

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

TOXICIDADE AGUDA DO NITRITO EM ROBALO PEVA
(*Centropomus parallelus*)

ANDRESSA DE SOUSA LIMA RODRIGUES

VILA VELHA
SETEMBRO / 2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

TOXICIDADE AGUDA DO NITRITO EM ROBALO PEVA
(*Centropomus parallelus*)

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

ANDRESSA DE SOUSA LIMA RODRIGUES

VILA VELHA
SETEMBRO / 2016

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

R696t Rodrigues, Andressa de Sousa Lima.
Toxicidade aguda do nitrito em robalo peva (*Centropomus parallelus*). / Andressa de Sousa Lima Rodrigues. – 2017.
45 f.: il.

Orientador: Levy de Carvalho Gomes.
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) -
Universidade Vila Velha, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Robalo (Peixe). I. Gomes, Levy de Carvalho.
II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

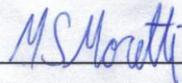
ANDRESSA DE SOUSA LIMA RODRIGUES

**TOXICIDADE AGUDA DO NITRITO EM ROBALO PEVA
(*Centropomus parallelus*)**

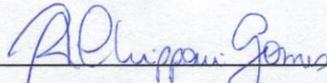
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 30 de setembro de 2016,

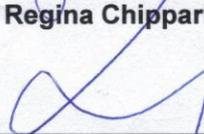
Banca Examinadora:



Dr. Marcelo da Silva Moretti – UVV



Dra. Adriana Regina Chippari Gomes – UVV



Dr. Levy de Carvalho Gomes – UVV

Orientador

Dedico aos meus filhos, Murilo e Davi,
que mesmo sem ter consciência, foram a razão para
eu ter persistido e chegado até aqui.

“A nossa recompensa está no esforço,
não no resultado. Um esforço total é uma vitória
completa.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Agradeço à DEUS, pela vida, pela saúde, pela oportunidade, pela benção de mais essa conquista em minha vida.

Ao Dr. Levy de Carvalho Gomes, meu orientador, pelo seu apoio, confiança, dedicação, por me ajudar a não desistir, pelos diálogos positivos, tranquilizadores e impulsionadores, pelos importantes ensinamentos durante todo esse período, por contribuir para o meu crescimento profissional, MUITO OBRIGADA!

À Dra. Adriana Regina Chippari Gomes, pelo incentivo, pelos conselhos e pela ajuda prestada durante toda a pesquisa.

Aos meus filhos, Murilo e Davi, por existirem e tornarem meus dias mais felizes, e por me transformarem em uma pessoa melhor, dando o melhor de mim! Vocês me inspiram a querer ser mais que fui até hoje! Amo muito vocês!

Ao meu esposo Rodrigo Zuque Rodrigues, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Agradeço aos meus pais, infinitamente, por sempre acreditarem em minha capacidade e me incentivarem a nunca deixar de estudar e buscar sempre o melhor. Meu pai se sentiria realizado se estivesse aqui participando deste momento...

À minha grande amiga Karla Giavarini Gnocchi, que me trouxe para o mestrado, minha companheira de sempre, esse trabalho também é seu, pois esteve presente em todas as etapas, sofremos, rimos e choramos juntas, obrigada por tudo.

À equipe do Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB-PEIXE), que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa, seja trabalhando efetivamente, virando a noite no laboratório ou com os momentos de descontração.

Ao meu diretor Tevanis da Penha Simões, por ter sido praticamente um pai, pela compreensão, apoio e confiança.

Agradeço à minha família a qual amo muito, pelo carinho, paciência, incentivo e apoio.

Aos amigos, por sempre compreenderem minhas ausências, e proferirem palavras de carinho e motivação.

Aos técnicos e alunos da Química e das Ciências Farmacêuticas pelos socorros intermináveis.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE EQUAÇÕES

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 – INTRODUÇÃO.....	3
2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 – Aclimação	10
3.2 - Experimento I	10
3.3 - Experimento II	11
3.4 - Análises laboratoriais	12
• Preparação dos tecidos.....	12
• Proteína total	12
• Análises de enzimas	12
A – Catalase	12
B - Glutathion S-Transferase	13
C - Glutathion Peroxidase	13
3.5 - Análises estatísticas	13
4. RESULTADOS	14
4.1 - Experimento I	14
• Fígado	14

• Brânquias	14
4.2 - Experimento II	15
• Fígado	15
• Brânquias	16
• 2ª etapa	17
5. DISCUSSÃO	21
5.1 - Experimento I	21
5.2 - Experimento II	22
6. CONCLUSÕES	26
7. REFERÊNCIAS	27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Centropomus parallelus* (Poey, 1860)8
- Figura 2** - Atividade das enzimas catalase, glutathione S-transferase e glutathione peroxidase em fígado de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 8), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 8), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 8). Os dados estão apresentados em Média \pm desvio padrão da média. Letras indicam que não há diferença significativa em relação as diferentes exposições13
- Figura 3** - Atividade das enzimas glutathione S-transferase e glutathione peroxidase em brânquia de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 8), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 8), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 8). Os dados estão apresentados em Média \pm desvio padrão da média. Letras indicam que há diferença significativa em relação as diferentes exposições14
- Figura 4** - Atividade da enzima catalase, glutathione S-transferase e glutathione peroxidase em fígado de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, e subsequente exposição a condição de hipóxia, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Os dados estão apresentados em Média \pm desvio padrão da média. Letras indicam que há diferença significativa em relação as diferentes exposições15
- Figura 5** - Atividade da enzima glutathione S-transferase e glutathione peroxidase em brânquia de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, e subsequente exposição a condição de hipóxia, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Os dados estão apresentados em Média \pm desvio padrão da média. Letras indicam que há diferença significativa em relação as diferentes exposições17
- Figura 6** - Concentração de oxigênio (mg/L) na perda de equilíbrio de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, e subsequente exposição a condição de hipóxia, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Os dados estão apresentados em Média \pm desvio padrão da média. Letras indicam que não há diferença significativa em relação as diferentes exposições18
- Figura 7** - Consumo de oxigênio dissolvido (mg/g*h) de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, e subsequente exposição a condição de hipóxia, a

três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Os dados estão apresentados em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras indicam que não há diferença significativa em relação as diferentes exposições19

Figura 8 - Batimentos operculares por minuto de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, durante exposição a condição de hipóxia, nos tratamentos 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6) e 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Linha de tendência mostra que há aumento dos batimentos operculares com a redução da concentração de oxigênio no aquário20

Figura 9 - Batimentos operculares por minuto em exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, nos três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6), e nas condições de normóxia e hipóxia em cada tratamento. Letras indicam que há diferença significativa entre os tratamentos de cada condição. * indicam que há diferença significativa nos mesmos tratamentos em condições diferentes21

LISTA DE EQUAÇÕES

- Equação 1** - Conversão do peróxido de hidrogênio em água realizado pela catalase6
- Equação 2** - Conjugação da GSH com o substrato eletrofilico tóxico pela ação GST6
- Equação 3** - Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da glutathione peroxidase7
- Equação 4** - Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da glutathione peroxidase7

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

GST - Glutathione S-Transferase

GPx – Glutathione peroxidase

RESUMO

RODRIGUES, ANDRESSA DE SOUSA LIMA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, setembro de 2016. **Toxicidade aguda do nitrito em robalo peva (*Centropomus parallelus*)**. Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

O nitrogênio é um elemento importante para a manutenção dos ecossistemas aquáticos, podendo se apresentar na forma de: nitrato, nitrogênio amoniacal e nitrito. O aumento da concentração do nitrito é um dos problemas encontrados no habitat de peixes, pois é reconhecido como tóxico podendo ocasionar perturbações fisiológicas, afetar o crescimento ou provocar mortalidade dos organismos. O objetivo desse estudo foi avaliar o estresse oxidativo e as respostas a hipóxia em *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de nitrito. Os organismos foram expostos a três diferentes tratamentos (0 - controle, 0,5 e 10 mg/L de nitrito). Como ferramenta de avaliação de toxicidade foram utilizadas análises enzimáticas, quantificação do consumo de oxigênio e contagem dos batimentos operculares em condições de normóxia (concentrações a partir de 3,01 mg/L de oxigênio dissolvido na água) e hipóxia (concentrações inferiores a 3mg/L). Os resultados observados foram de ausência de diferença significativa no fígado para as enzimas GST, CAT e GPx bem como na brânquia para GPx, sendo encontrada alteração nesse tecido para GST na concentração de 10mg/L no experimento I, sendo no segundo experimento observada alteração no fígado e brânquia para GST e CAT no fígado na mesma concentração, indicando que a exposição ao nitrito não gera ativação diferenciada no sistema de defesa do organismo pela produção de enzimas do estresse oxidativo, porém ao associar com a hipóxia, obteve-se um aumento significativo do grupo exposto a 10 mg/L de nitrito em relação ao controle, tanto para atividade enzimática quanto para o batimento opercular na condição de hipóxia.

Palavras chaves: peixe, estresse oxidativo, hipóxia, batimento opercular

ABSTRACT

RODRIGUES, ANDRESSA DE SOUSA LIMA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, august de 2016. **Acute toxicity of the nitrite in robalo peva (*Centropomus parallelus*)**. Advisor: Levy de Carvalho Gomes.

Nitrogen is an important element for the maintenance of the aquatic ecosystems, being able to present in the form of: nitrate, ammoniacal nitrogen and nitrite. Increased nitrite concentration is one of the problems encountered in fish habitat as it is recognized as toxic and may cause physiological disturbances, affect growth or cause mortality of organisms. The objective of this study was to evaluate oxidative stress and hypoxia responses in *Centropomus parallelus* exposed to different concentrations of nitrite. The organisms were exposed to three different treatments (0 - control, 0.5 and 10 mg / L nitrite). As a tool for assessing toxicity, enzymatic analyzes, quantification of oxygen consumption and opercular beats were used in conditions of normóxia (concentrations from 3.01 mg / L of dissolved oxygen in water) and hypoxia (concentrations below 3 mg / L). The results showed that there was no significant difference in the liver for the GST, CAT and GPx enzymes as well as in the gills for GPx. The tissue was altered for GST at the concentration of 10mg / L in the experiment I. Liver and gill for GST and CAT in the liver in the same concentration, indicating that the exposure to nitrite does not generate differentiated activation in the body's defense system by the production of oxidative stress enzymes, but when associated with hypoxia, a significant increase Of the group exposed to 10 mg / L of nitrite in relation to the control, for both enzymatic activity and opercular beating in the hypoxia condition.

Keywords: fish, nitrite, oxidative stress, hypoxia, opercular beat

1. INTRODUÇÃO

Atualmente temos nos confrontado com diversos problemas sócio-ambientais em decorrência do mau uso ou da má gestão dos recursos ambientais. Por isso é necessário o desenvolvimento de metodologias de diagnóstico, integrando o desenvolvimento, o manejo e o uso dos recursos hídricos, considerando não apenas as metodologias tradicionais, mas os aspectos biológicos do sistema (Buss, *et al*, 2003).

Para se fazer essas análises tem-se considerado a realização do biomonitoramento, que tem o potencial de avaliar os efeitos de substâncias químicas e misturas tóxicas sobre os organismos (Magalhães e Filho, 2008) potencialmente indicadores. Os testes ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores, que devido as suas características de pequeno limite de tolerância ecológica, a determinadas substâncias químicas, apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes (Magalhães e Filho, 2008).

A exposição a um agente tóxico pode ser aguda, quando a concentração letal do agente tóxico é liberada em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônica, quando o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em concentrações subletais, durante um longo período de tempo (Schvartsman, 1991).

Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas. Normalmente o efeito observado é a letalidade ou outra manifestação do organismo que a anteceda (Magalhães e Filho, 2008), como alterações enzimáticas ou comportamentais que podem impedir que o organismo realize suas funções no ecossistema. Esses testes também podem ser aplicados para avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos para um determinado agente tóxico isolado e as concentrações seguras de agentes químicos para preservação da vida aquática e do ambiente (Magalhães e Filho, 2008).

O uso das respostas desses organismos é a base dos índices biológicos, originando o que se chama de bioindicadores, que são espécies escolhidas por sua sensibilidade ou tolerância a vários parâmetros, como poluição orgânica ou outros tipos de poluentes (Buss, *et al.*, 2003), como o nitrito.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 - Nitrito

O nitrogênio é um elemento importante para a manutenção dos ecossistemas aquáticos, pois além de ser um dos compostos básicos que compõe a biomassa ele também atua na formação de proteínas e ácidos nucleicos. Esse elemento pode se apresentar no ecossistema aquático na forma de três diferentes compostos nitrogenados: nitrato, nitrogênio amoniacal e nitrito (Piedras *et al.*, 2006).

O nitrito é um composto intermediário resultante da nitrificação bacteriana da amônia a nitrato (Tsai & Chen, 2002). Ele pode ser tóxico, de acordo com a sua concentração e da fase de desenvolvimento dos organismos expostos (Thurston, 1980).

A presença do nitrito no ecossistema aquático pode estar relacionada a atividade biológica da biota sendo a excreção e a degradação dos restos alimentares as principais fontes dessas substâncias (Gross *et al.*, 2000). Em locais em que a proporção de matéria orgânica é mais elevada é possível que se encontre uma maior concentração desse elemento (Voslářová *et al.*, 2008). Sendo que em alguns locais sua concentração pode se apresentar inferior a $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ (Voslářová *et al.*, 2006).

Entretanto concentrações elevadas de nitrito podem ser encontradas em águas receptoras de efluentes nitrogenados, ambientes de hipóxia, efluentes industriais (Voslářová *et al.*, 2006), em sistemas fechados onde a água utilizada é recirculante (Doleželová *et al.*, 2011) ou com troca limitada (Zhang *et al.*, 2012).

O aumento na concentração desse composto é um dos problemas encontrados tanto em aquários quanto em fazendas de peixes (Voslářová *et al.*, 2006), pois o nitrito é reconhecido como tóxico podendo ocasionar perturbações fisiológicas, afetar o crescimento ou provocar mortalidade dos organismos cultivados (Campos *et al.*, 2012), entretanto diversos fatores podem afetar a toxicidade do nitrito podemos citar a salinidade da água como um deles, pois, esse parâmetro influencia, numa relação inversamente proporcional, o potencial tóxico desse composto no ambiente (Weirich *et al.*, 1993, Sampaio *et al.*, 2002).

Os problemas ocasionados pelo nitrito aos organismos aquáticos está relacionado ao fato desse composto ter uma alta afinidade por mecanismos de absorção presentes nas brânquias (Cl⁻), logo, toda vez que estiver presente no ecossistema aquático parte desse mecanismo de absorção será utilizado na captação do nitrito (Kroupova *et al.*, 2005).

Além disso, peixes expostos a concentrações elevadas de nitrito podem apresentar uma redução na concentração de hemoglobina, devido a sua transformação em meta-hemoglobina (Urrutia & Tomasso, 1987). Isto diminui a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos e, conseqüentemente, os peixes podem morrer por hipóxia, mesmo havendo oxigênio dissolvido em abundância na água (Sampaio *et al.*, 2006). Quando a meta-hemoglobina está elevada, deixa o sangue e as brânquias com coloração marrom (Doleželová *et al.*, 2011). Podem ocorrer também distúrbios reprodutivos e hepatotoxicidade (El-Sheikh & Khalil, 2011) que são considerados biomarcadores.

Os biomarcadores podem ajudar no conhecimento dos limites de tolerância de uma espécie em relação à qualidade da água pois, o conhecimento desses limites são requisitos indispensáveis em qualquer sistema de criação (Campos *et al.*, 2012), para tal objetivo são realizados testes de toxicidade.

Várias espécies tem sido empregadas em testes de toxicidade, gerando subsídios para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de agentes tóxicos (Magalhães & Ferrão Filho, 2008). Dentre os indivíduos usados como bioindicadores, podemos citar os peixes, a utilização desses organismos se deve ao fato de ocuparem uma gama de níveis tróficos e por possuírem uma habilidade conhecida de concentrar poluentes (Monroy *et al.*, 2014). O *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), é um espécie de peixe que se aplica para tal uso. Essa espécie utiliza os rios e estuários durante todas as fases do seu ciclo de vida em busca de boa qualidade ambiental e disponibilidade de alimento (Bittencourt, 2009).

2.2 - Hipóxia

Hipóxia, segundo Pollock *et al.* (2007), é definida como o nível de oxigênio dissolvido na água capaz de causar alterações fisiológicas ou comportamentais em um organismo. Estudos realizados por Diaz & Rosenberg

(2008), indicam que a concentração considerada ideal para a maioria dos peixes oscila entre 5 e 6 mg/L de oxigênio dissolvido, sendo que abaixo de 3 mg/L o ambiente já torna-se estressante e a partir desse ponto considera-se a hipóxia, e níveis inferiores a 0,5 mg/L caracterizam o ambiente em anóxia, sendo letal para a maioria das espécies.

A concentração de oxigênio dissolvido na água é influenciada pela temperatura, profundidade, salinidade e eutrofização. Níveis baixos de oxigênio no ecossistema aquático podem interferir diretamente no crescimento e na reprodução de algumas espécies de peixes, além disso, em situações mais severas pode causar a mortalidade dos organismos. Entretanto, dependendo da duração, intensidade e tempo de exposição à hipóxia, os peixes podem exibir ajustes comportamentais, morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (Martínez et al., 2011). Nos peixes, hipóxia é considerada uma alteração fisiológica ambientalmente relevante, pois pode atuar na distribuição ecológica de uma espécie (Fu et al., 2011).

O metabolismo aeróbico dos organismos aquáticos também pode ser limitado pela entrada de oxigênio pelas brânquias, pelo transporte O₂ pelo sangue entre outros. Além disso, no ambiente os níveis de oxigênio podem oscilar fazendo com que a quantidade disponível para os organismos aquáticos realizem seus processos respiratórios sejam reduzidas (Chippari-Gomes et al., 2005).

A identificação das alterações fisiológicas ocasionadas pelo efeito da hipóxia é uma área de interesse em pesquisas, pois, a sua ocorrência no ecossistema tem se tornado frequente isso ocorre em função das atividades antrópicas como, por exemplo, o despejo de efluentes industriais (Speers-Roesch et al., 2011). Entretanto, existem espécies que apresentam adaptações a essa condição ambiental. A adaptação à hipóxia ocorre através da modulação de genes fisiologicamente relevantes algumas espécies de peixes são consideradas tolerantes a hipóxia (Almeida-Val et al., 2011).

2.3 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

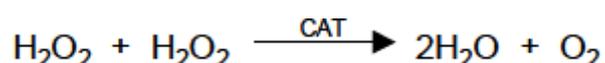
São considerados biomarcadores alterações morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas que possam avaliar a intensidade da exposição a um agente tóxico e o risco oferecido por ele para os organismos expostos a suas diferentes

concentrações (Beliaeff e Burgeot, 2001). Dentre os biomarcadores utilizados podemos citar as respostas bioquímicas.

Os biomarcadores bioquímicos são amplamente reportados na literatura (Fatima *et al.*, 2015; Fernández-Iglesias *et al.*, 2014; Qu *et al.*, 2014; Vasykiv *et al.*, 2011), esses biomarcadores nos possibilitam avaliar o quanto substâncias potencialmente tóxicas, como o nitrito, podem afetar a biota, pois essas substâncias presentes no ecossistema podem ocasionar a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS), ativando o sistema de defesa antioxidante dos indivíduos expostos (Vasykiv *et al.*, 2011). Contudo, o sistema antioxidante elimina essas espécies reativas de oxigênio para prevenir o estresse oxidativo (Paulino *et al.*, 2012).

O sistema de defesa antioxidante é formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos. Sendo que dentre as enzimas que são responsáveis pela desintoxicação podemos citar a catalase (CAT) a glutatona s-transferase (GST) e a glutatona peroxidase (GPx) (Qu *et al.*, 2014).

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é considerada uma linha primária de defesa antioxidante, essa enzima atua catalisando a transformação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em moléculas de água e oxigênio (Equação 1), além disso, a atividade da catalase é considerada um biomarcador sensível sendo utilizada como importante ferramenta para avaliação de alterações bioquímicas (Atli *et al.*, 2006).



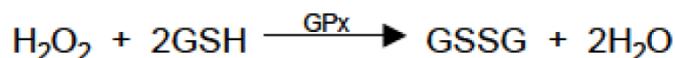
Equação 1. Conversão do peróxido de hidrogênio em água realizado pela catalase.

A glutatona s-transferase (GST) é uma enzima de fase II que atua catalisando a conjugação da glutatona reduzida (GSH) a compostos alquilantes (Equação 2), tornando os produtos resultantes dessa catalise mais solúveis e sendo excretados por transportadores de membrana (Cárcamo *et al.*, 2014).



Equação 2. Conjugação da GSH com o substrato eletrofílico tóxico pela ação GST.

A glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9), é uma importante enzima antioxidante que atua reduzindo H₂O₂ e outros peróxidos à água ou álcool (Equação 3 e 4) (Vasconcelos *et al*, 2007).



Equação 3. Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da glutathione peroxidase.



Equação 4. Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da glutathione peroxidase.

2.4 - *Centropomus parallelus*

Os robalos (gênero *Centropomus*) são peixes que têm ampla distribuição geográfica e ocorrem em toda a costa brasileira. O *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), é também conhecido popularmente como robalo peba ou peva, é abundante na foz de muitos rios. São peixes marinhos e costeiros que utilizam os rios e estuários durante todas as fases do seu ciclo de vida em busca de boa qualidade ambiental e disponibilidade de alimento (Bittencourt, 2009).

Segundo Cerqueira (2002), o robalo peva é um peixe com a carne muito apreciada e de alto valor comercial, tendo uma grande importância social, pois sua captura é proveniente basicamente da pesca artesanal, que é responsável por cerca de metade da produção nacional dos peixes (Begossi, 2008).

Em virtude do alto valor econômico e da qualidade de sua carne, esse recurso tem sofrido uma grande exploração. Segundo os estudos realizados por Barroso (2007), os mesmos já apontavam para uma redução do estoque e do tamanho dos robalos nas capturas. Então, a partir desse dado, surge a necessidade de se proteger o estoque natural da espécie, para tentar evitar um futuro processo de extinção em decorrência da exploração desordenada da sua pesca.



Figura 1. *Centropomus parallelus* (Poey, 1860). Fonte: <http://peixesdesportivosdomundo.blogspot.com.br/2012/03/o-camurim-obeso-centropomus-parallelus.html>

O *Centropomus parallelus* ocupa a seguinte posição sistemática:

CLASSE: Actinopterygii

ORDEM: Perciformes

FAMÍLIA: Centropomidae

GÊNERO: *Centropomus*

ESPÉCIE: *Centropomus parallelus*

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil metabólico e comportamental de exemplares de *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações de nitrito, analisando o estresse oxidativo e avaliando o efeito do nitrito no comportamento respiratório em situação de hipóxia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Aclimação dos peixes

Foram utilizados 43 exemplares de *Centropomus parallelus* ($32,71 \pm 8,90$ g/ $16,20 \pm 1,40$ cm) obtidos de uma piscicultura localizada em São Mateus, ES. Os peixes foram transferidos para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab-Peixe/UVV), onde foram aclimatados por 30 dias em dois tanques de polietileno com capacidade de 310 L, sendo dotados de aeração constante, e de um sistema de filtração mecânico e biológico com capacidade de filtrar toda a água quatro vezes por hora.

Esses tanques foram mantidos com fotoperíodo natural (12 h:12 h), densidade aproximada de 1 peixe/14 L e água salobra (salinidade 5), que foi produzida utilizando água salgada coletada na praia de Itapuã-ES e água doce proveniente do sistema comum de abastecimento.

Ao longo do período de aclimação os indivíduos foram alimentados à vontade duas vezes ao dia com ração comercial com 45% de proteína bruta. Além disso, os tanques foram sifonados diariamente para que fossem retirados os dejetos que se depositaram no fundo e a cada semana foi realizada a troca parcial da água, equivalente a 70% de sua capacidade.

3.2 - Experimento I

Após o período de aclimação os peixes foram transferidos individualmente para 24 aquários de vidro contendo 15 L de água salobra. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 8 repetições cada. Foram testadas 3 concentrações de nitrito na água: 0, 0,5 e 10 mg/L ($0,28 \pm 0,08$ mg/L, $0,48 \pm 0,04$ mg/L, $18,88 \pm 2,62$ mg/L concentrações medidas), essas concentrações foram obtidas adicionando NaNO_2 (Vetec COD 000765.08) na água. Foram utilizados 24 peixes no experimento sendo o tempo de exposição de 96 h. Após esse período os peixes foram anestesiados com uma concentração letal de benzocaína (200 mg/L) e os tecidos (fígado e brânquias) foram extraídos, acondicionados em microtubos e armazenados em freezer - 80 °C para

posteriormente se rem realizadas as análises de enzimas do estresse oxidativo (GST, CAT e GPX).

3.3 - Experimento II

Após o período de aclimação os peixes foram transferidos para aquários individuais de vidro contendo 15 L de água salobra, e submetidos aos mesmos procedimentos realizados no experimento 1. O experimento foi montado com 3 tratamentos e 6 repetições cada. Foram testadas 3 concentrações de nitrito na água: 0, 0,5 e 10 mg/L (0,06 ±0,03 mg/L, 0,89 ±0,34 mg/L, 18,92 ±2,44 mg/L concentrações medidas), que foram obtidas adicionando NaNO₂ (Vetec COD 000765.08) na água. Foram utilizados 18 peixes com tempo de exposição de 96 h.

Em seguida foi retirada a oxigenação dos aquários e a sua superfície foi tampada para evitar a troca gasosa. Com isso, os peixes consumiram gradativamente o oxigênio sendo expostos a uma situação de hipóxia gradativa que terminou com a perda do equilíbrio do animal. Durante esse período foi analisado o consumo de oxigênio, o batimento opercular e ainda foi avaliada a concentração de oxigênio que levou o peixe à perda de equilíbrio. Para a medida de consumo de oxigênio, a cada 30 minutos foi inserido, em uma pequena abertura na tampa do aquário, um multiparâmetro YSI 85 e foi registrado o valor do oxigênio dissolvido. Essa medida foi realizada até que acontecesse o tombamento do animal, onde também foi quantificada a concentração de oxigênio. Para a medida do batimento opercular, a cada 30 minutos, contou-se o número de vezes que o opérculo do peixe se abria durante 1 minuto.

Para comparação entre consumo e batimento opercular nas diferentes situações de concentração (normais ou baixas) do oxigênio dissolvido na água do aquário, considerou-se hipóxia as concentrações inferiores a 3mg/L de oxigênio dissolvido na água, e normóxia como sendo as medições acima de 3,01mg/L de oxigênio dissolvido na água com base nas definições de hipóxia propostas por Pollock *et al.* (2007) e Diaz & Rosenberg (2008).

Após esse período os peixes foram anestesiados com uma concentração letal de benzocaína (200 mg/L) e os tecidos (fígado e brânquias) foram extraídos, acondicionados em microtubos e armazenados em freezer - 80 °C para

posteriormente serem realizadas as análises de enzimas do estresse oxidativo (GST, CAT e GPX).

3.4 - Análises laboratoriais

- Preparação dos tecidos

Depois de descongelados, os tecidos (fígado e brânquias) foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 7,0) com homogeneizador automático (Ultra stirrer mod. ultra 80) em gelo fundente e centrifugados durante 30 minutos a 13.000g em centrífuga (Eppendorf 5417R) a 4°C. Os ensaios enzimáticos foram feitos com o extrato (porção sobrenadante) a 25°C.

- Proteína total

As concentrações de proteína dos extratos dos tecido analisados (fígado e brânquia) foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 595 nm, em um espectrofotômetro de leitor de placa (Molecular Device), usando albumina sérica bovina como padrão. Os ensaios foram feitos em duplicata.

- Análise de enzimas

A. CATALASE (CAT; E.C. 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em 240 nm (Aebi, 1984). Para isso, foi usado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio 10 mM e tampão TE (Tris HCL 1M e EDTA 5 mM), as amostras foram diluídas 100x no tampão TE. Para leitura, 10µl do homogeneizado foi adicionado a uma cubeta de quartzo contendo 900µl de tampão de reação, para leitura da absorbância ($\lambda = 240$ nm) no espectrofotômetro. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ metabolizado $\text{min}^{-1}\text{mg prote\u00edna}^{-1}$.

B. GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST; E.C. 2.5.1.18)

A atividade da GST foi determinada utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1mM GSH e 1mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância ($\lambda = 340 \text{ nm}$) em um leitor de placa (Molecular Device). A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDBN (Habig *et al.*, 1974; Habig & Jakoby, 1981). A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 μmol de produto por minuto por miligrama de proteína.

C. GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX; EC 1.11.1.9)

A atividade da GPx foi determinada utilizando método descrito por Hopkins & Tudhope (1973) a qual utilizou solução de azida sódica 5 mM, solução de GR 50 U e meio de reação. A atividade cinética da GPx foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 340 nm, em um leitor de placa (Molecular Devices plus). A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de redução do NADPH.

3.5 - Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e testados quanto a normalidade. Os resultados obtidos para as análises foram comparados entre os tratamentos, e suas diferenças detectadas por meio de uma análise de variância (ANOVA) one-way, seguida pelo teste de Tukey, exceto para consumo de oxigênio, onde os dados não apresentaram distribuição normal, e por isso foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis Anova. Para a realização das análises foi utilizado o software Sigma Plot. Diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 - Experimento I

- Fígado

Após o período experimental de exposição ao contaminante por 96h, os resultados obtidos no presente estudo, demonstram que não foram observadas diferenças significativas na atividade das enzimas CAT, GST e GPx no tecido hepático dos peixes expostos aos três tratamentos (Figura 2).

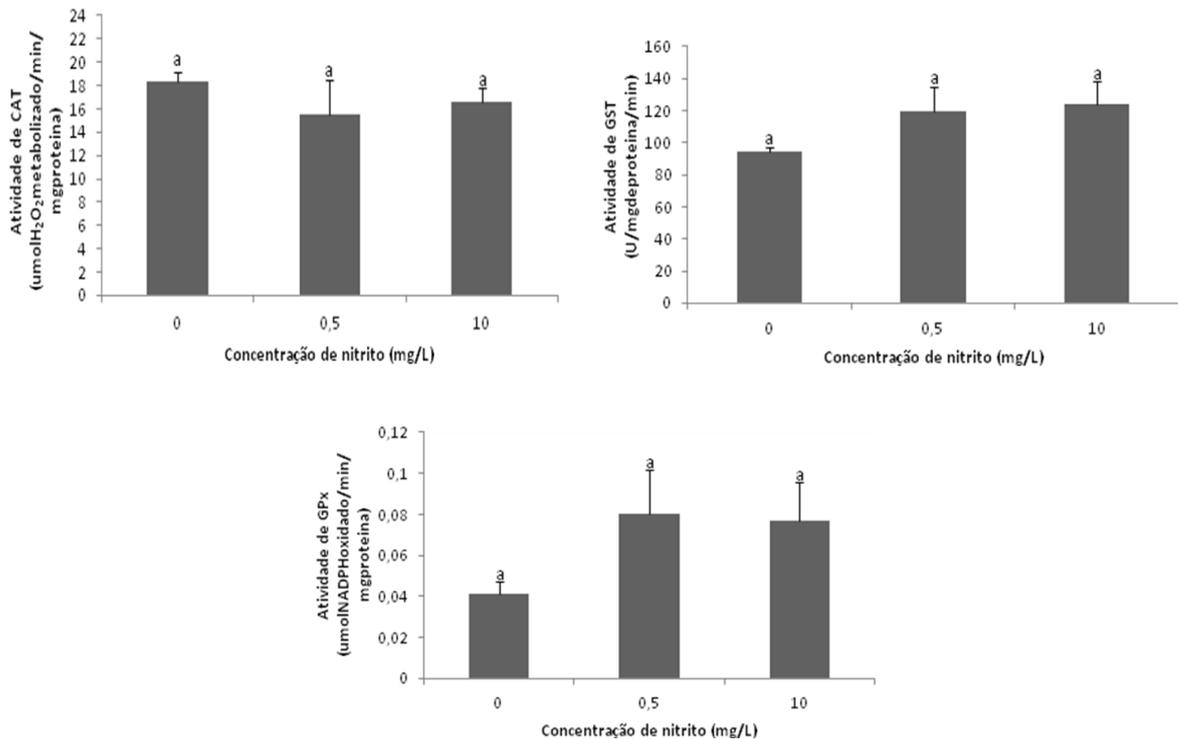


Figura 2 - Atividade das enzimas catalase, glutiona S-transferase e glutiona peroxidase em fígado de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 8), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 8), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 8). Os dados estão apresentados em Média ± desvio padrão da média. Letras indicam que não há diferença significativa em relação as diferentes exposições.

- Brânquias

No experimento realizado, observou-se que ocorreu uma diminuição significativa da atividade da enzima GST no tratamento de concentração 10 em relação ao grupo controle, no entanto o grupo de concentração 0,5 não diferiu significativamente de nenhum dos tratamentos. Podemos observar também uma tendência ao declínio nas médias, apesar de os dados não apresentarem diferença

significativa comparando-se os três tratamentos para atividade da enzima GPx (Figura 3).

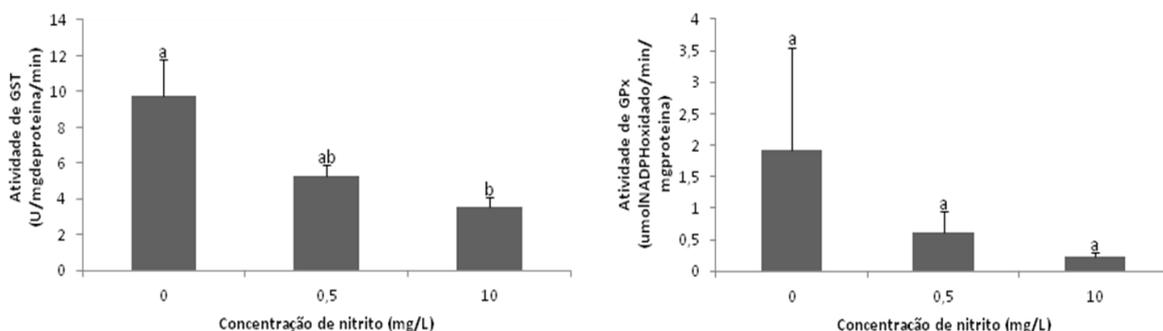
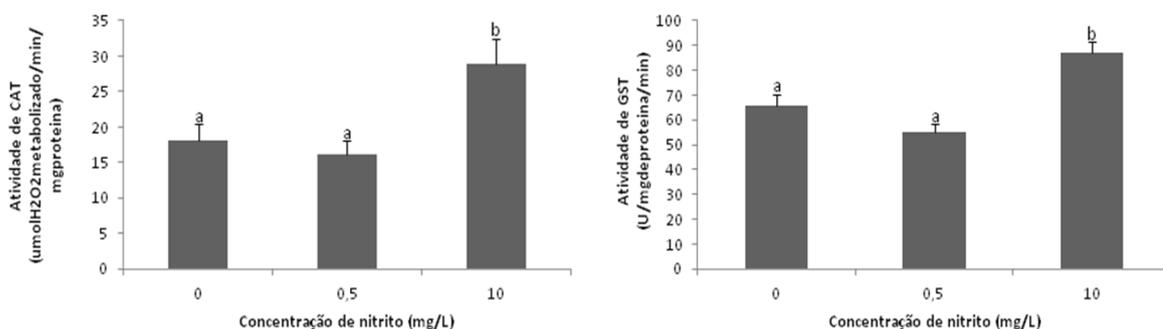


Figura 3 - Atividade das enzimas glutiona S-transferase e glutiona peroxidase em brânquia de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 8), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 8), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 8). Os dados estão apresentados em Média \pm desvio padrão da média. Letras indicam que há diferença significativa em relação as diferentes exposições.

4.2 - Experimento II

- Fígado

Após a exposição ao contaminante por 96h e submissão à hipóxia gradativamente, observou-se que as atividades de CAT e GST mostraram-se significativamente maiores no tratamento 10 quando se comparou ao grupo controle, bem como com o tratamento de concentração 0,5. Já para atividade da enzima GPx, não houve diferença significativa entre os grupos teste (Figura 4).



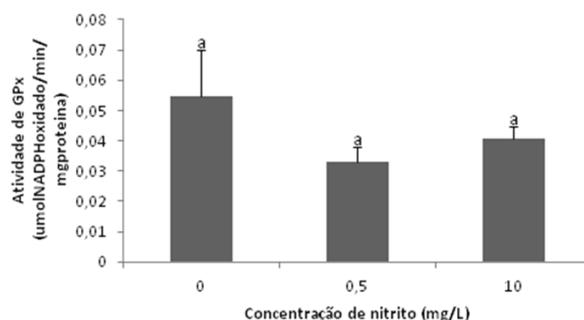


Figura 4 - Atividade das enzimas catalase, glutiona S-transferase e glutiona peroxidase em fígado de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, e subsequente exposição a condição de hipóxia, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Os dados estão apresentados em Média \pm desvio padrão da média. Letras indicam que há diferença significativa em relação as diferentes exposições.

- Brânquias

Neste estudo, o aumento de atividade enzimática no tecido branquial, pode ser observado para a expressão da GST no tratamento 10 quando se comparou com o controle, porém não houve diferença entre o grupo de concentração 0,5 com os demais grupos. Não ocorreu alteração significativa para a atividade da GPx, apesar de nos valores das médias ser visível um forte declínio dessa atividade (Figura 5).

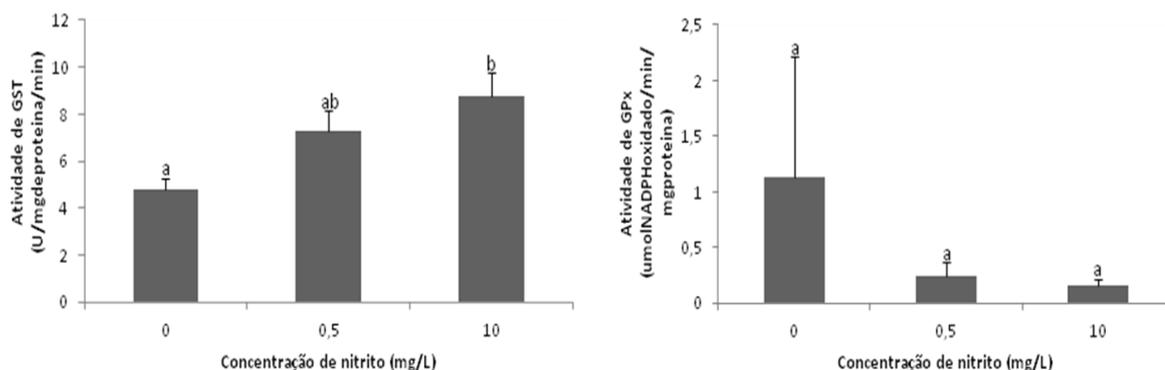


Figura 5 - Atividade das enzimas glutiona S-transferase e glutiona peroxidase em brânquia de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, e subsequente exposição a condição de hipóxia, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Os dados estão apresentados em Média \pm desvio padrão da média. Letras indicam que há diferença significativa em relação as diferentes exposições.

- 2ª etapa

Na segunda etapa deste experimento, onde foram analisados os comportamentos de batimento opercular, consumo de oxigênio e perda de equilíbrio, observou-se que não houve diferença significativa na concentração de oxigênio na perda de equilíbrio entre os 3 tratamentos, ficando com a média de concentração de oxigênio entre 1 e 1,5mg/L (Figura 6).

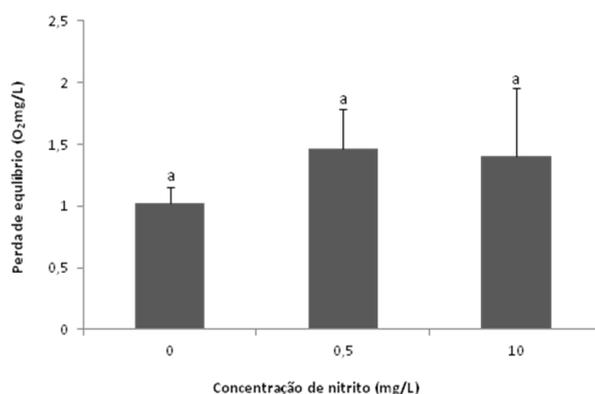


Figura 6 - Concentração de oxigênio (mg/L) na perda de equilíbrio de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, e subsequente exposição a condição de hipóxia, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Os dados estão apresentados em Média \pm desvio padrão da média. Letras indicam que não há diferença significativa em relação as diferentes exposições.

No que diz respeito ao consumo, os dados não apresentaram distribuição normal e os valores das medianas indicam que não há diferença significativa para cada condição entre os tratamentos, porém há uma redução significativa quando se comparou o mesmo tratamento nas condições de normóxia e hipóxia (Figura 7).

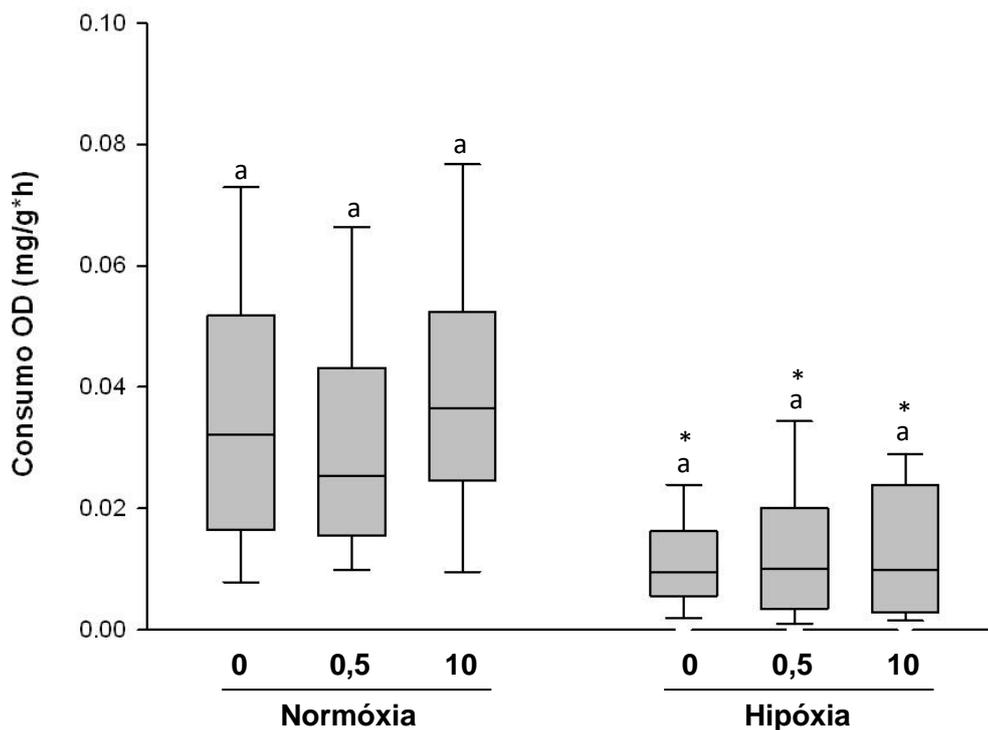


Figura 7 – Consumo de oxigênio dissolvido (mg/g*h) de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, e subsequente exposição a condição de hipóxia, a três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Os dados estão apresentados em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras indicam que não há diferença significativa em relação as diferentes exposições. * indicam que há diferença significativa nos mesmos tratamentos em condições diferentes.

Analisando os dados obtidos sobre batimento opercular, observou-se que em todos os tratamentos ocorreu aumento na quantidade de batimentos operculares por minuto com a diminuição da concentração de oxigênio, sendo essa relação mais acentuada quando há maior concentração de nitrito (Figura 8).

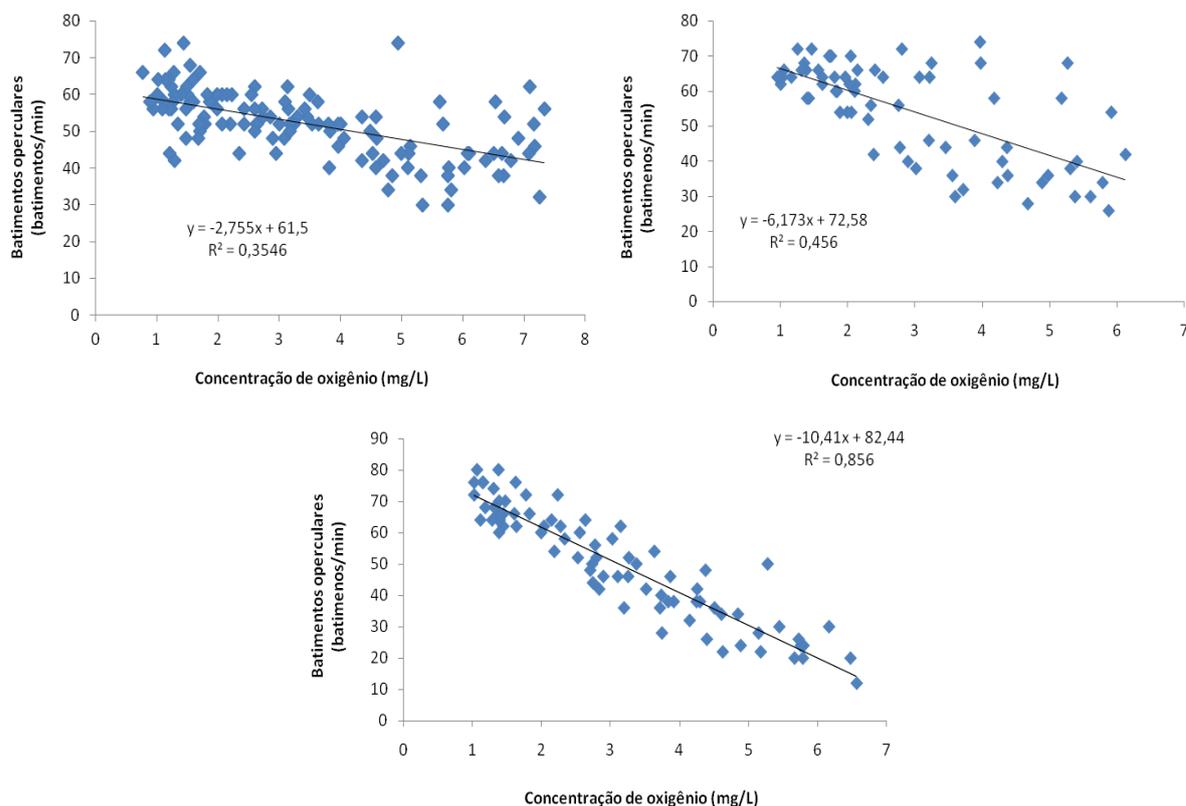


Figura 8 – Batimentos operculares por minuto de exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, durante exposição a condição de hipóxia, nos tratamentos 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6) e 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6). Linha de tendência mostra que há aumento dos batimentos operculares com a redução da concentração de oxigênio no aquário.

Ao realizar a comparação entre os batimentos operculares na condição de normóxia entre os 3 tratamentos, foi encontrada redução de batimentos no tratamento 10, sendo ele significativamente diferente dos tratamentos 0 e 0,5. Já quando a análise foi realizada na condição de hipóxia, os batimentos operculares foram significativamente maiores para as duas concentrações usadas de nitrito (0,5 e 10 mg/L). Relacionando cada tratamento nas duas condições, observa-se que sempre ocorre aumento significativo do batimento opercular (Figura 9).

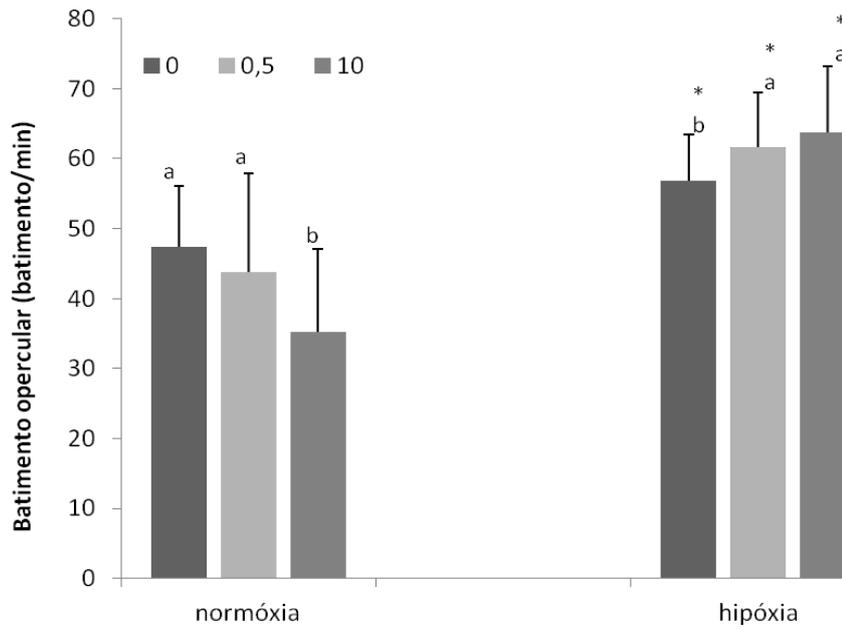


Figura 9 – Batimentos operculares por minuto em exemplares de *Centropomus parallelus* após exposição, de 96 horas, nos três tratamentos: 0 (Controle, n = 7), 0,5 (Concentração de 0,5 mg/L de nitrito, n = 6), 10 (Concentração de 10 mg/L de nitrito, n = 6), e nas condições de normóxia e hipóxia em cada tratamento. Letras indicam que há diferença significativa entre os tratamentos de cada condição. * indicam que há diferença significativa nos mesmos tratamentos em condições diferentes.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Experimento I

No presente estudo, não foi observada nenhuma alteração significativa nos valores da atividade da CAT, GST e GPx, entre os três tratamentos ao fim da exposição de 96 horas ao contaminante no tecido hepático, que Segundo Atli & Canli (2010) tem sido o tecido preferido para estudos das enzimas de estresse oxidativo por ser um dos órgãos mais afetados pelos contaminantes, apresentando elevadas taxas de atividade das enzimas antioxidantes sendo assim o principal órgão desintoxicador do organismo.

A CAT é uma das enzimas que avaliam o estresse oxidativo, atuando no sistema de defesa do organismo, removendo o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) produzido durante a biotransformação dos xenobióticos e metabolizando-o em O_2 e água (Van der Oost *et al.*, 2003). E acompanhada da ação da GST elas desempenham um papel importante na desintoxicação celular, assim as enzimas protegem as células contra substâncias tóxicas, neutralizando-as e tornando seu produto solúvel em água (Ezemonye & Tongo, 2010; Simonato *et al.*, 2008).

Esses resultados indicam que a contaminação do meio por nitrito não ativa o sistema de desintoxicação das células hepáticas de maneira diferenciada, independente da concentração a que o organismo foi exposto. Simonato *et al* (2008) sugere que a exposição por curtos períodos a diferentes contaminantes não são suficientes para detectar alterações significativas na atividade da GST, sendo necessária uma exposição mais prolongada como seu trabalho realizado com a espécie *Prochilodus lineatus*, no qual foi observado aumento significativo da atividade desta enzima, após 15 dias de exposição ao contaminante, que foi a fração solúvel do óleo diesel. Esses resultados também indicam a possibilidade de que a espécie tenha usado outra via para se desintoxicar da contaminação por nitrito que não seja a produção de enzimas antioxidantes.

As brânquias desempenham papel fundamental para as trocas gasosas e regulação osmótica, atuando de maneira variada, sendo o primeiro contato do animal com as substâncias do ambiente (Paulino *et al.*, 2012), reagindo a condições ambientais desfavoráveis, pois alterações branquiais podem afetar diretamente a

respiração e osmorregulação (Martinez *et al.*, 2006). É através das brânquias que o nitrito do ambiente entra na corrente sanguínea dos peixes (Hvas *et al.*, 2016), por isso sua análise também apresenta relevância. No presente estudo, para GST houve decréscimo significativo na atividade enzimática, enquanto para GPx ocorreu um forte declínio, porém sem diferença significativa, dados que são contrários aos apresentados por Paulino *et al.* (2012), em estudo com *Prochilodus lineatus*, onde ele observou que a exposição aguda ao contaminante atrazina não alterou significativamente as atividades de GST, CAT ou GPx nas brânquias. Uma hipótese que justifica isso é a postulada por Jin *et al.* (2010) que diz que as células branquiais são capazes de resistir às modificações oxidativas ou porque fazem rápida transferência de moléculas do contaminante das brânquias para o sangue durante a exposição aguda, reduzindo seus efeitos deletérios. Outra hipótese é a de Paulino *et al.* (2012), propondo que a ausência da atividade de uma enzima pode ser explicada pelo aumento da atividade de outras enzimas ou por outras formas de defesa do organismo, o que vai de encontro com os resultados obtidos nesse estudo, onde apenas a GST apresentou um declínio na sua atividade nos peixes expostos a 10 mg/L de nitrito.

Outro estudo em que resultados se apresentam de forma semelhante é o de Ribeiro *et al.* (2014), que ao quantificar a enzima Na^+/K^+ -ATPase, também não encontrou diferença significativa, embora seus dados exibissem uma tendência para o declínio em todos os períodos experimentais. Ele encontrou inibição enzimática com períodos curtos de exposição, mas que ilustra a interferência do contaminante, indicando que o mesmo leva algum tempo para começar a agir, e que o animal recorre também a outros ajustes para corrigir o problema. Como o principal órgão desintoxicador do organismo é o fígado (Van der Oost *et al.*, 2003), pode ter ocorrido um esforço metabólico maior nesse órgão, desfavorecendo o gasto energético com a produção da enzima nas brânquias.

5.2- Experimento II

No segundo experimento, a exposição aguda ao nitrito associado à situação de hipóxia, mostrou um acréscimo significativo na atividade enzimática de CAT e GST no desenvolvimento do *Centropomus parallelus*, obtendo-se valores mais elevados nos peixes expostos a 10 mg/L de nitrito, indicando uma reação de defesa do

organismo em relação ao estresse oxidativo gerado em decorrência das exposições, ativando o sistema de desintoxicação das células, apesar da atividade da GPx continuar se mantendo em redução, porém sem diferença significativa.

Comparando-se as atividades das enzimas CAT e GST no fígado no dois experimentos, os resultados demonstraram que somente a exposição ao nitrito não induziu à alterações necessárias para afetar a expressão das mesmas de maneira significativa, porém, ao associar a exposição com a situação de hipóxia, foi proporcionado um aumento no sistema de defesa com maior atividade dessas enzimas na tentativa de desintoxicar o organismo.

Já em relação a GPx, os dados continuam semelhantes ao primeiro experimento, e Paulino *et al.* (2012) diz que a diminuição mais acentuada na ativação da GPx pode acontecer em virtude da desintoxicação ter acontecido preferencialmente através de conjugação da substância com a enzima GST. E para corroborar com esse resultado, ainda temos os resultados obtidos por Jin *et al.* (2010) que ao trabalhar com *Lepomis macrochirus* exposto a atrazina, também encontrou diminuição da atividade de GPx no fígado.

Fitzgibbon *et al.* (2007) diz que na maioria das espécies a hipóxia pode causar a morte, entretanto é mais comum a ocorrência de efeitos sub-letais como alterações nos processos fisiológicos, como foi aqui observado, onde houve aumento das atividades de enzimas responsáveis pela desintoxicação das células, podendo assim promover um controle do estresse oxidativo que está sendo gerado pela mudança do meio. Assim como encontrado por Hegazi *et al.* (2010) ao estudar a exposição à amônia em *Oreochromis niloticus*, as atividades de CAT e GST desse estudo, aumentaram significativamente no tratamento de concentração mais elevada.

Assim como no fígado, a atividade de GST nas brânquias apresentou diferença significativa, porém esse incremento não foi observado para a enzima GPx. Hvas (2016) ao estudar *Pangasianodon hypophthalmus*, diz que os peixes são capazes de remodelar rapidamente sua estrutura branquial, podendo até reduzir a captação de nitrito do meio, a fim de lidar com as condições aquáticas alteradas, tais como a hipóxia. Nessa situação ocorre diminuição da quantidade de O₂ disponível, e conseqüentemente há aumento da concentração de CO₂ no sangue, que fica ligado na hemoglobina, impedindo a entrada do NO₂⁻ que também precisa se ligar na

hemoglobina para ser transportado na corrente sanguínea do peixe. Como está ocorrendo diminuição na entrada do contaminante, isso pode também estar levando a redução da atividade da GPx nas brânquias, como observado neste estudo.

Pode-se dizer que as enzimas antioxidantes CAT e GST forneceram a primeira linha de defesa celular contra os radicais livres tóxicos originados do estresse oxidativo gerado pela exposição ao contaminante (Hegazi *et al.*, 2010) associado a hipóxia.

Tratando-se dos dados referentes ao comportamento ecológico apresentado em decorrência da exposição à situação de hipóxia gradativa, nesse estudo obteve-se que a redução da concentração do gás oxigênio no meio, provocou a perda de equilíbrio do peixe, mas observou-se que esse fato independe da exposição ao contaminante, pois sendo o oxigênio um dos fatores mais limitantes do meio aquático e sua disponibilidade no meio ser essencial para os organismos aquáticos, ele pode influenciar sua ecologia, comportamento e fisiologia (Martinez, 2011).

É notável um declínio no consumo do oxigênio dissolvido na condição de hipóxia, porém não há diferença significativa nessa queda. O metabolismo do animal tem a habilidade de manter a captação de oxigênio, mesmo ele estando em baixa concentração no ambiente. Essa captação acontece de maneira diferenciada, reduzida, proporcional a quantidade de oxigênio disponível no meio (Speers-Roesch *et al.*, 2012).

De acordo com (Mark *et al.* (2002) em condições de normóxia, o custo das ações vitais aumenta exponencialmente o consumo de oxigênio em estudos sobre peixes, e que a frequência de batimentos operculares pode ser menor em condições de normóxia em várias espécies. Entretanto, mesmo que a frequência de respiração seja menor, a pressão de oxigênio arterial é reduzida em relação à pressão de oxigênio do meio devido ao aumento de sua disponibilidade. Já em hipóxia, ocorre o inverso, como a disponibilidade de oxigênio está baixa, há um aumento na frequência de batimentos operculares, que passa a funcionar como se fosse um mecanismo de compensação, para tentar absorver uma maior quantidade de oxigênio e assim manter suas funções vitais. Esse mecanismo também é intensificado com o aumento da concentração de nitrito, pois ele afeta o transporte de oxigênio pela hemoglobina, sendo necessário aumentar o suporte desse nutriente a fim de garantir a sobrevivência do animal.

Além disso, peixes são sensíveis às mudanças, mesmo em baixos níveis de poluição e podem apresentar alterações em suas respostas bioquímicas e comportamentais quando são expostos a contaminantes, assim como foi observado neste estudo.

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados demonstra que o *Centropomus parallelus* apresentou baixa sensibilidade à exposição ao nitrito nas duas concentrações analisadas (0,5mg/L e 10(mg/L), não interferindo na concentração de oxigênio da perda de equilíbrio nem na taxa de consumo de oxigênio, somente na exposição de 10mg/L de nitrito que observou-se diminuição do batimento opercular em normóxia, porém quando a exposição foi associada à condição de hipóxia, ocorreu um aumento nessa sensibilidade.

Pode-se levantar a hipótese que a exposição a longo prazo e com menores intervalos de concentrações do contaminante poderiam intensificar essas respostas. Diante disso, pode-se concluir que a nas concentrações de 0,5mg/L e 10mg/L não foram eficientes em detectar danos após 96h de exposição ao nitrito.

7. REFERÊNCIAS

A norma utilizada para apresentar as referências é a da Revista Neotropical Ichthyology.

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126.
- Almeida-Val, V. M. F., A. R. Oliveira, M. de N. P. da Silva, M. S. Ferreira-Nozawa, R. M. Araújo, A. L. Val & S. R. Nozawa. 2011. Anoxia-and hypoxia-induced expression of LDH-A* in the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinis*. *Genetics and Molecular Biology*, 34(2): 315–322.
- Atli, G., Ö. Alptekin, S. Tükel & M. Canli. 2006. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 143: 218–224.
- Atli, G. & M. Canli. 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1884-1889.
- Barroso, M. V., G. A. P. Souza, E. F. Sales, J. N. Durão, J. C. A. Thomé, J. Leite, O. Nilamon, L. M. P. Moreira & C. Sangalia. 2007. Estratégias de Conservação das Populações de Robalos *Centropomus spp.* na Foz do Rio Doce, Linhares/ES, Brasil. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 2: 1465-1468.
- Begossi, A. & R. A. M. Silvano. 2008. Ecology and Ethnoecology of Dusky Grouper [garoupa, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834)] Along The Coast of Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 4: 4-20.
- Bittencourt, V. F. N. 2009. Proteção a pesca do robalo (*Centropomus parallelus*) na foz do rio Mambucaba, Angra Dos Reis - RJ. *Educação Ambiental BE*, 597 (2): 38-43.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Buss, D. F., D. F. Baptista & J. L. Nessimian. 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Caderno Saúde Pública*, 19: 465-473.

- Campos, B. R., K. C. M. Filho, F. D'Incao, L. Poersch & W. Wasielesky. 2012. Toxicidade aguda da amônia, nitrito e nitrato sobre os juvenis de camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (crustacea: decapoda). *Atlântica*, 34: 75-81.
- Cárcamo, J. G., M. N. Aguilar, C. A. Barrientos, C. F. Carreño & A. J. Yañez. 2014. Emamectin benzoate treatment alters the expression and activity of CYP1A, FMO and GST in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 434: 188–200.
- Cerqueira, V. R. C., 2002. Cultivo do Robalo, aspectos da reprodução, larvicultura e engorda. Florianópolis, Editora do Autor, 86 p.
- Chippari-Gomes, A. R., L. C. Gomes, N. P. Lopes, A. L. Val & V. M. F. Almeida-Val. 2005. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141: 347-355.
- Diaz, R.J. & R. Rosenberg. 2008. Spreading dead zone and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321: 926-929.
- Doleželová, P., S. Mácová,, V. Pištěková,, Z. Svobodová,, I. Bedáňová & E. Voslářová. 2011. Nitrite toxicity assessment in *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. *Acta Veterinaria Brno*, 80: 309–312.
- El-Sheikh, N. M. & F. A. Khalil. 2011. L-Arginine and L-glutamine as immunonutrients and modulating agents for oxidative stress and toxicity induced by sodium nitrite in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 758-762.
- Ezemonye, L. & I. Tongo. 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibian (*Bufo regularis*). *Chemosphere*, 81: 214-217.
- Fatima, M., N. Usmani, F. Firdaus, M. F. Zafeer; S. Ahmad, K. Akhtar, S. M. Dawar Husain, M. H. Ahmad, E. Anis & M. Mobarak Hossain. 2015. In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 176-177: 17–30.
- Fernández-Iglesias, A., H. Quesada, S. Díaz, D. Pajuelo, C. Bladé, L. Arola, M. J. Salvadó & M. Mulero. 2014. Combination of grape seed proanthocyanidin extract and docosahexaenoic acid-rich oil increases the hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipidic postprandial state. *Food Chemistry*, 165: 14–20.

- Fitzgibbon, Q. P., A. Strawbridge & R. S. Seymour. 2007. Metabolic scope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture*, 270: 358-368.
- Fu, S.-J., C. J. Brauner, Z.-D. Cao, J. G. Richards, J.-L. Peng, R. Dhillon & Y.-X. Wang. 2011. The effect of acclimation to hypoxia and sustained exercise on subsequent hypoxia tolerance and swimming performance in goldfish (*Carassius auratus*). *The Journal of Experimental Biology*, 214: 2080-2088.
- Gross, A., C. E. Boyd & C. W. Wood. 2000. Nitrogen budget and transformations in channel catfish ponds. *Aquaculture Engineering*, 24: 113-132.
- Habig, W.H., M. J. Pabst & W. B. Jakoby. 1974. Glutathione s-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Habig, W.H. & W. B. Jakoby. 1981. Assays for differentiation of glutathione s-transferases. *Methods in Enzymology*, 77: 398-405.
- Hegazi, M. M., Z. I. Attia & O. A. Ashour. 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquatic Toxicology*, 99: 118–125.
- Hopkins, J. & G. R. Tudhope. 1973. Glutathione Peroxidase in Human Red Cells in Health and Disease. *British Journal of Haematology*, 25: 563-575.
- Hvas, M., C. Damsgaard, L. T. H. Gamb, D. T. T. Huong, F. B. Jensenc & M. Bayley. 2016. The effect of environmental hypercapnia and size on nitrite toxicity in the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquatic Toxicology*, 176: 151–160.
- Jin, Y., X. Zhang, L. Shu, L. Chen, L. Sun, H. Qian, W. Liu & Z. Fu. 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78: 846–852.
- Kroupova, H., J. Machova & Z. Svobodova. 2005. Nitrite influence on fish: a review. *Veterinary Medicine – Czech*, 50 (11): 461–471.
- Magalhães, D.P. & A. S. Ferrão Filho. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no Biomonitoramento de ambientes aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12: 355-381.
- Mark F. C., C. Bock & H. O. Portner. 2002. Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and P-MRS. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283: 1254-1262.
- Martinez, C. B. R., F. Azevedo & E. U. Winkaler. 2006. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. Pp. 81-95. In: Cyrino, J. H. P. & E. C. Urbinati

- (Org.). Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura. Jaboticabal – SP: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática.
- Martinez, M. L., E. L. Raynard, B. B. Rees & L. J. Chapman. 2011. Oxygen limitation and tissue metabolic potential of the African fish *Barbus neumayeri*: roles of native habitat and acclimatization. *BMC Ecology*, 11(2): 1-9.
- Monroy, M., A. Maceda-Veiga & A. Sostosa. 2014. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *Science of the Total Environment*, 487: 233-244.
- Paulino, M. G., N. E. S. Souza & M. N. Fernandes. 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 6–13.
- Pollock, M.S., L. M. J. Clarke & M. G. Dube. 2007. The effects of hypoxia on fishes: from ecological relevance to physiological effects. *Environmental Reviews*, 15: 1-14.
- Qu, R., M. Feng, X. Wang, L. Qin, C. Wang, Z. Wang & L. Wang. 2014. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquatic Toxicology*, 150: 9–16.
- Ribeiro, A. M., W. E. Risso, M. N. Fernandes & C. B. R. Martinez. 2014. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40: 645-657.
- Sampaio, L. A., T. L. Pissetti & M. Morena. 2006. Toxicidade aguda do nitrito em larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae). *Ciência Rural*, 36: 1008-1010.
- Sampaio, L. A. *et al.*, 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68: 668-674.
- Simonato, J.D., C. L. B. Guedes & C. B. R. Martinez. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69: 112–120.
- Speers-Roesch, B., J. G. Richards, C. J. Brauner, A. P. Farrell, A. J. R. Hickey, Y. S. Wang & G. M. C. Renshaw. 2012. Hypoxia tolerance in elasmobranchs. I. Critical

- oxygen tension as a measure of blood oxygen transport during hypoxia exposure. *Journal of Experimental Biology*, 215: 93-102.
- Thurston, R. V. 1980. Some factor affecting the toxicity of ammonia to fishes. *Ecological Research Series, EPA-600/9-80-034*: 118-137.
- Urrutia, M. L. & J. R. Tomasso. 1987. Acclimation of channel catfish to environmental nitrite. *Journal of the World Aquaculture Society*, 18: 175-179.
- Van der Oost, R., J. Beyer & N. P. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Vasconcelos, S. M. L., M. O. F. Goulart, J. B. D. F. Moura, V. Manfredini, M. D. S. Benfato & L. T. Kubota. 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30: 1323–1338.
- Vasykiv, O. Y., O. I. Kubrak, K. B. Storey & V. I. Lushchak. 2011. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101(1): 1–5.
- Voslárová, E., V. Pisteková & Z. Svobodová. 2006. Nitrite Toxicity to *Danio rerio*: Effects of Fish Age and Chloride Concentrations. *Acta Veterinaria Brno*, 75: 107-113.
- Voslárová, E., V. Pisteková, Z. Svobodová & I. Bedánová. 2008. Nitrite Toxicity to *Danio rerio*: Effects of Subchronic Exposure on Fish Growth. *Acta Veterinaria Brno*, 77: 455-460.
- Weirich C.R. et al.,. 1993. Toxicity of ammonia and nitrite to sunshine bass in selected environments. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5: 64-72.
- Zhang, L., D. M. Xiong, B. Li, Z. G. Zhao, W. Fang, K. Yang & Q. X. Fan. 2012. Toxicity of ammonia and nitrite to yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Journal Applied Ichthyology*, 28: 82–86.