 76, p. 505–511, 2006.
- SIMONATO, J. D.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology*, v. 20, p. 1400–1410, 2011.
- 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. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 69, n. 1, p. 112–20, 2008.
- STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Facultative metabolic rate depression: molecular regulation and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation, and estivation. *Q Rev Biol*, v. 65, p. 147–174, 1990.

- VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Heal C*, v. 27, p. 120–39, 2009.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.
- VIEIRA, P. A. *et al.* Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *J Hazard Mater*, v. 140, n. 1-2, p. 52–9, 2007.
- WANG, Y. *et al.* The combined effects of oxygen availability and salinity on physiological responses and scope for growth in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar Pollut Bull*, v. 63, p. 255–261, 2011.
- WHO Internacional Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria*, World Health Organization, Geneva, v. 155, 1993.
- WHYTE, J. J. *et al.* Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol*, v. 30, n. 4, p. 347–570, 2000.
- WIDDOWS, J. *et al.* Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure in air. *Comp Biochem Physiol*, v. 62A, p. 301–308, 1979.
- WILHELM FILHO, D. *et al.* Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*, v. 203, n. 1-2, p. 149–158, 2001.
- WINSTON, G. W. *et al.* Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comp Biochem Physiol*, v. 113, p. 221–229, 1996.
- XUE, J.; GRIFT, T.; HANSEN, A. Effect of biodiesel on engine performances and emissions. *Renew Sust Energ Rev*, v. 15, p. 1098–1116, 2011.
- ZANETTE, J. *et al.* Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. *Sci Total Environ*, v. 409, p. 1976–1983, 2011.
- ZANETTE, J. *et al.* Identification of cyp genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome p450 genes in bivalves. *Mar Environ Res*, v. 69, p. S1–S3, 2010.
- ZHANG, J. F. *et al.* Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 58, n. 1, p. 110–6, 2004.

APÊNDICE A – Valores dos testes estatísticos para o experimento de biodiesel

Tabela 2: Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para CAT

Tecido	Tempo	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	6 h	Controle	0.547	Anova	0.062	a
Brânquia	6 h	B5 0,01mL/L	0.547	Anova	0.062	a
Brânquia	6 h	B5 0,1 mL/L	0.547	Anova	0.062	a
Brânquia	12 h	Controle	0.067	Anova	0.841	a
Brânquia	12 h	B5 0,01mL/L	0.067	Anova	0.841	a
Brânquia	12 h	B5 0,1 mL/L	0.067	Anova	0.841	a
Brânquia	48 h	Controle	0.666	Anova	0.742	a
Brânquia	48 h	B5 0,01mL/L	0.666	Anova	0.742	a
Brânquia	48 h	B5 0,1 mL/L	0.666	Anova	0.742	a
Brânquia	168 h	Controle	0.242	Anova	0.098	a
Brânquia	168 h	B5 0,01mL/L	0.242	Anova	0.098	a
Brânquia	168 h	B5 0,1 mL/L	0.242	Anova	0.098	a
Glândula digestiva	6 h	Controle	0.363	Anova	0.358	a
Glândula digestiva	6 h	B5 0,01mL/L	0.363	Anova	0.358	a
Glândula digestiva	6 h	B5 0,1 mL/L	0.363	Anova	0.358	a
Glândula digestiva	12 h	Controle	0.647	Anova	0.932	a
Glândula digestiva	12 h	B5 0,01mL/L	0.647	Anova	0.932	a
Glândula digestiva	12 h	B5 0,1 mL/L	0.647	Anova	0.932	a
Glândula digestiva	48 h	Controle	0.138	Anova	0.539	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,01mL/L	0.138	Anova	0.539	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,1 mL/L	0.138	Anova	0.539	a
Glândula digestiva	168 h	Controle	0.860	Anova	0.227	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,01mL/L	0.860	Anova	0.227	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,1 mL/L	0.860	Anova	0.227	a

Tabela 3: Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para GPx

Tecido	Tempo	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	6 h	Controle	0.984	Anova	0.344	a
Brânquia	6 h	B5 0,01mL/L	0.984	Anova	0.344	a
Brânquia	6 h	B5 0,1 mL/L	0.984	Anova	0.344	a
Brânquia	12 h	Controle	0.009	Kruskal-Wallis	0.468	a
Brânquia	12 h	B5 0,01mL/L	0.009	Kruskal-Wallis	0.468	a
Brânquia	12 h	B5 0,1 mL/L	0.009	Kruskal-Wallis	0.468	a
Brânquia	48 h	Controle	0.008	Kruskal-Wallis	0.976	a
Brânquia	48 h	B5 0,01mL/L	0.008	Kruskal-Wallis	0.976	a
Brânquia	48 h	B5 0,1 mL/L	0.008	Kruskal-Wallis	0.976	a
Brânquia	168 h	Controle	0.069	Anova	0.095	a
Brânquia	168 h	B5 0,01mL/L	0.069	Anova	0.095	a
Brânquia	168 h	B5 0,1 mL/L	0.069	Anova	0.095	a
Glândula digestiva	6 h	Controle	0.457	Anova	0.039	a
Glândula digestiva	6 h	B5 0,01mL/L	0.457	Anova	0.039	ab
Glândula digestiva	6 h	B5 0,1 mL/L	0.457	Anova	0.039	b
Glândula digestiva	12 h	Controle	0.137	Anova	0.133	a
Glândula digestiva	12 h	B5 0,01mL/L	0.137	Anova	0.133	a
Glândula digestiva	12 h	B5 0,1 mL/L	0.137	Anova	0.133	a
Glândula digestiva	48 h	Controle	0.449	Anova	0.023	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,01mL/L	0.449	Anova	0.023	b
Glândula digestiva	48 h	B5 0,1 mL/L	0.449	Anova	0.023	ab
Glândula digestiva	168 h	Controle	0.250	Anova	0.060	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,01mL/L	0.250	Anova	0.060	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,1 mL/L	0.250	Anova	0.060	a

Tabela 4: Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para GR

Tecido	Tempo	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	6 h	Controle	0.370	Anova	0.967	a
Brânquia	6 h	B5 0,01mL/L	0.370	Anova	0.967	a
Brânquia	6 h	B5 0,1 mL/L	0.370	Anova	0.967	a
Brânquia	12 h	Controle	0.007	Kruskal-Wallis	0.005	a
Brânquia	12 h	B5 0,01mL/L	0.007	Kruskal-Wallis	0.005	b
Brânquia	12 h	B5 0,1 mL/L	0.007	Kruskal-Wallis	0.005	b
Brânquia	48 h	Controle	0.694	Anova	0.611	a
Brânquia	48 h	B5 0,01mL/L	0.694	Anova	0.611	a
Brânquia	48 h	B5 0,1 mL/L	0.694	Anova	0.611	a
Brânquia	168 h	Controle	0.277	Anova	0.398	a
Brânquia	168 h	B5 0,01mL/L	0.277	Anova	0.398	a
Brânquia	168 h	B5 0,1 mL/L	0.277	Anova	0.398	a
Glândula digestiva	6 h	Controle	0.711	Anova	0.737	a
Glândula digestiva	6 h	B5 0,01mL/L	0.711	Anova	0.737	a
Glândula digestiva	6 h	B5 0,1 mL/L	0.711	Anova	0.737	a
Glândula digestiva	12 h	Controle	0.904	Anova	0.001	b
Glândula digestiva	12 h	B5 0,01mL/L	0.904	Anova	0.001	b
Glândula digestiva	12 h	B5 0,1 mL/L	0.904	Anova	0.001	a
Glândula digestiva	48 h	Controle	0.059	Anova	0.364	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,01mL/L	0.059	Anova	0.364	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,1 mL/L	0.059	Anova	0.364	a
Glândula digestiva	168 h	Controle	0.690	Anova	0.000	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,01mL/L	0.690	Anova	0.000	b
Glândula digestiva	168 h	B5 0,1 mL/L	0.690	Anova	0.000	b

Tabela 5: Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para GSH

Tecido	Tempo	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	6 h	Controle	0.001	Kruskal-Wallis	0.371	a
Brânquia	6 h	B5 0,01mL/L	0.001	Kruskal-Wallis	0.371	a
Brânquia	6 h	B5 0,1 mL/L	0.001	Kruskal-Wallis	0.371	a
Brânquia	12 h	Controle	0.164	Anova	0.806	a
Brânquia	12 h	B5 0,01mL/L	0.164	Anova	0.806	a
Brânquia	12 h	B5 0,1 mL/L	0.164	Anova	0.806	a
Brânquia	48 h	Controle	0.357	Anova	0.000	b
Brânquia	48 h	B5 0,01mL/L	0.357	Anova	0.000	b
Brânquia	48 h	B5 0,1 mL/L	0.357	Anova	0.000	a
Brânquia	168 h	Controle	0.420	Anova	0.063	a
Brânquia	168 h	B5 0,01mL/L	0.420	Anova	0.063	a
Brânquia	168 h	B5 0,1 mL/L	0.420	Anova	0.063	a
Glândula digestiva	6 h	Controle	0.446	Anova	0.036	b
Glândula digestiva	6 h	B5 0,01mL/L	0.446	Anova	0.036	ab
Glândula digestiva	6 h	B5 0,1 mL/L	0.446	Anova	0.036	a
Glândula digestiva	12 h	Controle	0.158	Anova	0.000	b
Glândula digestiva	12 h	B5 0,01mL/L	0.158	Anova	0.000	c
Glândula digestiva	12 h	B5 0,1 mL/L	0.158	Anova	0.000	a
Glândula digestiva	48 h	Controle	0.485	Anova	0.219	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,01mL/L	0.485	Anova	0.219	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,1 mL/L	0.485	Anova	0.219	a
Glândula digestiva	168 h	Controle	0.124	Anova	0.054	b
Glândula digestiva	168 h	B5 0,01mL/L	0.124	Anova	0.054	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,1 mL/L	0.124	Anova	0.054	ab

Tabela 6: Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para GST

Tecido	Tempo	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	6 h	Controle	0.148	Anova	0.127	a
Brânquia	6 h	B5 0,01mL/L	0.148	Anova	0.127	a
Brânquia	6 h	B5 0,1 mL/L	0.148	Anova	0.127	a
Brânquia	12 h	Controle	0.143	Anova	0.068	a
Brânquia	12 h	B5 0,01mL/L	0.143	Anova	0.068	a
Brânquia	12 h	B5 0,1 mL/L	0.143	Anova	0.068	a
Brânquia	48 h	Controle	0.210	Anova	0.018	a
Brânquia	48 h	B5 0,01mL/L	0.210	Anova	0.018	b
Brânquia	48 h	B5 0,1 mL/L	0.210	Anova	0.018	ab
Brânquia	168 h	Controle	0.010	Kruskal-Wallis	0.686	a
Brânquia	168 h	B5 0,01mL/L	0.010	Kruskal-Wallis	0.686	a
Brânquia	168 h	B5 0,1 mL/L	0.010	Kruskal-Wallis	0.686	a
Glândula digestiva	6 h	Controle	0.783	Anova	0.331	a
Glândula digestiva	6 h	B5 0,01mL/L	0.783	Anova	0.331	a
Glândula digestiva	6 h	B5 0,1 mL/L	0.783	Anova	0.331	a
Glândula digestiva	12 h	Controle	0.682	Anova	0.299	a
Glândula digestiva	12 h	B5 0,01mL/L	0.682	Anova	0.299	a
Glândula digestiva	12 h	B5 0,1 mL/L	0.682	Anova	0.299	a
Glândula digestiva	48 h	Controle	0.852	Anova	0.384	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,01mL/L	0.852	Anova	0.384	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,1 mL/L	0.852	Anova	0.384	a
Glândula digestiva	168 h	Controle	0.179	Anova	0.776	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,01mL/L	0.179	Anova	0.776	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,1 mL/L	0.179	Anova	0.776	a

Tabela 7: Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para MDA

Tecido	Tempo	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	6 h	Controle	0.907	Anova	0.471	a
Brânquia	6 h	B5 0,01mL/L	0.907	Anova	0.471	a
Brânquia	6 h	B5 0,1 mL/L	0.907	Anova	0.471	a
Brânquia	12 h	Controle	0.394	Anova	0.558	a
Brânquia	12 h	B5 0,01mL/L	0.394	Anova	0.558	a
Brânquia	12 h	B5 0,1 mL/L	0.394	Anova	0.558	a
Brânquia	48 h	Controle	0.204	Anova	0.004	a
Brânquia	48 h	B5 0,01mL/L	0.204	Anova	0.004	b
Brânquia	48 h	B5 0,1 mL/L	0.204	Anova	0.004	b
Brânquia	168 h	Controle	0.396	Anova	0.705	a
Brânquia	168 h	B5 0,01mL/L	0.396	Anova	0.705	a
Brânquia	168 h	B5 0,1 mL/L	0.396	Anova	0.705	a
Glândula digestiva	6 h	Controle	0.092	Anova	0.065	ab
Glândula digestiva	6 h	B5 0,01mL/L	0.092	Anova	0.065	b
Glândula digestiva	6 h	B5 0,1 mL/L	0.092	Anova	0.065	a
Glândula digestiva	12 h	Controle	0.323	Anova	0.133	a
Glândula digestiva	12 h	B5 0,01mL/L	0.323	Anova	0.133	a
Glândula digestiva	12 h	B5 0,1 mL/L	0.323	Anova	0.133	a
Glândula digestiva	48 h	Controle	0.942	Anova	0.772	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,01mL/L	0.942	Anova	0.772	a
Glândula digestiva	48 h	B5 0,1 mL/L	0.942	Anova	0.772	a
Glândula digestiva	168 h	Controle	0.492	Anova	0.475	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,01mL/L	0.492	Anova	0.475	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,1 mL/L	0.492	Anova	0.475	a

Tabela 8: Valores dos testes estatísticos para o experimento de exposição ao B5 para SOD

Tecido	Tempo	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	6 h	Controle	0.840	Anova	0.242	a
Brânquia	6 h	B5 0,01mL/L	0.840	Anova	0.242	a
Brânquia	6 h	B5 0,1 mL/L	0.840	Anova	0.242	a
Brânquia	12 h	Controle	0.768	Anova	0.233	a
Brânquia	12 h	B5 0,01mL/L	0.768	Anova	0.233	a
Brânquia	12 h	B5 0,1 mL/L	0.768	Anova	0.233	a
Brânquia	48 h	Controle	0.234	Anova	0.151	a
Brânquia	48 h	B5 0,01mL/L	0.234	Anova	0.151	a
Brânquia	48 h	B5 0,1 mL/L	0.234	Anova	0.151	a
Brânquia	168 h	Controle	0.036	Kruskal-Wallis	0.222	a
Brânquia	168 h	B5 0,01mL/L	0.036	Kruskal-Wallis	0.222	a
Brânquia	168 h	B5 0,1 mL/L	0.036	Kruskal-Wallis	0.222	a
Glândula digestiva	6 h	Controle	0.914	Anova	0.435	a
Glândula digestiva	6 h	B5 0,01mL/L	0.914	Anova	0.435	a
Glândula digestiva	6 h	B5 0,1 mL/L	0.914	Anova	0.435	a
Glândula digestiva	12 h	Controle	0.227	Anova	0.002	a
Glândula digestiva	12 h	B5 0,01mL/L	0.227	Anova	0.002	b
Glândula digestiva	12 h	B5 0,1 mL/L	0.227	Anova	0.002	a
Glândula digestiva	48 h	Controle	0.896	Anova	0.011	ab
Glândula digestiva	48 h	B5 0,01mL/L	0.896	Anova	0.011	b
Glândula digestiva	48 h	B5 0,1 mL/L	0.896	Anova	0.011	a
Glândula digestiva	168 h	Controle	0.199	Anova	0.205	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,01mL/L	0.199	Anova	0.205	a
Glândula digestiva	168 h	B5 0,1 mL/L	0.199	Anova	0.205	a

APÊNDICE B – Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação

Tabela 9: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para CAT

Tecido	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	Controle	0.005	Kruskal-Wallis	0.000	bc
Brânquia	Água + Hipóxia	0.005	Kruskal-Wallis	0.000	a
Brânquia	Biodiesel + Hipóxia	0.005	Kruskal-Wallis	0.000	ab
Brânquia	Hipóxia + Água	0.005	Kruskal-Wallis	0.000	d
Brânquia	Hipóxia + Biodiesel	0.005	Kruskal-Wallis	0.000	cd
Glândula digestiva	Controle	0.094	Anova	0.000	a
Glândula digestiva	Água + Hipóxia	0.094	Anova	0.000	a
Glândula digestiva	Biodiesel + Hipóxia	0.094	Anova	0.000	a
Glândula digestiva	Hipóxia + Água	0.094	Anova	0.000	c
Glândula digestiva	Hipóxia + Biodiesel	0.094	Anova	0.000	b

Tabela 10: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para GPx

Tecido	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	Controle	0.004	Kruskal-Wallis	0.284	b
Brânquia	Água + Hipóxia	0.004	Kruskal-Wallis	0.284	ab
Brânquia	Biodiesel + Hipóxia	0.004	Kruskal-Wallis	0.284	a
Brânquia	Hipóxia + Água	0.004	Kruskal-Wallis	0.284	ab
Brânquia	Hipóxia + Biodiesel	0.004	Kruskal-Wallis	0.284	ab
Glândula digestiva	Controle	0.022	Kruskal-Wallis	0.037	ab
Glândula digestiva	Água + Hipóxia	0.022	Kruskal-Wallis	0.037	b
Glândula digestiva	Biodiesel + Hipóxia	0.022	Kruskal-Wallis	0.037	a
Glândula digestiva	Hipóxia + Água	0.022	Kruskal-Wallis	0.037	a
Glândula digestiva	Hipóxia + Biodiesel	0.022	Kruskal-Wallis	0.037	a

Tabela 11: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para GR

Tecido	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	Controle	0.240	Anova	0.000	a
Brânquia	Água + Hipóxia	0.240	Anova	0.000	a
Brânquia	Biodiesel + Hipóxia	0.240	Anova	0.000	a
Brânquia	Hipóxia + Água	0.240	Anova	0.000	b
Brânquia	Hipóxia + Biodiesel	0.240	Anova	0.000	b
Glândula digestiva	Controle	0.013	Kruskal-Wallis	0.027	abc
Glândula digestiva	Água + Hipóxia	0.013	Kruskal-Wallis	0.027	a
Glândula digestiva	Biodiesel + Hipóxia	0.013	Kruskal-Wallis	0.027	ab
Glândula digestiva	Hipóxia + Água	0.013	Kruskal-Wallis	0.027	c
Glândula digestiva	Hipóxia + Biodiesel	0.013	Kruskal-Wallis	0.027	bc

Tabela 12: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para GSH

Tecido	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	Controle	0.435	Anova	0.001	b
Brânquia	Água + Hipóxia	0.435	Anova	0.001	b
Brânquia	Biodiesel + Hipóxia	0.435	Anova	0.001	ab
Brânquia	Hipóxia + Água	0.435	Anova	0.001	a
Brânquia	Hipóxia + Biodiesel	0.435	Anova	0.001	b
Glândula digestiva	Controle	0.233	Anova	0.000	a
Glândula digestiva	Água + Hipóxia	0.233	Anova	0.000	b
Glândula digestiva	Biodiesel + Hipóxia	0.233	Anova	0.000	a
Glândula digestiva	Hipóxia + Água	0.233	Anova	0.000	a
Glândula digestiva	Hipóxia + Biodiesel	0.233	Anova	0.000	b

Tabela 13: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para GST

Tecido	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	Controle	0.547	Anova	0.000	ab
Brânquia	Água + Hipóxia	0.547	Anova	0.000	ab
Brânquia	Biodiesel + Hipóxia	0.547	Anova	0.000	a
Brânquia	Hipóxia + Água	0.547	Anova	0.000	c
Brânquia	Hipóxia + Biodiesel	0.547	Anova	0.000	bc
Glândula digestiva	Controle	0.522	Anova	0.019	ab
Glândula digestiva	Água + Hipóxia	0.522	Anova	0.019	a
Glândula digestiva	Biodiesel + Hipóxia	0.522	Anova	0.019	ab
Glândula digestiva	Hipóxia + Água	0.522	Anova	0.019	b
Glândula digestiva	Hipóxia + Biodiesel	0.522	Anova	0.019	ab

Tabela 14: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para MDA

Tecido	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	Controle	0.004	Kruskal-Wallis	0.000	cd
Brânquia	Água + Hipóxia	0.004	Kruskal-Wallis	0.000	d
Brânquia	Biodiesel + Hipóxia	0.004	Kruskal-Wallis	0.000	c
Brânquia	Hipóxia + Água	0.004	Kruskal-Wallis	0.000	a
Brânquia	Hipóxia + Biodiesel	0.004	Kruskal-Wallis	0.000	b
Glândula digestiva	Controle	0.038	Kruskal-Wallis	0.000	cd
Glândula digestiva	Água + Hipóxia	0.038	Kruskal-Wallis	0.000	bc
Glândula digestiva	Biodiesel + Hipóxia	0.038	Kruskal-Wallis	0.000	d
Glândula digestiva	Hipóxia + Água	0.038	Kruskal-Wallis	0.000	a
Glândula digestiva	Hipóxia + Biodiesel	0.038	Kruskal-Wallis	0.000	b

Tabela 15: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia e reoxigenação para SOD

Tecido	Tratamento	Valor de P (Levene)	Teste	Valor de P	Grupo Post-hoc
Brânquia	Controle	0.764	Anova	0.000	a
Brânquia	Água + Hipóxia	0.764	Anova	0.000	a
Brânquia	Biodiesel + Hipóxia	0.764	Anova	0.000	a
Brânquia	Hipóxia + Água	0.764	Anova	0.000	b
Brânquia	Hipóxia + Biodiesel	0.764	Anova	0.000	a
Glândula digestiva	Controle	0.415	Anova	0.050	a
Glândula digestiva	Água + Hipóxia	0.415	Anova	0.050	a
Glândula digestiva	Biodiesel + Hipóxia	0.415	Anova	0.050	a
Glândula digestiva	Hipóxia + Água	0.415	Anova	0.050	a
Glândula digestiva	Hipóxia + Biodiesel	0.415	Anova	0.050	a

APÊNDICE C – Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia

Tabela 16: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para CAT

Tecido	Tempo	Tratamento	Teste	Valor de P
Brânquia	6 h	Controle	t-test	0.586
Brânquia	6 h	Hipóxia	t-test	0.586
Brânquia	12 h	Controle	Mann-Whitney test	0.130
Brânquia	12 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.130
Brânquia	24 h	Controle	t-test	0.019
Brânquia	24 h	Hipóxia	t-test	0.019
Brânquia	48 h	Controle	t-test	0.181
Brânquia	48 h	Hipóxia	t-test	0.181
Glândula digestiva	6 h	Controle	Mann-Whitney test	0.165
Glândula digestiva	6 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.165
Glândula digestiva	12 h	Controle	t-test	0.135
Glândula digestiva	12 h	Hipóxia	t-test	0.135
Glândula digestiva	24 h	Controle	Mann-Whitney test	0.050
Glândula digestiva	24 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.050
Glândula digestiva	48 h	Controle	t-test	0.242
Glândula digestiva	48 h	Hipóxia	t-test	0.242

Tabela 17: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para GPx

Tecido	Tempo	Tratamento	Teste	Valor de P
Brânquia	6 h	Controle	t-test	0.483
Brânquia	6 h	Hipóxia	t-test	0.483
Brânquia	12 h	Controle	t-test	0.251
Brânquia	12 h	Hipóxia	t-test	0.251
Brânquia	24 h	Controle	Mann-Whitney test	0.130
Brânquia	24 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.130
Brânquia	48 h	Controle	t-test	0.213
Brânquia	48 h	Hipóxia	t-test	0.213
Glândula digestiva	6 h	Controle	t-test	0.136
Glândula digestiva	6 h	Hipóxia	t-test	0.136
Glândula digestiva	12 h	Controle	Mann-Whitney test	0.279
Glândula digestiva	12 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.279
Glândula digestiva	24 h	Controle	t-test	0.463
Glândula digestiva	24 h	Hipóxia	t-test	0.463
Glândula digestiva	48 h	Controle	t-test	0.030
Glândula digestiva	48 h	Hipóxia	t-test	0.030

Tabela 18: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para GR

Tecido	Tempo	Tratamento	Teste	Valor de P
Brânquia	6 h	Controle	Mann-Whitney test	0.721
Brânquia	6 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.721
Brânquia	12 h	Controle	t-test	0.823
Brânquia	12 h	Hipóxia	t-test	0.823
Brânquia	24 h	Controle	Mann-Whitney test	0.505
Brânquia	24 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.505
Brânquia	48 h	Controle	t-test	0.865
Brânquia	48 h	Hipóxia	t-test	0.865
Glândula digestiva	6 h	Controle	Mann-Whitney test	0.721
Glândula digestiva	6 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.721
Glândula digestiva	12 h	Controle	t-test	0.003
Glândula digestiva	12 h	Hipóxia	t-test	0.003
Glândula digestiva	24 h	Controle	t-test	0.211
Glândula digestiva	24 h	Hipóxia	t-test	0.211
Glândula digestiva	48 h	Controle	t-test	0.011
Glândula digestiva	48 h	Hipóxia	t-test	0.011

Tabela 19: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para GSH

Tecido	Tempo	Tratamento	Teste	Valor de P
Brânquia	6 h	Controle	t-test	0.004
Brânquia	6 h	Hipóxia	t-test	0.004
Brânquia	12 h	Controle	t-test	0.220
Brânquia	12 h	Hipóxia	t-test	0.220
Brânquia	24 h	Controle	t-test	0.017
Brânquia	24 h	Hipóxia	t-test	0.017
Brânquia	48 h	Controle	t-test	0.021
Brânquia	48 h	Hipóxia	t-test	0.021
Glândula digestiva	6 h	Controle	Mann-Whitney test	0.003
Glândula digestiva	6 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.003
Glândula digestiva	12 h	Controle	Mann-Whitney test	0.027
Glândula digestiva	12 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.027
Glândula digestiva	24 h	Controle	Mann-Whitney test	0.050
Glândula digestiva	24 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.050
Glândula digestiva	48 h	Controle	t-test	0.002
Glândula digestiva	48 h	Hipóxia	t-test	0.002

Tabela 20: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para GST

Tecido	Tempo	Tratamento	Teste	Valor de P
Brânquia	6 h	Controle	Mann-Whitney test	0.083
Brânquia	6 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.083
Brânquia	12 h	Controle	t-test	0.209
Brânquia	12 h	Hipóxia	t-test	0.209
Brânquia	24 h	Controle	t-test	0.706
Brânquia	24 h	Hipóxia	t-test	0.706
Brânquia	48 h	Controle	t-test	0.354
Brânquia	48 h	Hipóxia	t-test	0.354
Glândula digestiva	6 h	Controle	Mann-Whitney test	0.105
Glândula digestiva	6 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.105
Glândula digestiva	12 h	Controle	Mann-Whitney test	1.000
Glândula digestiva	12 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	1.000
Glândula digestiva	24 h	Controle	t-test	0.584
Glândula digestiva	24 h	Hipóxia	t-test	0.584
Glândula digestiva	48 h	Controle	t-test	0.272
Glândula digestiva	48 h	Hipóxia	t-test	0.272

Tabela 21: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para MDA

Tecido	Tempo	Tratamento	Teste	Valor de P
Brânquia	6 h	Controle	Mann-Whitney test	0.328
Brânquia	6 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.328
Brânquia	12 h	Controle	t-test	0.742
Brânquia	12 h	Hipóxia	t-test	0.742
Brânquia	24 h	Controle	t-test	0.468
Brânquia	24 h	Hipóxia	t-test	0.468
Brânquia	48 h	Controle	t-test	0.483
Brânquia	48 h	Hipóxia	t-test	0.483
Glândula digestiva	6 h	Controle	t-test	0.024
Glândula digestiva	6 h	Hipóxia	t-test	0.024
Glândula digestiva	12 h	Controle	t-test	0.391
Glândula digestiva	12 h	Hipóxia	t-test	0.391
Glândula digestiva	24 h	Controle	t-test	0.892
Glândula digestiva	24 h	Hipóxia	t-test	0.892
Glândula digestiva	48 h	Controle	Mann-Whitney test	0.397
Glândula digestiva	48 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.397

Tabela 22: Valores dos testes estatísticos para o experimento de hipóxia para SOD

Tecido	Tempo	Tratamento	Teste	Valor de P
Brânquia	6 h	Controle	Mann-Whitney test	0.878
Brânquia	6 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.878
Brânquia	12 h	Controle	Mann-Whitney test	0.574
Brânquia	12 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.574
Brânquia	24 h	Controle	Mann-Whitney test	0.028
Brânquia	24 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.028
Brânquia	48 h	Controle	Mann-Whitney test	0.029
Brânquia	48 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.029
Glândula digestiva	6 h	Controle	Mann-Whitney test	0.959
Glândula digestiva	6 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.959
Glândula digestiva	12 h	Controle	Mann-Whitney test	0.001
Glândula digestiva	12 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.001
Glândula digestiva	24 h	Controle	t-test	0.655
Glândula digestiva	24 h	Hipóxia	t-test	0.655
Glândula digestiva	48 h	Controle	Mann-Whitney test	0.945
Glândula digestiva	48 h	Hipóxia	Mann-Whitney test	0.945