

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

ADEILDO JUNIOR DE OLIVEIRA

**MONITORAMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA ATIVIDADE DA
ACETILCOLINESTERASE NA AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO FISIOLÓGICA DE
PEIXES DO BAIXO SÃO FRANCISCO**

Maceió
2013

ADEILDO JUNIOR DE OLIVEIRA

**MONITORAMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA ATIVIDADE DA
ACETILCOLINESTERASE NA AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO FISIOLÓGICA DE
PEIXES DO BAIXO SÃO FRANCISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart de Sant'ana

Maceió
2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

O48m Oliveira, Adeildo Junior de.

Monitoramento do estresse oxidativo e da atividade da acetilcolinesterase na avaliação da condição fisiológica de peixes do Baixo São Francisco / Adeildo Junior de Oliveira. – 2013.

63 f. : il., grafs.

Orientador: Antonio Euzébio Goulart de Sant'Ana.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2013.

Bibliografia. f. 54-63.

1. Acetilcolinesterase. 2. Estresse oxidativo. 3. Peixes – Baixo São Francisco – Monitoramento. 4. Bioquímica. I. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

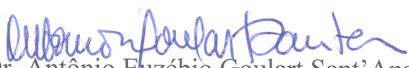


BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

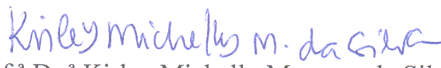
Membros da Comissão Julgadora da defesa de Dissertação do mestrando **Adeildo Junior de Oliveira**, intitulada: **“Monitoramento do Estresse Oxidativo e da Atividade da Acetilcolinesterase na Avaliação da Condição Fisiológica de Peixes do Baixo São Francisco”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 14 de agosto de 2013, às 14:00 h, no Auditório do NPM – Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar (Severinão).

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
PPGQB/IQB/UFAL


Prof.ª Dr.ª Ana Catarina Rezende Leite
IQB/UFAL


Prof.ª Dr.ª Kirley Michelly Marques da Silva
CAPES/UFAL

Dedico

*À professora Denise Maria Pinheiro (in
memorian).*

AGRADECIMENTOS

Encarecidamente à Deus, meu SENHOR, pelas bênçãos e por tudo que Ele tem feito por mim e permitido em minha vida através de sua infinita graça e misericórdia, por colocar pessoas maravilhosas em minha trajetória e me dado forças, ânimo e ter me abraçado em todos os momentos.

À minha família, por ter apoiado meus projetos, me dado ânimo e se mostrado cuidadosa para comigo em todo tempo, em especial à minha esposa Rosana Gomes Oliveira, minha mãe Maria Gisélia Nunes de Oliveira, meus avôs maternos José Nunes Sobrinho e Eulália Ferreira Nunes.

Às professoras Dra. Denise Maria Pinheiro e Edma Carvalho de Miranda, duas pessoas que contribuíram positivamente para a minha edificação profissional e pessoal, pelo exemplo, carinho, pela ajuda, paciência e atuação como verdadeiras transmissoras de conhecimento em minha vida.

Ao professor Dr. Antônio Euzébio Goulart de Santana por me conceder a oportunidade de avançar mais uma etapa na trajetória para alcançar minha realização profissional.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório Helder Barros Gomes, Leandro Batista Carneiro, Rudney Weiber Silva de Assis, Lauristela da Siva Hermógenes, Diogo Cesar Ferro do Nascimento, Ranielle de Mendonça Rocha, Érica Erlanny da Silva Rodrigues, Marina de Magalhães e Joseane da Silva, que me auxiliaram durante as coletas realizadas para este trabalho.

Ao Centro de Referência em Aquicultura e Recursos Pesqueiros do São Francisco (CERAQUA) da 5ª Superintência Regional (5ª S.R.) de Penedo da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF), pelo apoio técnico concedido para a realização das coletas.

À professora Dra. Angelina Bossi Fraga, por sua contribuição com o tratamento estatístico dos dados experimentais.

Em fim, a todas as pessoas que contribuíram direta e ou indiretamente com o realização deste trabalho e meu crescimento espiritual, emocional e profissional, por mais que sua contribuição não passasse de um simples desejo de sucesso.

*...não que sejamos capazes, por nós, de pensar
alguma coisa, como de nós mesmos; mas a nossa
capacidade **vem** de Deus,...*

(2 Coríntios 3.5)

RESUMO

A condição fisiológica de organismos aquáticos pode ser afetada por uma variedade de fatores ambientais, podendo ser avaliada pela análise de determinados parâmetros bioquímicos. Peixes das espécies piau três pintas (*Leporinus friderici*), pirambeba (*Serrasalmus brandtii*), sarapó (*Sternopygus macrurus*) e traíra (*Hoplias malabaricus*) foram capturadas no Rio São Francisco em fevereiro, abril, maio e julho de 2011, próximo da cidade de Porto Real do Colégio, Alagoas, em dois pontos geográficos de coleta. Imediatamente após a captura, os animais foram levados para o laboratório, onde foram anestesiados e mortos para retirada dos órgãos, os quais foram armazenados em tubos de plástico e congelados para posteriores análises bioquímicas. Foram determinadas as atividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE) no cérebro, catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px) no fígado, bem como os níveis de hidroperóxidos e a concentração de tióis totais hepáticos. A AChE apresentou maior atividade no piau três pintas, com a menor variação ao longo dos meses de coleta entre as enzimas avaliadas. Em piau três pintas também foram registrados os maiores valores de atividade das enzimas antioxidantes catalase e GSH-Px, entre as espécies estudadas na maior parte dos meses. A concentração de hidroperóxidos hepáticos foi maior em fevereiro para as espécies coletadas neste mês, sendo o piau três pintas a que apresentou os maiores níveis. Os níveis de tióis totais apresentaram a menor variação entre os meses de coleta para as quatro espécies, quando comparada às mudanças nas atividades das enzimas antioxidantes. Os parâmetros avaliados sofreram alterações ao longo das coletas realizadas nos diferentes meses, sendo o piau três pintas a espécie que apresentou os maiores valores encontrados para a maioria desses parâmetros.

Palavras-chave: Monitoramento. Estresse oxidativo. Acetilcolinesterase. Baixo São Francisco.

ABSTRACT

The physiological condition of aquatic organisms may be affected by a variety of environmental factors and can be evaluated by analyzing certain biochemical parameters. Fish species piau três pintas (*Leporinus friderici*) pirambeba (*Serrasalmus brandtii*) Sarapó (*Sternopygus macrurus*) and traíra (*Hoplias malabaricus*) were captured in the Rio São Francisco in February, April, May and July 2011, near the city of Porto Real do Colégio, Alagoas, where two sampling points were determined geographically. Immediately after capture, the animals were taken to the laboratory where they were anesthetized and killed for the removal of organs, which were stored in plastic tubes and frozen for subsequent biochemical analysis. We determined the activity of the enzyme brain acetylcholinesterase (AChE), catalase and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the liver, as well as levels of hydroperoxide and total thiol groups in the liver. AChE was most active in piau três pintas, with less variation over the sampling months between enzymes evaluated. In piau três pintas were also recorded the highest activities of antioxidant enzymes catalase and GSH-Px among species in most months. The concentration of hepatic hydroperoxide were higher in February for the species collected in this month, being the piau three pints that showed the highest levels. Levels of total thiols showed the less variation between sampling months for the four species, when compared to the values of antioxidant enzymes. The evaluated parameters have changed in the sampling carried out in different months, and piau três pintas was the species that showed the highest values found for most of these parameters.

Keywords: Monitoring. Oxidative stress. Acetylcholinesterase. Lower São Francisco.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura da vitamina C	17
Figura 2-	Estrutura da vitamina E	17
Figura 3-	Estrutura da acetilcolina	18
Figura 4-	Formação das EROs ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, e seus ataques oxidativos a biomoléculas	22
Figura 5-	Estrutura da glutathione reduzida (GSH)	25
Figura 6	Esquema com passos sequenciais envolvidos no processo de peroxidação lipídica	26
Figura 7-	Oxidação da GSH pela ação da enzima GSH-Px	31
Figura 8-	Valores médios dos pesos (g) dos peixes analisados	41
Figura 9-	Valores médios da atividade da AChE no cérebro	42
Figura 10-	Valores médios da atividade da catalase no fígado	43
Figura 11-	Valores médios da atividade da GSH-Px no fígado	44
Figura 12-	Valores médios da concentração de HP hepático	45
Figura 13-	Valores médios da concentração de TT hepáticos	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Peso médio (g) dos peixes estudados	40
Tabela 2-	Atividade da AChE no cérebro de piau três pintas (<i>Leporinus friderici</i>), pirambeba (<i>Serrasalmus brandtii</i>), sarapó (<i>Sternopygus macrurus</i>) e traíra (<i>Hoplias malabaricus</i>)	42
Tabela 3-	Atividade da catalase no fígado de piau três pintas (<i>Leporinus friderici</i>), pirambeba (<i>Serrasalmus brandtii</i>), sarapó (<i>Sternopygus macrurus</i>) e traíra (<i>Hoplias malabaricus</i>)	43
Tabela 4-	Atividade da GSH-Px no fígado de piau três pintas (<i>Leporinus friderici</i>), pirambeba (<i>Serrasalmus brandtii</i>), sarapó (<i>Sternopygus macrurus</i>) e traíra (<i>Hoplias malabaricus</i>)	44
Tabela 5-	Concentração de HP no fígado de piau três pintas (<i>Leporinus friderici</i>), pirambeba (<i>Serrasalmus brandtii</i>), sarapó (<i>Sternopygus macrurus</i>) e traíra (<i>Hoplias malabaricus</i>)	45
Tabela 6-	Concentração de TT no fígado de piau três pintas (<i>Leporinus friderici</i>), pirambeba (<i>Serrasalmus brandtii</i>), sarapó (<i>Sternopygus macrurus</i>) e traíra (<i>Hoplias malabaricus</i>)	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
Ag ¹⁺	Íon prata I
Au ²⁺	Íon ouro II
BHT	Butilato hidroxitolueno
°C	Graus Celsius
CAT	Catalase
Cd ²⁺	Íon cádmio II
CERAQUA	Centro de Referência em Aquicultura e Recursos Pesqueiros do São Francisco
CODEVASF	Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba
Cu ²⁺	Íon cobre II
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutase de cobre e zinco
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
Fe ³⁺	Íon férrico
Fe ²⁺	Íon ferroso
g	Grama
GPS	Sistema de posicionamento global
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GSH-Px	Glutathione peroxidase
Hg ²⁺	Íon mercúrio II
HgCl ₂	Cloreto de mercúrio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HP	Hidroperóxido
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H-SH	Tióis proteicos
kDa	Quilodalton

L-SH	Tióis não proteicos
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mn-SOD	Superóxido dismutase de manganês
mol.L ⁻¹	Unidade de concentração molar (mol por litro)
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio monoácido
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
•OH	Radical hidroxila
OH ⁻	Íon hidróxido
Pd ²⁺	Íon paládio II
Pd ⁴⁺	Íon paládio IV
pH	Potencial hidrogeniônico
PT	Proteína
Pt ⁴⁺	Íon platina IV
rpm	Rotação por minuto
RS-H	Tióis reduzidos
RS-SR	Tióis oxidados
Sn ²⁺	Íon estanho II
Sn ⁴⁺	Íon estanho IV
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TT	Tiói totais
μL	Microlitro
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Contaminação Aquática e Xenobióticos	16
2.2 Acetilcolinesterase (AChE)	18
2.3 Estresse em Peixes	20
2.4 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	21
2.5 Danos Oxidativos	23
2.6 Sistemas Antioxidantes Enzimáticos	27
2.6.1 Superóxido dismutase (SOD)	28
2.6.2 Catalase	29
2.6.3 Glutathione peroxidase (GSH-Px)	30
2.7 Considerações sobre as Espécies Estudadas	31
2.7.1 Piau três pintas (<i>Leporinus friderici</i>) (Bloch, 1794)	31
2.7.2 Pirambeba (<i>Serrasalmus brandtii</i>) (Reinhardt, 1874)	32
2.7.3 Sarapó (<i>Sternopygus macrurus</i>) (Bloch & J. G. Schneider, 1801)	32
2.7.4 Traíra (<i>Hoplias malabaricus</i>) (Bloch, 1794)	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Captura dos Animais	35
4.2 Coleta dos Órgãos e Preparo dos Homogenatos	36
4.3 Análises Enzimáticas	37
4.3.1 Determinação da atividade da AChE	37
4.3.2 Análises das atividades das enzimas antioxidantes	37
4.3.2.1 Determinação da atividade da catalase	37
4.3.2.2 Determinação da atividade da GSH-Px	37
4.4 Determinação dos Níveis de Hidroperóxidos (HP)	38

4.5 Determinação dos Níveis de Tióis Totais (TT)	38
4.6 Dosagem de Proteína	39
4.7 Análise Estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Peso Médio	40
5.2 Atividade da AChE	41
5.3 Atividade da Catalase	42
5.4 Atividade da GSH-Px	43
5.5 Níveis de HP	44
5.6 Níveis de TT	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Os organismos aquáticos estão submetidos a condições ambientais dificilmente enfrentadas por animais terrestres. Baixa concentração de oxigênio dissolvido, elevadas concentrações de algumas substâncias provenientes da degradação de compostos orgânicos, como nitrato e nitrito, variações na temperatura e no pH do meio, constituem-se fatores ambientais estressores para esses animais (TRASVIÑA-ARENAS et al., 2013).

Uma vez que os peixes são animais sensíveis à contaminação da água, muitas de suas funções fisiológicas e bioquímicas podem ser prejudicadas quando poluentes são assimilados por determinados tecidos de seu organismo (SILVA DE ASSIS et al., 2013).

O uso de biomarcadores em ecotoxicologia pode ajudar na resolução de problemas ambientais, como o de identificar os efeitos de compostos químicos existentes no ambiente sobre organismos individuais, tanto em termos populacionais quanto de comunidades. Fatores como as condições do ambiente influenciam a atividade das enzimas de defesa antioxidante, as quais também têm sido sugeridas como biomarcadores do estresse oxidativo em programas de monitoramento ambiental (MCCARTHY; SHUGART, 1990; BOTTÉ et al., 2012). O conhecimento dos mecanismos de toxicidade é fundamental para prever os efeitos causados por xenobióticos, bem como para propor a utilização de biomarcadores moleculares para monitoramento do ambiente e avaliação do impacto ambiental.

As enzimas do estresse oxidativo, superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px), atuam na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas dentro da célula (KELLY et al., 1998; MATES; SANCHEZ-JIMENEZ, 1999). Alguns radicais livres e os antioxidantes são essenciais para a vida aeróbica (HALLIWELL, 2011). Uma ampla quantidade de radicais de oxigênio e outras espécies reativas são produzidas por organismos aeróbicos, tanto por processos de significativa importância para o organismo, como os de defesa, sinalização redox e auto-oxidação de biomoléculas, bem como por aqueles que são prejudiciais à sua saúde (HALLIWELL, 2008; HALLIWELL, 2011).

A acetilcolinesterase (AChE) é outro exemplo de enzima que serve como biomarcador por ser sensível à mistura de pesticidas, metais, detergentes e óleo, apresentando como consequência a modificação na sua atividade enzimática (MARTINEZ-TABACHE et al., 1998; PINER; ÜNER, 2012).

A avaliação de impacto ambiental causado por uma grande variedade de compostos orgânicos, metais e outros contaminantes tornou-se necessária com a crescente entrada desses

contaminantes em ecossistemas aquáticos (PETUSHOK et al., 2002). O monitoramento ambiental baseado na medição dos níveis de contaminantes e sua acumulação nos organismo não é suficiente para oferecer informações relevantes e mais completas, do ponto de vista biológico, sobre o impacto de poluentes tóxicos sobre a saúde dos organismos aquáticos. A análise de indicadores bioquímicos ambientais pode propor um resultado mais satisfatório para este tipo de avaliação (HOARAU et al., 2004).

Nesse contexto, a avaliação dos efeitos de contaminantes aquáticos muitas vezes é realizada a partir da análise de indicadores do estresse oxidativo em níveis celulares e teciduais (RABITTO et al., 2005). Os parâmetros bioquímicos utilizados nesta avaliação são selecionados entre aqueles adotados no monitoramento de poluição ambiental (SOLÉ et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminação Aquática e Xenobióticos

Organismos aquáticos em diversas fases da vida e diferentes níveis tróficos, incluindo larvas de peixes, podem absorver muitos xenobióticos potencialmente tóxicos (PETERS; O'HARA; LIVINGSTONE, 1996).

A bioacumulação e toxicidade de contaminantes como halogênios orgânicos lipofílicos dependem da capacidade metabólica do organismo (MCKINNEY et al., 2004). Metais tóxicos como mercúrio e crômio podem ser encontrados em níveis elevados no músculo de organismos aquáticos. Além disso, níveis de organoclorados e metais pesados foram detectados no tecido hepático e muscular, apresentando uma relação direta com o tempo de permanência do organismo no ambiente contaminado (KOEHLER et al., 2004).

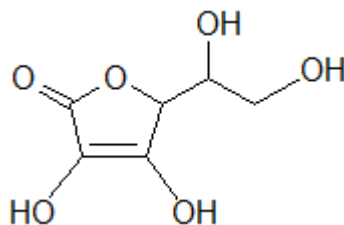
Determinados tipos de pesticidas biodegradáveis podem permanecer durante dias no meio ambiente, porém os seus efeitos sobre os tecidos de um organismo podem persistir por várias semanas, tornando viável a avaliação de biomarcadores ambientais (ASSIS et al., 2012). Marcadores hepáticos que estão envolvidos no metabolismo de xenobióticos podem ter suas atividades e ação antioxidante determinadas. Em muitos processos metabólicos como a desintoxicação de xenobióticos, o fígado exerce uma importante atuação, sendo uma importante fonte geradora de espécies reativas de oxigênio (SILVA DE ASSIS et al., 2013). Uma resposta adaptativa em peixes na tentativa de neutralizar os efeitos desses radicais livres pode ser demonstrada em alterações das atividades de enzimas antioxidantes (STARA, et al., 2013).

A principal resposta do organismo afetado por um xenobiótico é ativar um mecanismo de desintoxicação que visa converter os componentes tóxicos em espécies biologicamente inativas. Este mecanismo de defesa envolve uma enorme gama de diferentes enzimas (PETUSHOK et al., 2002). Em muitos estudos, incluindo experimentos de campo, alterações no fígado de peixes têm sido averiguadas por meio da análise de atividades enzimáticas in vitro de oxigenases utilizando determinados modelos de substratos (OIKARI; KUNNAMMO-OJALA, 1987).

O sistema de defesa antioxidante tem como papel principal evitar a ação da produção excessiva de EROs resultante da exposição do organismo a xenobióticos. Nos organismos aquáticos esse papel de defesa é desempenhado por enzimas como a catalase, SOD, glutathione peroxidase e antioxidantes não enzimáticos como GSH e vitaminas C e E (Figuras 1 e 2). Em

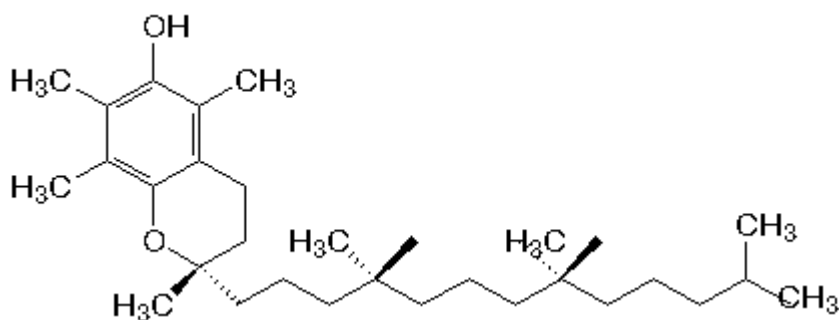
condições de contaminação ambiental é provável que ocorra alterações nas atividades das enzimas que metabolizam xenobióticos e que atuam na defesa antioxidante (SOLÉ et al., 2010).

Figura 1- **Vitamina C**



Fonte: Eleborada pelo autor

Figura 2- **Vitamina E**



Fonte: Eleborada pelo autor

A produção de EROs pode ser estimulada por uma grande variedade de contaminantes ambientais. Há evidências que apontam para a existência de um papel pró-oxidante dessas espécies poluentes (PETERS; O'HARA; LIVINGSTONE, 1996; GUILHERME et al., 2012), podendo induzir o estresse oxidativo em peixes (BOTTÉ et al., 2012).

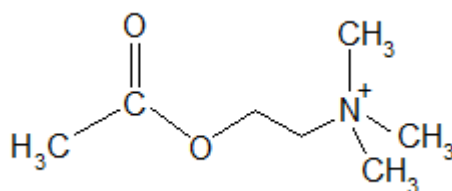
O aumento de populações de cianobactérias, causado pela eutrofização como consequência do aumento da produção de resíduos, tem sido motivo de preocupação no que diz respeito à saúde ambiental (SILVA DE ASSIS et al., 2013), uma vez que substâncias tóxicas produzidas por cianobactérias são capazes de promover alterações no sistema enzimático antioxidante de organismos aquáticos.

2.2 Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE (EC 3.1.1.7) é uma enzima que exerce uma importante função na transmissão colinérgica no sistema nervoso central e periférico (BERNARD et al., 1995). Está envolvida na neurotransmissão colinérgica atuando na inativação da acetilcolina por meio de um rápido processo de hidrólise. Está presente no cérebro em elevadas concentrações e ocorre em neurônios colinérgicos do sistema nervoso central e periférico e em outros tipos de tecidos, neurais e não neurais, e em eritrócitos (LUCAS; KREUTZBERG, 1985; ALEXANDROVA et al., 1987; LANDWEHRMEYER et al., 1993). Várias formas desta enzima podem ser encontradas em tecidos de vertebrados como humanos, peixes, entre outros (SCHMIDT-DANNERT et al., 1994). A atividade da AChE cerebral é superior à encontrada no tecido muscular (STRAUS; CHAMBERS, 1995; MIRON et al., 2005). Também foi constatado que a AChE está presente em muitos tecidos que contêm baixos níveis de acetilcolina (SMALL; SIMPSON, 1988).

Em animais adultos mais de 90% da atividade da AChE no sistema nervoso central é representada por um tetrâmero anfifílico, contendo uma subunidade catalítica de 20 kDa (INESTROSA; MORENO; FUENTES, 1994). A inativação da acetilcolina ocorre em um sítio aniônico da enzima que se liga ao amônio quaternário da acetilcolina (Figura 3) (ALEXANDROVA et al, 1987).

Figura 3- **Estrutura da acetilcolina**



Fonte: Eleborada pelo autor

A atividade da AChE é extremamente importante para o desempenho de muitas funções fisiológicas, tais como a fuga do local pela presa ameaçada por um predador e a orientação necessária para se alimentar. Quando a atividade da AChE diminui, acetilcolina não hidrolisada é acumulada dentro das fendas sinápticas, podendo comprometer o seu funcionamento e acarretar em deficiências fisiológicas (GLUSCZAK et al., 2006; MORAES et al., 2007).

Foi constatado que determinados compostos são reconhecidos pela sua capacidade de produzir efeitos tóxicos em mamíferos, induzindo o acúmulo de acetilcolina e a ativação de receptores colinérgicos através da inibição da enzima acetilcolinesterase (REZG et al., 2008).

Baixas concentrações de diversos contaminantes, tais como herbicidas, podem inibir a atividade da AChE, causando o acúmulo de acetilcolina em junções neuromuscular em vertebrados, o que leva a estimulação constante dos músculos, induzindo a paralisia e morte do organismo. O cérebro é em geral o órgão que apresenta maior atividade da AChE. Estudos sugerem que a redução dessa atividade causada por herbicidas é influenciada por diferentes tecidos e pelo tempo de exposição (MIRON et al., 2008; ASSIS et al., 2012; BOTTÉ et al., 2012).

Entre os principais poluentes ambientais descritos como capazes de inibir a atividade da AChE em peixes e invertebrados estão os metais pesados, apontados como agentes anticolinesterase inespecíficos, e pesticidas como os organofosforados e os carbamatos que, em termos de utilização ainda constituem a classe mais importante de inseticidas (ALVES COSTA et al., 2007; ASSIS et al., 2012; GUILHERME et al., 2012). Quando em elevadas concentrações, metais como o chumbo, cádmio, ferro e cobre são capazes de produzir uma grande variedade de efeitos tóxicos (DE LIMA; ROQUE; ALMEIDA, 2012; SILVA et al., 2013). Silva et al. (2013) relataram efeito inibitório sobre a AChE em tucunaré (*Cichla ocellaris*) induzido por sete tipos de pesticidas, cinco organofosforados e dois carbamatos.

Sulfato de cobre causou inibição enzimática da AChE cerebral e muscular em carpas (*Cyprinus carpio*), sendo este efeito mais pronunciado no músculo (NEMCSOK et al., 1984). A deposição gradativa de sulfato de cobre em solos durante a sua aplicação na agricultura como antifúngico pode permitir a sua entrada em rios e o consequente acúmulo em algas, causando danos aos peixes através da inibição da AChE (CREMLYN, 1978).

Dentre as diversas substâncias dissolvidas em rios estão os sais inorgânicos, os quais conferem a presença de íons metálicos na água. Há metais no ambiente aquático que não representam ameaças aos vertebrados que nele habitam, sendo que cátions metálicos são geralmente tóxicos para os peixes e outros animais e podem inibir a AChE. Em experimento realizado com *Pimephales promelas*, avaliando a toxicidade de determinados íons metálicos sobre a AChE, foi constatado que os íons Cu^{2+} , Pd^{2+} , Cd^{2+} , Pd^{4+} , Ag^{+} , Au^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Pt^{4+} e Sn^{4+} causaram inibição enzimática. Na mesma avaliação, outros cátions inorgânicos apresentaram efeitos menos pronunciados, e cátions de metais alcalinos e alcalinos terrosos não exibiram efeitos mensuráveis sobre a enzima (OLSON; CHRISTENSEN, 1980).

2.3 Estresse em Peixes

Inúmeros fatores relacionados às condições ambientais são apontados como agentes estressores. Entre os fatores responsáveis por causar estresse em peixes, se destacam as mudanças de parâmetros físico-químicos que alteram a condição da água, tais como temperatura, alcalinidade, pH, salinidade, o acúmulo de resíduos nitrogenados na água, contaminação ambiental, doenças infecciosas, entre outros fatores, sendo eles capazes de induzir respostas primária, secundária e terciária no organismo (WEBER, 2011).

Baixa disponibilidade de oxigênio no ambiente aquático pode pôr em risco a segurança do organismo, causando alterações no metabolismo e aumentando a produção de EROs (TRASVIÑA-ARENAS et al., 2013). A disponibilidade de oxigênio consiste em um fator limitante do crescimento, sendo a hipoxia crônica um importante estressor ambiental que interfere no crescimento dos peixes (WILHELM FILHO et al., 2005).

Estudos demonstram que danos oxidativos no tecido hepático de peixes podem ser induzidos por herbicidas. Pesticidas podem levar à formação de EROs e induzir o estresse oxidativo (MIRON et al., 2008). Também têm mostrado que o estresse oxidativo em peixes pode variar dependendo do tipo de tecido ou poluente avaliado.

Os níveis de EROs podem aumentar drasticamente em organismos submetidos às condições que o induzem a um estresse ambiental. Neste caso, o estresse oxidativo ocorre quando o excesso de EROs e seu acúmulo supera a capacidade do organismo de controlar a sua formação e os efeitos desse excesso (MONTEZANO; TOUYZ, 2012; VINAGRE et al., 2012). O estresse oxidativo pode ser considerado como uma condição de desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes (LI et al., 2010). Danos potencialmente perigosos podem resultar deste desbalanço redox. Em peixes, o estresse oxidativo pode ser detectado pelo esgotamento total de glutathione (GSH) e o aumento da peroxidação lipídica no tecido do fígado (PLOCH et al., 1999). Além disso, pode forçar a célula a passar por processos de adaptação como até mesmo causar morte celular por apoptose ou necrose (HALLIWELL, 2003).

Estresse oxidativo em peixes pode ser gerado por xenobióticos presentes na água, os quais podem suprimir a atividade de enzimas antioxidantes devido ao dano oxidativo causado a elas pela produção excessiva de EROs (SILVA DE ASSIS et al., 2013; MORAIS et al., 2007). O estado metabólico do fígado pode ser alterado por diferentes tipos de poluentes ambientais através de processos de desintoxicação (FONSECA et al., 2008). A presença de níveis elevados de determinados compostos, como hidrocarbonetos aromáticos e clorados, é capaz de induzir atividade metabólica no fígado de peixes (CORSI et al., 2003).

O fígado não é o único órgão alvo de espécies químicas responsáveis por causar intoxicação do organismo, porém exibe uma importante atuação em processos de desintoxicação, incluindo aqueles resultantes da produção excessiva de EROs.

2.4 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Um radical livre pode ser definido como uma espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 1991). A complexa interação entre a formação biológica de diversos tipos de radicais livres e a capacidade do organismo de controlar os níveis dessas espécies reativas faz parte do mecanismo de sobrevivência de organismos em um ambiente aeróbico (MAESTRO; MCDONALD, 1987).

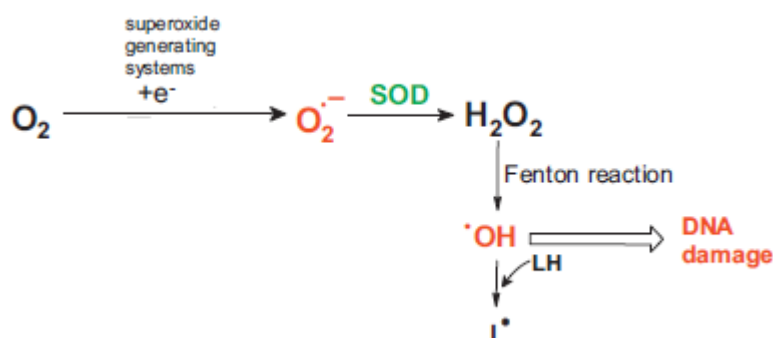
EROs é um termo que compreende os radicais de oxigênio e determinadas espécies que não possuem caráter radicalar. As EROs representam a classe mais importante de espécies radicalares geradas em sistemas vivos (BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010; FLORA, 2011). As EROs mais comuns são o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). São altamente reativas e são geradas dentro do ambiente celular como subprodutos da respiração aeróbica e do metabolismo (AL-GUBORY, FOWLER; GARREL, 2010). Estes radicais livres têm a capacidade de oxidar moléculas biologicamente importantes, o que pode resultar em perdas de importantes funções fisiológicas (TAKASHIMA et al., 2012).

A produção de EROs e o consumo de antioxidantes é um fenômeno contínuo em todas as células aeróbicas (REISCHL et al., 2007; SARDINA et al., 2012). No metabolismo oxidativo essas espécies químicas são constantemente geradas como subprodutos, como no processo de respiração celular na mitocôndria (KRYSTON et al., 2011). A formação de EROs ocorre por enzimas celulares ou pelo vazamento de elétrons da cadeia de transporte na mitocôndria, o que desempenha um papel importante no desenvolvimento do estresse oxidativo (HEISE et al., 2003; CHERNYAK et al., 2006; HALLIWELL, 2008; JOMOVA; VALKO, 2011). Muitos processos de sinalização envolve a participação de EROs, e baixos níveis dessas espécies são essenciais para o bom desempenho da função celular (FATTMAN, SCHAEFER; OURY, 2003; POSPÍŠIL, 2012).

As taxas de produção de EROs pode ser afetada pelos níveis de oxigênio na célula, pois o aumento na formação dessas espécies reativas pode ser registrado quando a concentração de

oxigênio (O_2) é elevada (HALLIWELL, 2008). Durante a redução do oxigênio molecular, espécies reativas de oxigênio são geradas, incluindo radicais livres instáveis e espécies não radicalares (MONTEZANO; TOUYZ, 2012). Como resultado dessa redução parcial de oxigênio são formados o $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $\bullet OH$, através da transferência de um, dois ou três elétrons para a molécula de O_2 (Figura 4) (REISCHL et al, 2007).

Figura 4- Formação das EROs ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $\bullet OH$) e seu ataque oxidativo a biomoléculas.



Fonte: Adaptado de JOMOVA; VALKO, 2011.

O $O_2^{\bullet-}$ é conhecido por ser potencialmente prejudicial. A sua produção ocorre na mitocôndria através de vazamento fisiológico de elétrons para moléculas de O_2 , ou faz parte de um mecanismo redox de sinalização intracelular (HALLIWELL, 2011). O $O_2^{\bullet-}$ apresenta reatividade extremamente elevada em meios hidrofóbicos. Embora os sistemas geradores aquosos in vitro dessa espécie reativa sejam capazes de causar consideráveis danos aos materiais biológicos, o $O_2^{\bullet-}$ é pouco reativo neste tipo de ambiente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). O ânion radical superóxido é considerado uma ERO primária, podendo interagir com outras espécies para originar EROs secundárias (BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010).

O H_2O_2 é uma ERO que também oferece riscos à saúde da célula. Seu maior efeito prejudicial consiste na sua conversão imediata e indiscriminada em $\bullet OH$. Essa conversão ocorre pela interação do H_2O_2 com uma enorme variedade de íons de metais de transição, dos quais o mais importante é provavelmente o ferro (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000; JOMOVA; VALKO, 2011). O H_2O_2 também é fracamente reativo em solução aquosa, porém, em concentrações fisiológicas é capaz de atravessar membranas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). In vivo, o H_2O_2 é produzido pela dismutação enzimática ou

espontânea do $O_2^{\bullet-}$ catalisada pela enzima antioxidante SOD (HALLIWELL, CLEMENT; LONG, 2000; SARDINA et al., 2012).

O $\bullet OH$ é uma espécie altamente oxidante, sendo a ERO mais reativa, e é produzido na reação de Fenton (Reação 1), uma reação entre O_2 , H_2O_2 e íons de ferro (RICHMOND et al., 1981; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986; ZHANG et al., 2010). O $\bullet OH$ pode também ser produzido por interação de H_2O_2 com íons de cobre (HALLIWELL, 1991). Um nível relativamente baixo do radical hidroxila formado na reação de Haber-Weiss (Reação 2) pode ser mantido pela contribuição de enzimas antioxidantes (ATLI et al., 2006).



Radicais livres de oxigênio podem promover efeitos benéficos, mas também podem gerar efeitos deletérios para o sistema nervoso central, onde são constantemente produzidos (ZHANG et al., 1994). Concentrações elevadas de EROs pode causar alterações no equilíbrio do sistema endógeno de proteção contra ataques à mitocôndria (ZHANG et al., 2010). Em organismos aeróbicos o metabolismo do oxigênio é continuamente acompanhado da formação de EROs, que são capazes de danificar moléculas biologicamente importantes. A oxidação de biomoléculas por EROs é neutralizada por um complexo sistema de defesa antioxidante (REISCHL et al., 2007). O equilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante celular permite a execução de funções úteis por algumas espécies reativas, minimizando os danos oxidativos (HALLIWELL, 2011).

2.5 Danos Oxidativos

Constituintes celulares e componentes da matriz extracelular podem ser diretamente afetados pelo excesso de acúmulo de espécies reativas de oxigênio (LI et al., 2010). O aumento na formação de EROs pode comprometer a integridade fisiológica do organismo, podendo danificar biomoléculas de DNA, proteínas e lipídeos (POSPÍŠIL, 2012).

Os ataques oxidativos a biomoléculas como DNA, lipídeos e proteínas podem ser divididos em dois tipos: exógenos e endógenos. Os ataques exógenos são causados por fatores ambientais de oxidação, como radiação ionizante, substâncias oxidantes e raio ultravioleta e luz

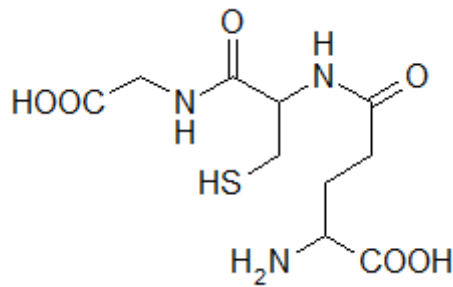
solar. Os de natureza endógena são intracelulares e de origem natural e ocorrem através de processos como de sinalização e processos metabólicos ou durante a inflamação (KRYSTON et al., 2011).

O estresse oxidativo induzido por xenobióticos pode ser detectado pela avaliação de determinados biomarcadores do estresse. Modificações oxidativas em proteínas constitui um importante biomarcador com esta finalidade (FERREIRA et al., 2010). Logo, neste sentido, a presença de tióis em biomoléculas em amostras biológicas e ambientais é muito importante para uma avaliação desse tipo (KAUR et al., 2012).

O equilíbrio estabelecido entre tióis reduzidos (RS-H) e dissulfetos oxidados (RS-SR) é fundamental para os tióis desempenhar o importante papel de manutenção da homeostase redox celular (KAUR et al., 2012). A presença de cisteína em várias proteínas lhes confere uma disponibilidade de grupamentos tióis em suas estruturas. Esses tióis são acessíveis ao solvente, condicionando vulnerabilidade desses grupos quanto aos ataques que conduzem a processos oxidativos, como formação de dissulfetos proteicos. A reatividade de tióis depende da presença e da proximidade de outros grupos funcionais no ambiente que o circunda. A produção de EROs pode causar oxidação irreversível de tióis de proteínas essenciais, formando como produtos óxidos de enxofre (REISCHL et al., 2007). Além de atuar na proteção da célula contra a ação de EROs, tióis livres estão envolvidos na regulação de muitos processos redox (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006).

Tióis também fazem parte de moléculas de antioxidantes não protéicos, como é o caso da GSH (Figura 5). O fígado é o principal órgão responsável pelo fornecimento desse antioxidante (BAGNYUKOVA et al., 2007). Os tióis não protéicos (L-SH) são representados principalmente por peptídeos de cisteína e pela GSH, enquanto tióis protéicos (H-SH) são representados por proteínas com resíduos de cisteína (BAGNYUKOVA et al., 2007). Em condições de estresse a produção de EROs se mantém elevada. Portanto, nestas condições, o teor de GSH diminui devido a sua atuação como antioxidante no mecanismo de minimizar os efeitos desses radicais livres. Por outro lado, a síntese de GSH é estimulada pelo estresse oxidativo (BAGNYUKOVA et al., 2007).

Figura 5- **Glutathiona reduzida (GSH)**

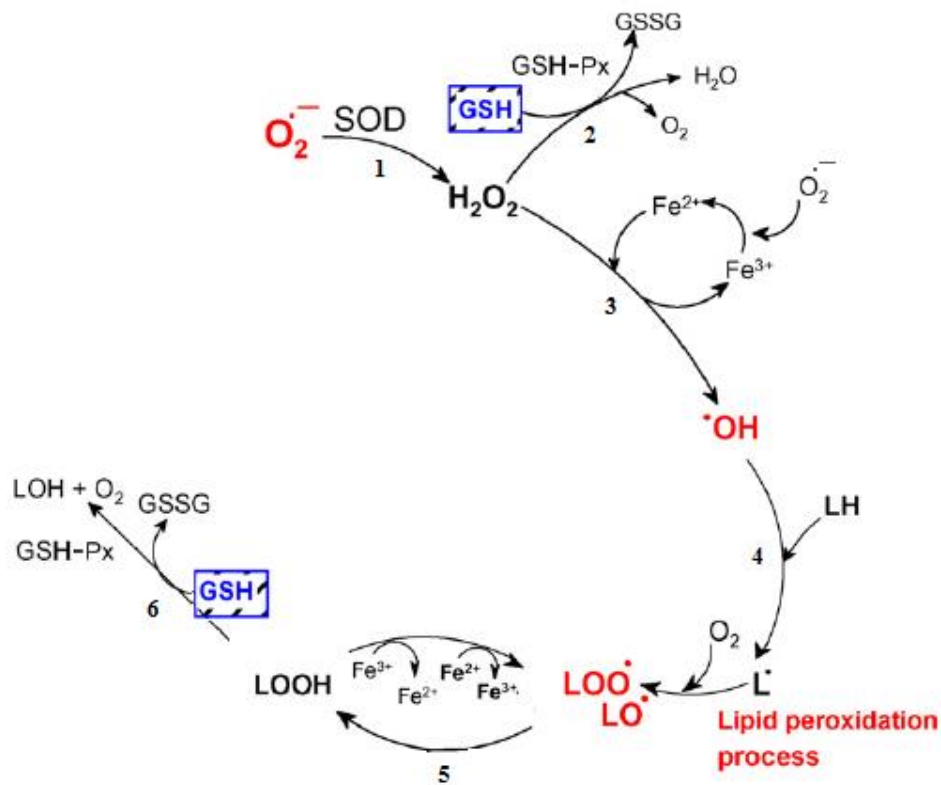


Fonte: Elaborada pelo autor

O aumento da temperatura ambiental conduz ao aumento da necessidade do organismo de elevar o consumo de oxigênio em peixes, podendo promover a formação de EROs e causar a oxidação de constituintes celulares, bem como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). EROs como O_2^- e $\bullet OH$ podem ser formados a partir da oxidação de tióis na presença de oxigênio.

Na peroxidação lipídica os íons de metais de transição participam da etapa de iniciação, que envolve a participação de qualquer espécie capaz de abstrair um átomo de hidrogênio, como o $\bullet OH$, que possui esta propriedade (Figura 6) (HALLIWELL, 1991). A peroxidação lipídica consiste na oxidação de ácidos graxos da membrana celular para mediar à cadeia de radicais livres (LI et al., 2010).

Figura 6- Esquema com passos sequenciais envolvidos no processo de peroxidação lipídica- Formação do radical $\bullet\text{OH}$ a partir de H_2O_2 (3) gerado na dismutação do O_2^- (1), e seu ataque às moléculas de lipídeos (4), bem como a atuação da GSH-Px na degradação de H_2O_2 gerado pela SOD (2) e na transformação de hidroperóxidos orgânicos formados na peroxidação de lipídeos (6).



Fonte: Adaptado de VALKO et al., 2007.

Determinados metais são essenciais para o normal funcionamento de células, porém, a exposição a elevadas concentrações desses metais pode causar danos oxidativos em biomoléculas (FLORA, 2011). A peroxidação lipídica pode ser estimulada por ferro ativo. Além disso, o ferro catalisa a formação de $\bullet\text{OH}$, fortemente nocivo, que resulta em dano tecidual. Os íons de ferro ocorrem nos estados de oxidação +II e +III, sendo que os íons de ferro II são solúveis em fluidos biológicos e são capazes de reagir com oxigênio, gerando radical hidroxila. Em meio aquoso íons ferrosos são instáveis e tendem a reagir com oxigênio molecular e formar íons férricos e ânion radical superóxido (JOMOVA; VALKO, 2011).

Elevada atividade da enzima SOD pode induzir o aumento da produção de H_2O_2 , o qual pode ser decomposto pela GSH-Px. O H_2O_2 formado na dismutação do O_2^- pela SOD também contribui para a formação do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), responsável por atacar várias

macromoléculas, dentre elas os lipídeos. Uma vez atacados, os lipídeos dão origem aos hidroperóxidos de lipídeos (VALKO et al., 2007; JOMOVA; VALKO, 2011).

O aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) consiste em uma resposta associada ao estresse oxidativo crônico causado por xenobióticos em peixes expostos a espécies poluentes (TAGLIARI et al., 2004). O aumento da concentração de malondialdeído é um indicativo da elevação dos níveis de hidroperóxidos de lipídeos, uma vez que estes são formados antes no processo de peroxidação.

Muitos poluentes presentes no solo são submetidos a processos de oxidação que promovem a formação de intermediários reativos, os quais reagem com oxigênio gerando EROs (BUČKOVÁ et al., 2010). Danos oxidativos a macromoléculas estão envolvidos com a produção excessiva dessas espécies reativas (SILVA DE ASSIS et al., 2013). A exposição do organismo a metais tóxicos também constitui um fator determinante no aumento da produção desses intermediários reativos (ALVES COSTA et al., 2007).

2.6 Sistemas Antioxidantes Enzimáticos

Aumento da geração de EROs pode neutralizar a defesa antioxidante celular (HALLIWELL, 2003). Um antioxidante é uma espécie química que atua como uma molécula que retarda, impede ou elimina danos oxidativos causados a outras moléculas (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). São espécies químicas que inibem ou impedem a oxidação de biomoléculas, como DNA, lipídeos e proteínas oxidáveis, promovida pela ação das EROs. Os maiores sistemas antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas SOD, catalase e GSH-Px (MONTEZANO; TOUZY, 2012). Os antioxidantes podem ser moléculas complexas como enzimas ou espécies mais simples como a GSH e o ácido úrico (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Uma variedade de mecanismos de defesas antioxidantes foi desenvolvida por organismos a fim de se proteger contra danos oxidativos. Tais mecanismos envolvem a participação de proteínas sequestrantes de metais, enzimas antioxidantes especializadas e a utilização de antioxidantes não enzimáticos (FATTMAN; SCHAEFER; OURY, 2003). O sistema antioxidante intracelular é constituído de componentes enzimáticos, como as enzimas eliminadoras de EROs, e não enzimático, como a GSH e outros tióis. A primeira linha do sistema de defesa antioxidante inclui SOD, catalase e GSH-Px (LI et al., 2010). As células

aeróbicas possuem estas enzimas que controlam a produção de EROs e evitam sua propagação para efeitos tóxicos (AL-GUBORY et al., 2012).

Sistema de defesa antioxidante constituído de enzimas antioxidantes atua na proteção contra o estresse oxidativo causado por metais absorvidos em tecidos de peixe como o fígado e o rim (ATLI et al., 2006). Uma característica marcante das enzimas antioxidantes é sua capacidade de alterar sua atividade quando submetidas às condições de estresse oxidativo. Este fenômeno faz parte de um mecanismo de adaptação para reduzir o estresse induzido por poluentes (STARA et al., 2013). Determinados organismos utilizam SOD, GSH-Px e catalase em seu sistema de proteção contra a geração excessiva de EROs, bem como o sequestro de íons metálicos como uma importante defesa antioxidante (HALLIWELL, 1991).

2.6.1 Superóxido dismutase (SOD)

A primeira linha de defesa contra a ação de EROs da maioria das células aeróbicas é constituída de uma família de metaloenzimas, as superóxidos dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) (UMASUTHAN et al., 2013). A SOD exerce um papel fundamental na defesa da célula contra a toxicidade de metabólitos do oxigênio (OBERLEY et al., 1989).

Na maioria das células eucarióticas a SOD encontra-se principalmente em duas formas, uma de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), encontrada predominantemente no citoplasma, e outra contendo manganês (Mn-SOD), encontrada principalmente na matriz mitocondrial. A SOD também pode ser encontrada, em menor quantidade, no ambiente extracelular, como na corrente sanguínea. (OBERLEY et al., 1989; IKEDA et al., 1995). Esta família de metaloenzimas contendo cobre, manganês, zinco e ferro é responsável pela conversão do O_2^- em H_2O_2 e oxigênio molecular. O O_2^- é um produto da redução do oxigênio molecular, que em excesso representa ameaça à vida das células (HALLIWELL; GUTTERIDGET, 1986; BEYER; FRIDOVICH, 1987; AL GHOULEH et al., 2011).

O O_2^- pode penetrar membranas biológicas e inativar algumas enzimas (ATLI et al., 2006). A SOD é a única proteína presente no meio extracelular capaz de remover esta ERO (PETERSEN; ENGHILD, 2005). Estudos relataram que mutações na SOD pode elevar os níveis de O_2^- (JOMOVA; VALKO, 2011).

2.6.2 Catalase

A catalase (EC 1.11.1.6) é uma das primeiras enzimas propostas para ser um marcador do estresse oxidativo, por exercer atuação eficaz na descontaminação celular promovida por excesso de peróxido de hidrogênio (Reação 3), o decompondo e transformando-o em água e oxigênio molecular (VASYLKIV et al., 2011). Embora o peróxido de hidrogênio seja a ERO menos reativa, pode dá origem a efeitos indesejáveis, pois ao reagir com metais como o ferro pode gerar o $\bullet\text{OH}$, altamente prejudicial (TRASVIÑA-ARENAS et al., 2013).



A catalase compete com a GSH-Px na desintoxicação de H_2O_2 . Alguns estudos apontam para o fato de que a catalase seja a principal enzima atuante na degradação de H_2O_2 , já outros sugerem que a GSH-Px atua mais eficientemente nesta desintoxicação quando comparada com a catalase (BAGNYUKOVA et al., 2005). É a única enzima que degrada H_2O_2 sem consumir equivalentes redutores celulares e compõe um mecanismo bastante eficiente na remoção desta ERO (LINO-NETO et al., 2004). Exerce um papel fundamental na defesa celular contra os efeitos nocivos do O_2^- produzido em reações que ocorrem em uma grande variedade de amostras biológicas (DAVID et al., 2008).

A catalase é uma enzima expressa em muitos tecidos com diferentes níveis de atividades. Em tecidos de rim e fígado de ratos a atividade desta enzima apresenta-se bastante elevada quando comparada à atividade da catalase cerebral (LUO; RANDO, 2003). A atividade da catalase pode sofrer alterações em animais expostos a contaminantes orgânicos ou metálicos. Dependendo da espécie, concentração e níveis de exposição ao metal, esta enzima pode sofrer inibição (ATLI et al., 2006).

O aumento da atividade da catalase tem sido observado em alguns estudos realizados com a exposição de peixes a pesticidas e outros contaminantes (STARA et al., 2013; HACKENBERGER, 2012). Em contra partida, uma redução significativa da atividade da catalase em tecidos de órgãos de peixe foi relatada em trabalhos que avaliaram os efeitos de alguns poluentes sobre a mesma (STARA, 2013). Em trabalho realizado por Xing et al., (2012), foi constatado que a atividade de enzimas antioxidantes diminuiu com aumento da concentração de alguns agrotóxicos.

Em bactérias da família *Comamonadaceae*, bastante conhecida por sua capacidade de degradar vários xenobióticos no solo, a catalase exibiu atividade muito superior em solos contaminados com petróleo do que em solos não poluídos (GODOČÍKOVÁ et al., 2005). Semelhantemente, catalase isolada de *Aspergillus niger* em áreas de minas contaminadas com metais pesados mostraram que a atividade da enzima foi superior às encontradas em áreas do correspondente controle (BUČKOVÁ et al., 2005). Monteiro (2011) observou o aumento em 42 % da atividade da catalase no fígado, 45 % nas brânquias e 37 % no músculo de matrinxãs expostas a mercúrio inorgânico (HgCl_2).

A catalase em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) sofreu redução de atividade quando exposta a cobre sob condições normais de pressões de dióxido de carbono (SAMPAIO et al., 2012). Neste mesmo sentido, Da Silva et al. (2011) observaram diminuição da atividade da catalase no cérebro de traíra (*Hoplias malabaricus*) exposta a uma neurotoxina.

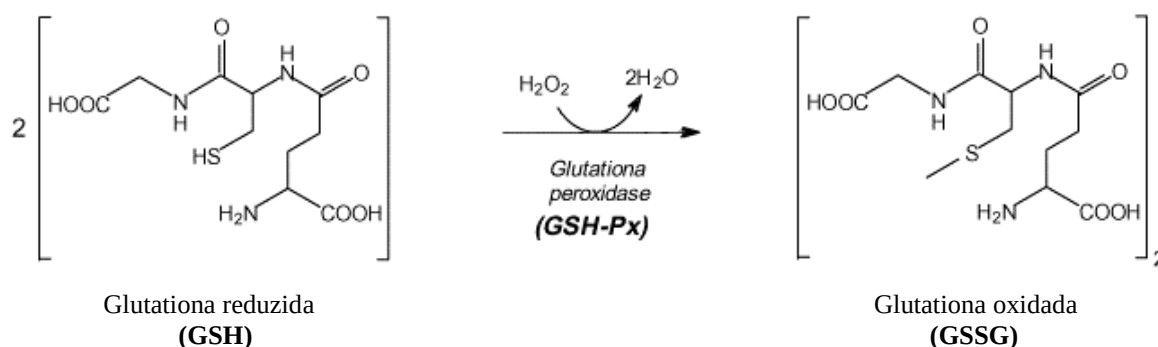
Os peixes são animais sensíveis à contaminação do meio aquático. Quando assimilados pelos tecidos desses organismos, substâncias poluentes podem afetar muitos processos bioquímicos e fisiológicos (SILVA DE ASSIS et al., 2013; BUSSOLARO, 2010). O aumento na produção de H_2O_2 e a deficiente neutralização dessa espécie reativa de oxigênio pela catalase constitui um fator responsável pela ineficiente homeostase redox em peixes (FILIPAK NETO, 2008).

2.6.3 Glutathione peroxidase (GSH-Px)

A GSH-Px (EC 1.11.1.9) faz parte de um grupo de enzimas contendo selênio. É dependente de um resíduo de selenocisteína para garantir sua atividade (DI ILIO et al., 1995). Está entre as enzimas mais atuantes no mecanismo de defesa antioxidante que impedem a propagação de EROs altamente reativas. É responsável pela conversão catalítica de H_2O_2 em água e oxigênio, com consumo de GSH (DI ILIO et al., 1995; AL-GUBORY et al., 2012).

Juntamente com a SOD e a catalase, a GSH-Px constitui uma importante parte do sistema de defesa da célula contra o ataque de radicais livres sobre estruturas biológicas (SCHISLER; SINGH, 1988). Esta enzima, além de atuar na degradação de H_2O_2 , catalisa a redução de hidroperóxidos de lipídeos durante a oxidação da GSH (Figura 7), convertendo-os em alcoóis e oxigênio molecular (Figura 6) (VALKO et al., 2007; DUH et al., 2009).

Figura 7- **Oxidação da GSH pela ação da enzima GSH-Px.**



Fonte: Adaptado de ROVER JÚNIOR; HÖEHR; VELLASCO, 2001.

O selênio tem a propriedade de prevenir ou diminuir o estresse oxidativo. Este elemento exerce forte influência sobre as atividades de determinadas enzimas, tais como a família da GSH-Px e da tioredoxina redutase (HALLIWELL, 2008).

A geração de espécies reativas de oxigênio no organismo segue uma relação quase linear com o consumo de oxigênio (BOVERIS; CHANCE, de 1973; BOVERIS, 1977). Em piapara (*Leporinus elongatus*) exposta a baixas concentrações de oxigênio, a GSH-Px do fígado mostrou aumento na atividade quando comparada à exposição do peixe a concentrações normais de oxigênio, sendo a hipoxia um importante estressor ambiental (WILHELM FILHO et al., 2005).

2.7 Considerações sobre as Espécies Estudadas

2.7.1 Piau três pintas (*Leporinus friderici*) (Bloch, 1794)

O piau é um peixe economicamente importante no Brasil. Apresentando elevado potencial para o cultivo, é bem aceito por parte dos consumidores de pescado (GLUSCZAK et al., 2006). Algumas espécies são bastante cultivadas em água doce no sul do Brasil (MIRON et al., 2008). Possui considerável sensibilidade de detectar efeitos de diversas substâncias químicas (MORAES et al., 2007), porém a toxicidade de contaminantes como metais tem sido raramente estudada nesta espécie (GIODA et al., 2007).

O piau três pintas pertence a família Anostomidae, de hábito alimentar geralmente herbívoro. É abundante em toda a bacia do rio São Francisco e possui comprimento médio, com o máximo padrão de aproximadamente 23 cm (ALVES; LEÃO; POMPEU, 2007).

2.7.2 Pirambeba (*Serrasalmus brandtii*) (Reinhardt, 1874)

Uma espécie bastante diversificada na América do Sul, a pirambeba ocorre na bacia do São Francisco e também representa uma considerável porcentagem das espécies existentes em lagoas (POMPEU, 1999; OLIVEIRA et al., 2004). A pirambeba não é um peixe cultivado para fins comerciais, porém é comum a sua presença em sistema de produção de outras espécies (FABRÍCIO et al., 2013). É uma espécie carnívora, sendo predadores mutiladores que se alimentam de pedaços de partes do corpo de suas presas (OLIVEIRA et al., 2004).

2.7.3 Sarapó (*Sternopygus macrurus*) (Bloch & J. G. Schneider, 1801)

O sarapó é um peixe elétrico encontrado em drenagens neotropicais na América do Sul, principalmente na bacia do Paraguai-Paraná no Paraguai. Esta espécie utiliza de fraca descarga elétrica para estabelecer a comunicação e detectar presas (DOS SANTOS SILVA et al., 2008). Pertence à família Sternopygidae, a primeira de espécies produtoras de ondas e que ficam suspensas na água com ondulações contínuas da nadadeira anal (BULLOCK et al., 1979).

2.7.4 Traíra (*Hoplias malabaricus*) (Bloch, 1794)

A traíra é um peixe que representa 25% da biomassa de lagoas temporárias, pois são capazes de sobreviver em condições de privação de alimentos em longo prazo (RIOS et al., 2005; ALVES COSTA et al., 2007). Apresenta-se com uma vasta distribuição no território brasileiro, podendo ser comumente encontrada em rios e reservatórios. É bastante apreciada pela culinária local (DA SILVA et al., 2011). É uma espécie facilmente encontrada na maioria dos rios da América do Sul e Central. Pode habitar em diversos tipos de ambientes, das águas claras de um ribeirão a um habitat de água barrenta. É uma espécie carnívora onde os adultos se alimentam de outros peixes e os juvenis são geralmente alimentados a partir do consumo de larvas e insetos (MARTINS; ONAKA; FENERICK JR., 2005; OLIVERO-VERBEL et al., 2006).

O comportamento voraz dessa espécie e sua posição na cadeia alimentar, associado com sua capacidade de adaptação a diversas condições experimentais, faz da traíra um modelo biológico no estudo experimental da contaminação alimentar condicionada pela exposição a contaminantes aquáticos (ALVES COSTA et al., 2007). Vários estudos têm demonstrado que

a traíra pode acumular vários contaminantes em seu organismo, o que a coloca como um biomarcador eficiente em monitoramento ambiental (DA SILVA et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar parâmetros bioquímicos como indicadores ambientais em quatro espécies de peixes do Baixo São Francisco.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o potencial das enzimas do estresse oxidativo como indicadores bioquímicos ambientais, a catalase e a glutathione peroxidase (GSH-Px), a partir das espécies piau três pintas (*Leporinus friderici*), pirambeba (*Serrasalmus brandtii*), sarapó (*Sternopygus macrurus*) e traíra (*Hoplias malabaricus*) encontradas no Baixo São Francisco;
- Monitorar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em quatro espécies de peixe encontradas na região;
- Monitorar os níveis de subprodutos do metabolismo oxidativo em quatro espécies de peixes capturados.

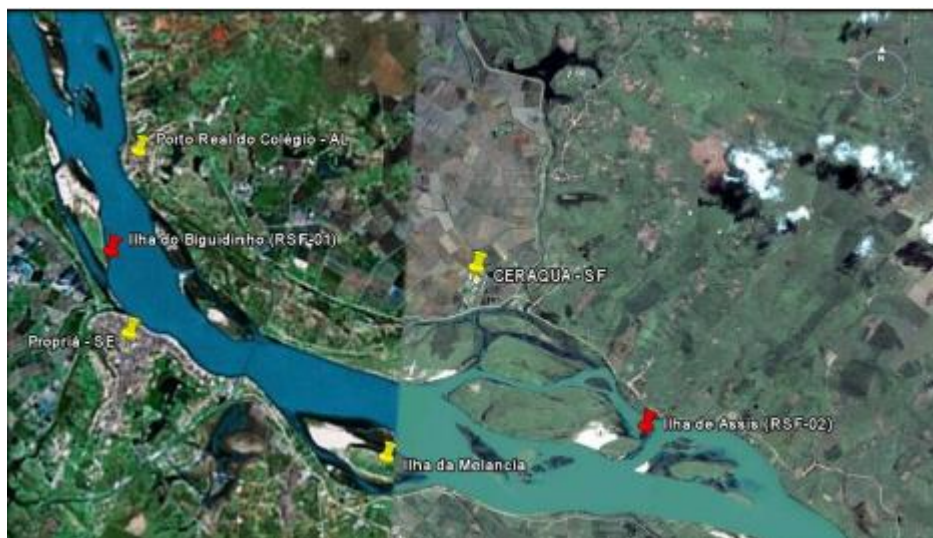
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Captura dos Animais

Os animais estudados foram provenientes de uma região do Baixo São Francisco, próximo à cidade de Porto Real do Colégio, no estado de Alagoas, e a cidade de Propriá pelo lado de Sergipe. As coletas foram realizadas em 2011 com a colaboração do Centro de Referência em Aquicultura e Recursos Pesqueiros do São Francisco (CERAQUA) da 5ª Superintendência Regional (5ª S.R.) de Penedo da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF).

As espécies foram capturadas no Baixo São Francisco em locais referenciados, onde foram determinados geograficamente com GPS (Global Positioning System) dois pontos de coleta (Mapa 1), levando-se em consideração o tipo de ambiente. Foram realizadas 8 coletas, sendo 4 em cada ponto nos respectivos meses de fevereiro, abril, maio e julho de 2011. Os peixes foram capturados em redes de espessura com malhas de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; e 10,00 centímetros entre nós, com 400 malhas de altura e 100 metros de comprimento médio. As redes foram colocadas nos pontos determinados por volta das 16:00 horas e recolhidas após um tempo médio de 12 horas. Imediatamente após a captura, os peixes foram armazenados em sacos plásticos contendo oxigênio e levados para o laboratório de Bromatologia do CERAQUA (CODEVASF).

Mapa- Os pontos de coletas no Rio São Francisco em vermelho, nas proximidades do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura do Itiuba (CERAQUA), região de Porto Real do Colégio/AL.



Fonte: Google Earth, 2011.

4.2 Coleta dos Órgãos e Preparo dos Homogenatos

Os animais foram anestesiados com benzocaína 0,01 g/L até a morte para retirada do fígado e do cérebro, os quais foram armazenados em tubos tipo eppendorf e congelados em freezer. Foram utilizados quantidades de exemplares de piau três pintas (n=10), pirambeba (n=11), sarapó (n=11) e traíra (n=9). Os órgãos de cada exemplar foram analisados individualmente. Uma amostra de fígado foi pesada e homogeneizada em tampão fosfato de sódio 0,1 mol. L⁻¹ pH 7,4 na proporção de 1/10 (massa em g/ volume em mL), sendo posteriormente centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi separado e congelado para as determinações das atividades das enzimas catalase e GSH-Px e a concentração de hidroperóxidos, tióis totais e proteínas solúveis. Para a análise da AChE foi pesada uma massa do tecido do cérebro (200 mg) e homogeneizada em tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,5 numa proporção de 1/3 (massa em g/ volume em mL), sendo em seguida centrifugada em 10.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado sob refrigeração para as análises da atividade da AChE.

4.3 Análises Enzimáticas

4.3.1 Determinação da atividade da AChE

A atividade da AChE foi determinada pela cinética de formação da tiocolina através da hidrólise do iodeto de acetiltiocolina catalisada pela enzima (ELLMAN et al., 1961). O ensaio foi conduzido em espectrofotômetro em comprimento de onda de 412 nm e 37 °C , com 20 µL de homogenato de cérebro; 1,25 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹ pH 7,5) e 125 µL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (1.10⁻³ mol.L⁻¹). A mistura reacional continha DTNB em excesso, o qual reage com a tiocolina para formar o cromóforo correspondente. A GSH foi utilizada como padrão.

A atividade foi apresentada por U/ mg de proteína, onde U foi determinado como o aumento da concentração de tiocolina em nmol por minuto (nmol.min⁻¹).

4.3.2 Análises das atividades das enzimas antioxidantes

4.3.2.1 Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada através da decomposição do H₂O₂, segundo Aebi (1974). O meio reacional continha 20 µL de homogenato de fígado diluído a 10% (v/v) e 980 µL de H₂O₂ 0,025 mol.L⁻¹ em tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4. A reação foi monitorada em espectrofotômetro a 240 nm por 50 segundos. Uma curva padrão de H₂O₂ foi utilizada para o cálculo da atividade.

A atividade foi determinada em U/ mg de proteína, onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de H₂O₂ em µmol decomposto por minuto.

4.3.2.2 Determinação da atividade da GSH-Px

A GSH-Px teve sua atividade determinada segundo o procedimento descrito por Hafman (1974). A GSH foi utilizada como substrato, o qual sofre oxidação na presença de H₂O₂, onde a atividade da enzima é obtida pela quantidade de GSH não oxidado quantificada ao final da reação.

Inicialmente foi preparada uma mistura reacional contendo homogenato do fígado (10 µL) (10%), tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4 (100 µL), azida de sódio 0,01 mol.L⁻¹ (50 µL), para evitar a decomposição do H₂O₂ pela catalase, GSH 2. 10⁻³ mol.L⁻¹ (100 µL) e

água (140 μL), totalizando um volume de 400 μL . A mistura foi pré-incubada por cinco minutos. Em seguida, adicionou-se 100 μL de H_2O_2 ($1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e a mistura foi incubada em diferentes tempos, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 400 μL de solução de precipitação contendo H_3PO_4 (1,67%), EDTA (0,2%) e saturada com NaCl. Em seguida a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos. Em 400 μL do sobrenadante foram adicionados 400 μL de Na_2HPO_4 ($0,4 \text{ mol.L}^{-1}$) e 200 μL de ácido DTNB ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$). Após 15 minutos procedeu-se com a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. A GSH foi utilizada como padrão.

A atividade da GSH-Px foi expressa em U/ mg de proteína, sendo uma unidade de atividade igual a um micromol de glutathiona oxidada por minuto ($\mu\text{mol.min}^{-1}$).

4.4 Determinação dos Níveis de Hidroperóxidos (HP)

A peroxidação lipídica pode ser aferida através dos níveis de HP. A oxidação do ferro II (Fe^{2+}) a ferro III (Fe^{3+}) em meio ácido foi utilizada para determinar a concentração desses produtos de lipoperoxidação. O Fe^{3+} ao ser formado é complexado pelo alaranjado de xilenol, gerando um complexo que absorve em 560 nm (Wolff, 1994).

Foi preparada uma solução (reagente de Fox) contendo alaranjado de xilenol ($2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), sulfato ferroso de amônia ($5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), BHT (butilato hidroxitolueno) ($8,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e H_2SO_4 ($0,025 \text{ mol.L}^{-1}$) em 90% de metanol. Para a reação foram utilizados o homogenato de fígado (100 μL) e o reagente de Fox (900 μL). O meio reacional foi abrigado da luz à temperatura ambiente e após 30 minutos prosseguiu-se com a leitura das amostras em espectrofotômetro a 560 nm.

Os níveis de HP foram expressos em nmol.mg de proteína⁻¹.

4.5 Determinação dos Níveis de Tióis Totais (TT)

A quantidade de TT foi dosada com base na oxidação dos grupamentos tióis causada pelo DTNB (Ellman, 1959). Ao homogenato de tecido hepático (100 μL) foram acrescidos tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,5 (800 μL), DTNB $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (200 μL) e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se com a leitura da mistura a 412 nm. GSH foi utilizada como padrão.

A concentração de tióis totais foi dada como nmol.mg de proteína⁻¹.

4.6 Dosagem de Proteína

A concentração de proteína no homogenato foi determinada pelo método de Bradford (1976), que utiliza o corante azul brilhante de coomassie. O meio reacional foi constituído de 50 µL do homogenato de tecido (cerebral e hepático) e 1,5 mL de Reagente de Bradford. O método consistiu na reação entre o corante e a proteína. No pH da mistura reacional a interação resultante promove o deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica, a qual absorve em 595 nm (Zaia et al., 1998). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração utilizada no cálculo para a determinação da concentração de proteína.

4.7 Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando-se análise de variância (ANOVA) com o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) adotando um p-valor referencial de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Peso Médio

A Tabela 1 apresenta os valores dos pesos médios obtidos para as espécies estudadas. Os valores médios dos pesos não apresentaram grandes diferenças entre as quatro espécies (Figura 8), sendo o piau três pintas a que teve o maior peso médio registrado e que mais apresentou variação. A pirambeba apresentou o menor valor desse parâmetro.

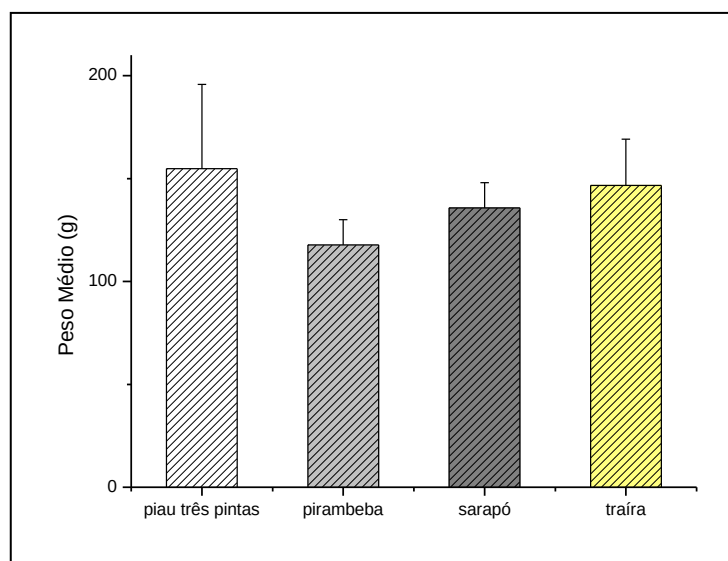
Tabela 1- **Peso médio (g) dos peixes em estudo. Os valores apresentados são média $\pm$ erro padrão ($\mu \pm Ep$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV).**

<i>Espécie</i>	PESO (g)		
	$\mu \pm Ep$	σ	CV
Piau três pintas	154,79 $\pm$ 40,99	129,61	83,74
Pirambeba	117,79 $\pm$ 12,28	40,73	34,58
Sarapó	135,71 $\pm$ 12,34	40,93	30,16
Traíra	146,67 $\pm$ 22,47*	63,54	43,32

As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. * significativo.

A análise de variância mostrou que a traíra apresentou diferenças significativas do peso médio entre os meses de coleta estudados. As demais espécies não exibiram esse comportamento.

Figura 8- **Valores médios dos pesos (g) dos peixes analisados.**



5.2 Atividade da AChE

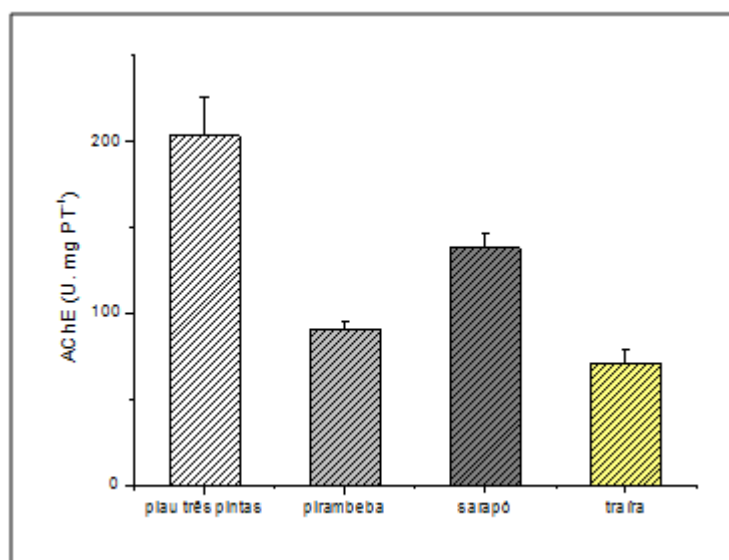
Entre os valores médios de atividade da AChE encontrados para as quatro espécies estudadas, o piauí três pintas apresentou atividade de ordem superior às demais espécies, com média de $203,36 \text{ U.mg proteína}^{-1}$. A traíra exibiu o menor valor ($70,90 \text{ U.mg proteína}^{-1}$). Estas observações podem ser verificadas na Tabela 2 e na Figura 9. A atividade da AChE variou semelhantemente entre as espécies piauí três pintas e traíra e entre pirambeba e sarapó, sendo estas últimas as que menos apresentaram variações desta variável. A pirambeba foi a espécie que sofreu mudanças significativas na atividade da AChE entre os meses de estudo.

Tabela 2- Atividade da AChE ($\text{U.mg proteína}^{-1}$) no cérebro. Os valores apresentados são média $\pm$ erro padrão ($\mu \pm \text{Ep}$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV).

<i>Espécie</i>	AChE (U.mg proteína ⁻¹)		
	$\mu \pm Ep$	σ	CV
Piau três pintas	203,36 $\pm$ 22,90	64,76	31,84
Pirambeba	90,31 $\pm$ 5,45*	15,43	17,08
Sarapó	138,01 $\pm$ 8,61	24,36	17,65
Traíra	70,90 $\pm$ 7,66	21,68	30,57

As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. * significativo.

Figura 9- Valores médios da atividade da AChE (U.mg proteína⁻¹) no cérebro.



5.3 Atividade da Catalase

Na tabela 3 estão apresentados os valores das atividades da catalase no fígado de piau três pintas, pirambeba, sarapó e traíra. Entre os meses de coletas realizadas o piau três pintas teve a maior atividade da catalase (825,65 U.mg proteína⁻¹) em relação às demais espécies. Além disso, o piau três pintas foi o peixe que mais sofreu variação desse parâmetro durante o período estudado. Pirambeba, sarapó e traíra apresentaram variabilidades semelhantes. Este comportamento também pode ser verificado na Figura 10.

Tabela 3- Atividade da catalase (U.mg proteína⁻¹) no fígado. Os valores apresentados são média $\pm$ erro padrão ($\mu \pm Ep$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV).

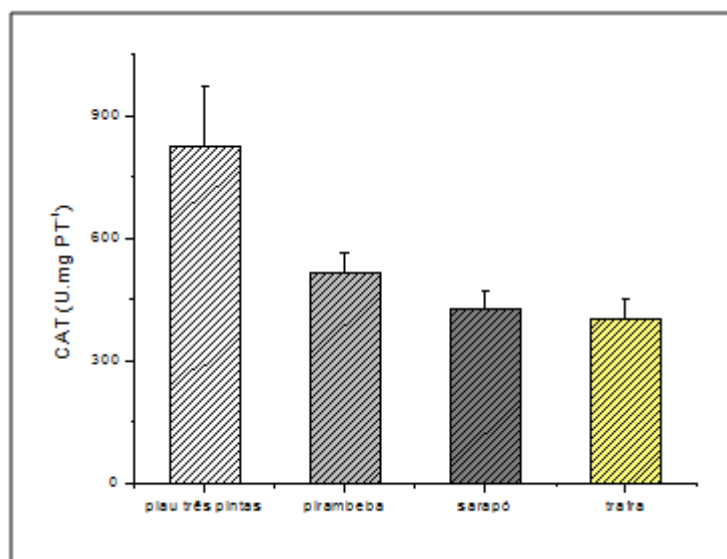
<i>Espécie</i>	CATALASE ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$)		
	$\mu \pm \text{Ep}$	σ	CV
Piau três pintas	825,65 $\pm$ 145,26**	435,79	52,78
Pirambéba	516,68 $\pm$ 47,99*	159,16	30,80
Sarapó	425,82 $\pm$ 47,11	156,25	39,69
Traíra	400,96 $\pm$ 49,66	140,47	35,03

As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. * significativo.

**altamente significativo

Na avaliação do efeito de mês, verificou-se que piau três pintas e pirambéba apresentaram diferenças significativas na atividade da catalase entre os meses estudados, sendo que sarapó e traíra não tiveram diferenças estatísticas na atividade dessa enzima.

Figura 10- Valores médios da atividade da catalase ($\text{U} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) no fígado.



5.4 Atividade da GSH-Px

O piau três pintas exibiu a maior atividade para a GSH-Px entre todas as espécies (Figura 11). A traíra apresentou a menor variação e o menor valor de atividade média da GSH-Px. A atividade da GSH-Px apresentou diferenças significativas em piau três pintas e sarapó.

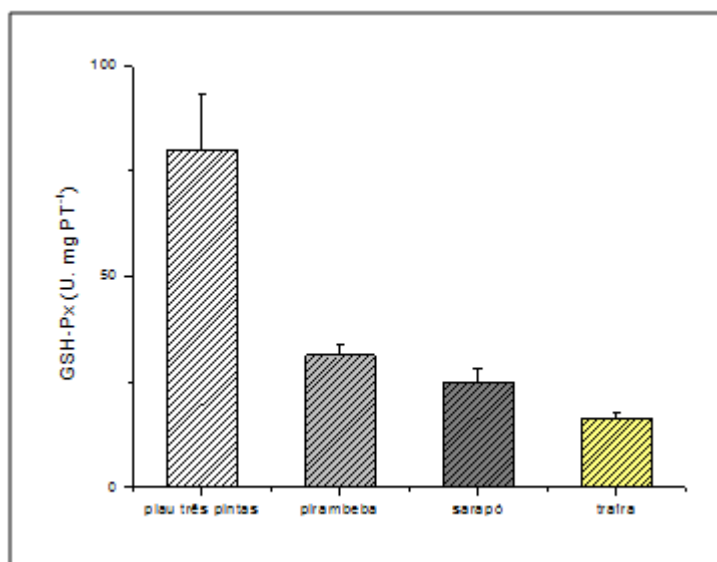
Tabela 4- **Atividade da GSH-Px (U.mg proteína⁻¹) no fígado. Os valores apresentados são média $\pm$ erro padrão ($\mu \pm Ep$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV).**

<i>Espécie</i>	GSH-Px ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$)		
	$\mu \pm Ep$	σ	CV
Piau três pintas	80,10 $\pm$ 13,19*	41,72	52,08
Pirambeba	31,31 $\pm$ 2,49	8,25	26,33
Sarapó	24,88 $\pm$ 3,34**	11,09	44,57
Traíra	16,42 $\pm$ 1,17	3,32	20,23

As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. * significativo.

**altamente significativo

Figura 11- **Valores médios da atividade da GSH-Px (U.mg proteína⁻¹) no fígado.**



5.5 Níveis de HP

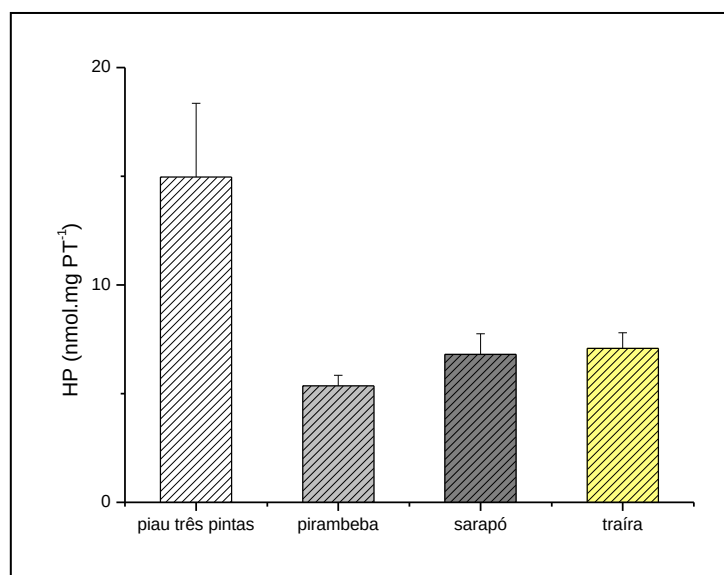
A tabela 5 apresenta os valores médios dos níveis de HP no fígado das espécies analisadas. No piau três pintas foi encontrada concentração de HP bastante elevada quando comparada com os valores obtidos nas demais espécies (Figura 12), sendo o peixe que mais variou os níveis desse subproduto ao longo do período avaliado. A pirambeba exibiu o menor nível de HP no fígado. Pirambeba e sarapó apresentaram diferenças significativas destes níveis entre os meses de coleta.

Tabela 5- **Concentração de HP (nmol.mg proteína⁻¹) no fígado. Os valores apresentados são média $\pm$ erro padrão ($\mu \pm Ep$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV).**

<i>Espécie</i>	HP (nmol.mg proteína ⁻¹)		
	$\mu \pm Ep$	σ	CV
Piau três pintas	14,96 $\pm$ 3,40	10,77	72,01
Pirambeba	5,36 $\pm$ 0,49**	1,64	30,61
Sarapó	6,80 $\pm$ 0,95**	3,0	44,11
Traíra	7,08 $\pm$ 0,72	2,04	28,78

As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. **altamente significativo

Figura 12- **Valores médios da concentração de HP hepáticos (nmol.mg proteína⁻¹).**



5.6 Níveis de TT

Os valores dos níveis de TT exibiram menor variação quando comparados aos distanciamentos verificados entre os valores observados nos dados de atividade das três enzimas avaliadas nas quatro espécies. Além disso, as concentrações desse subproduto do metabolismo oxidativo não apresentaram grandes distanciamentos entre os valores obtidos entre as espécies estudadas (Figura 13).

O sarapó exibiu o maior nível de TT e a traíra o menor. Este foi o único parâmetro em que o piau três pintas não apresentou o maior valor, porém não foi muito distante do maior encontrado, no sarapó. Estas informações podem ser mais bem visualizadas na Tabela 6.

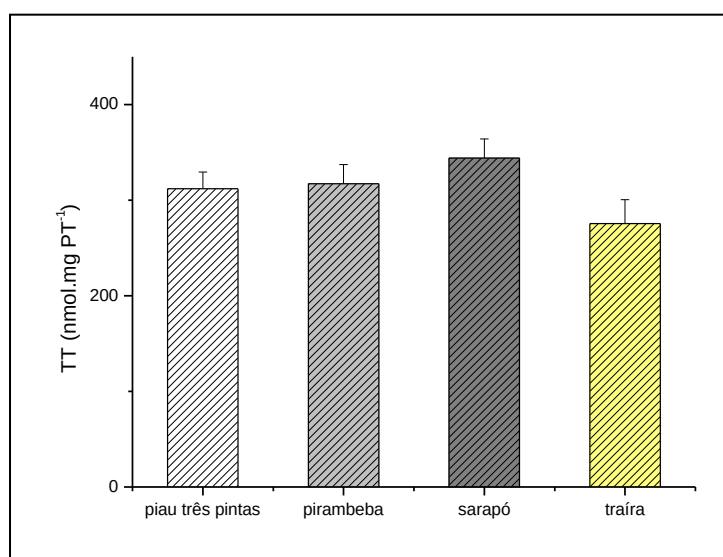
Tabela 6- **Concentração de TT (nmol.mg proteína⁻¹) no fígado. Os valores apresentados são média $\pm$ erro padrão ($\mu \pm Ep$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV).**

<i>Espécie</i>	TIÓIS TOTAIS (nmol.mg proteína ⁻¹)		
	$\mu \pm Ep$	σ	CV
Piau três pintas	311,87 $\pm$ 17,44	55,14	17,68
Pirambeba	317,31 $\pm$ 20,04*	66,46	20,95
Sarapó	343,98 $\pm$ 20,08	66,60	19,36
Traíra	275,52 $\pm$ 25,02*	70,78	25,69

As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. * significativo.

A análise de variância apontou que pirambeba e traíra apresentaram diferenças estatísticas dos níveis de TT (Tabela 6).

Figura 13- **Valores médios da concentração de TT hepáticos (nmol.mg.proteína⁻¹).**



6 DISCUSSÃO

Inúmeros fatores podem ter contribuído para induzir mudanças nas atividades das enzimas estudadas e nos níveis de subprodutos do estresse oxidativo avaliados. Fatores como o tempo em que os animais capturados permaneceram presos nas redes, temperatura da água, concentração de oxigênio, a presença e concentração de espécies químicas poluentes, o hábito alimentar e o estado de maturação dos peixes, entre outros fatores ambientais e fisiológicos, podem ter contribuído para os elevados índices de variações observados nos parâmetros analisados.

Com base no índice de relatos na literatura dos efeitos de uma enorme gama de substâncias sobre a atividade da AChE, parece que esta enzima possui sensibilidade a um maior número de contaminantes do que as enzimas antioxidantes. Isso pode ter relação com a menor tendência de variação de atividade apresentada pela AChE quando comparada com as demais enzimas estudadas, uma vez que os peixes de uma determinada espécie seriam mais semelhantemente afetados pelos xenobióticos presentes na água sobre a AChE do que com relação às enzimas antioxidantes.

Ao longo das estações do ano, as propriedades físico-químicas de um ambiente aquático podem sofrer significativas variações. A diminuição do nível de rios e lagos em períodos de estiagem, bem como as cheias em períodos chuvosos, alteram as concentrações das diversas substâncias dissolvidas na água. Estas mudanças são capazes promover alterações fisiológicas nos peixes, as quais podem depender da concentração de xenobióticos na água nesses tipos de ambientes. Devido a isso, é possível verificar diferenças nos valores de atividade da AChE em monitoramentos realizados com a enzima em períodos que abrangem diferentes épocas do ano.

Em um ambiente como o rio São Francisco, onde a prática da agricultura é bastante comum em suas margens, é provável que seja possível a entrada de componentes agrícolas como herbicidas e pesticidas. Foi constatado que um baixo tempo de exposição do organismo a herbicidas é suficiente para alterar significativamente a atividade da AChE em cérebros e fígado de peixe (DE LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2002; PINER; ÜNER, 2012).

Em testes realizados com piau (*Leporinus obtusidens*) exposto a um herbicida (clomazone) amplamente utilizado em campos de arroz no sul do Brasil, a AChE apresentou diminuição da atividade em tecidos de quatro órgãos analisados, cérebro, músculo, olho e coração (MIRON et al., 2008). Em geral, o tecido do cérebro apresenta maior atividade para a AChE do que os tecidos de outros órgãos (CHUIKO; PODGORNAYA; ZHELNIN, 2003; CORSI et al., 2003; GLUSCZAK et al., 2006; MIRON et al., 2008; MORAIS et al., 2007).

Diminuição na atividade da AChE cerebral ocorreu com a exposição de piau (*Leporinus obtusidens*) ao herbicida glifosato, ao contrário do músculo, onde a enzima não sofreu significativas variações na atividade (GLUSCZAK et al., 2006). Piau (*Leporinus obtusidens*) exposto ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) exibiu diminuição na atividade da AChE em tecidos de cérebro e músculo. Na mesma avaliação foram encontrados cerca de 60% de 2,4-D na água após a exposição dos animais, relacionando, assim, a diminuição da atividade enzimática com a presença do herbicida ou seus metabólitos na água (FONSECA et al., 2008).

Um trabalho realizado com duas espécies de peixe (*Cyprinus carpio* e *Cnesterodon decemmaculatus*) no rio Reconquista, um dos cursos de água mais poluídos da Argentina, revelou diminuição da atividade da AChE em cérebros de duas amostras de animais, uma confinada no rio e outra constituída de peixes capturados, comparadas a um controle experimental testado. O perfil físico-químico da água mostrou que o local estudado era um sítio poluído, revelando a presença de alguns metais pesados em elevadas concentrações (DE LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2002).

A atividade de AChE cerebral em pirarucu (*Arapaima gigas*), cobia (*Rachycentron canadum*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*), manteve-se inalterada na faixa de pH entre 7,5 e 8,0, considerada como ideal para as condições do trabalho, apresentando redução em pH superior a 8,5 (ASSIS et al., 2012). Isto mostra que o potencial hidrogeniônico da água exerce forte influência sobre esse parâmetro fisiológico.

O piau três pintas apresentou os maiores valores de atividade para a catalase nos períodos de coleta (Tabela 3). Os últimos meses de coleta estão compreendidos em um período chuvoso da região, logo, essa resposta pode estar relacionada com as cheias do Rio São Francisco no estado de Alagoas que, além de dissolver componentes de agrotóxicos presentes em solos nas proximidades do rio, resultantes de práticas agrícolas desenvolvidas às margens, também pode condiciona a entrada de muitos outros materiais. Tais contaminantes podem induzir o estresse oxidativo, o qual pode ser evidenciado por alterações nas atividades de enzimas antioxidantes, como a catalase, SOD e GSH-Px.

Foi constatado por Mirion et al. (2008) que a catalase hepática em piau (*Leporinus obtusidens*) sofreu redução em sua atividade quando exposta ao herbicida clomazone. Moraes et al. (2007) testando o herbicida clomazone e propanil em piau (*Leporinus obtusidens*) e verificou o aumento da atividade da catalase após a exposição. Monteiro (2011) avaliando os efeitos da contaminação alimentar por mercúrio sobre biomarcadores do estresse oxidativo em

traíras (*Hoplias malabaricus*), observou um aumento de 285 % na atividade da catalase no fígado e de 51 % no músculo.

Trabalho conduzido por Amado et al. (2006) com curvinas (*Micropogonias furnieri*) de dois sítios do estuário da lagoa de Patos, no sul do Brasil, um poluído e outro não afetado por poluição, mostraram que a catalase exibiu diferenças de atividade entre duas estações do ano. Em coletas realizadas no inverno na região não poluída da lagoa, a enzima apresentou valor de atividade inferior ($40,0 \pm 4,5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{proteína}^{-1}$) ao encontrado no verão do mesmo ano ($90,8 \pm 13,2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{proteína}^{-1}$). Curvinas do local poluído mostraram atividade da catalase significativamente mais elevada no verão ($130,0 \pm 12,0 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{proteína}^{-1}$) do que as coletadas no inverno ($40,5 \pm 4,0 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{proteína}^{-1}$).

Semelhantemente à atividade da catalase do piau três pintas, a atividade da GSH-Px foi maior nessa espécie (Tabela 4). Ambas as enzimas atuam na degradação de H_2O_2 convertendo-o em água e oxigênio molecular. Isto faz parte de um mecanismo de desintoxicação da célula que visa protegê-la dos efeitos nocivos causados pela produção excessiva de H_2O_2 (BAGNYUKOVA et al, 2005).

A catalase compete com a glutathione peroxidase na desintoxicação celular de peróxido de hidrogênio (VALKO et al., 2007).. Neste caso, provavelmente a elevada atividade da GSH-Px do piau três pintas entre as quatro espécies pode ser um indicativo de elevadas quantidades de H_2O_2 produzido, o que justificaria também a alta atividade da catalase na mesma espécie. Elevada atividade da GSH-Px pode está relacionada com um importante desempenho da espécie em destruir o H_2O_2 produzido como resultado de flutuações na concentração do oxigênio dissolvido e consumo de nutrientes (CUNHA BASTOS et al, 2007).

Monteiro (2011), estudando os efeitos da contaminação alimentar e sub-crônica por mercúrio inorgânico em traíras, registrou aumento na atividade da GSH-Px no fígado (30%) e no músculo branco (180%). Também foi constatado que o mercúrio induziu um desequilíbrio entre a produção de EROs e a atividade do mecanismo de defesa antioxidante do organismo, levando, conseqüentemente, à formação de lesões oxidativas. O mesmo autor, avaliando os efeitos da exposição de matrinxã (*Brycon amazonicus*) ao cloreto de mercúrio verificou um aumento na atividade da GSH-Px de 23% no fígado, 33% nas brânquias e 35 % no músculo branco.

Um aumento significativo na atividade da GSH-Px foi verificado em traíras expostas a saxitoxina, uma neurotoxina solúvel em água que pode ser produzida por cianobactérias, mostrando que a via antioxidante foi estimulada (SILVA DE ASSIS et al., 2013). Em outra

avaliação com a mesma espécie, Da Silva et al. (2011), observaram diminuição na atividade da GSH-Px exposta a saxitoxina.

A atividade da GSH-Px em fígado de killifish (*Fundulus heteroclitus*) apresentou aumento com a elevação da temperatura de aclimação, provavelmente devido ao aumento do metabolismo associado à elevação da temperatura, indicando que a temperatura pode induzir a produção de EROs (LEGGATT et al., 2007).

Diante do exposto, evidencia-se que o monitoramento de enzimas do estresse oxidativo e da AChE pode ser um potente sinalizador do meio aquático e das condições de saúde dos animais.

O fato de os maiores níveis de HP serem registrados no piaú três pintas pode ter alguma relação com a enzima antioxidante GSH-Px. O piaú três pintas, apresentou a maior atividade para esta enzima (Tabela 4). Isto coincidiu com a observação verificada na análise dos níveis de HP, que também exibiram este comportamento (Tabela 5). As atividades da GSH-Px e da catalase estão intimamente relacionadas com a produção de HP (VALKO et al., 2007). A GSH-Px também utiliza H_2O_2 e peróxidos orgânicos como substratos, decompondo-os em água e álcool, respectivamente, e ao mesmo tempo oxidando GSH. Os hidroperóxidos de lipídeos formados no processo de peroxidação lipídica são degradados pela GSH-Px na presença de GSH (Figura 6) (VALKO et al., 2007). Logo, altos níveis desses HP podem implicar no aumento da atividade da GSH-Px.

Aumento nos níveis de HP foi registrado em hepatócitos de traíra (*Hoplias malabaricus*) exposta a alguns poluentes, dentre eles o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano). Concomitantemente a esta observação verificou-se o aumento na produção de H_2O_2 no fígado (FILIPAK NETO, 2008). O H_2O_2 é uma ERO que pode estar relacionada com a produção de HP. Os radicais $\bullet OH$ podem ser produzidos na presença de ferro pela reação de Fenton (Reação 1), os quais passam a reagir com diversas biomoléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005). Os ataques aos lipídeos promovidos por esta ERO levam a formação dos HP de lipídeo (VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005).

Curvinas (*Micropogonias furnieri*) de um sítio não poluído da lagoa de Patos, no sul do Brasil, apresentaram maior teor significativo de HP de lipídeos hepático no verão do que as coletadas no inverno do mesmo local. Em uma avaliação simultânea, curvinas de um sítio poluído da mesma lagoa não exibiram diferenças significativas nos níveis de HP de lipídeos entre os animais capturados no verão e inverno. Diferenças entre os dois sítios foram

encontradas apenas no verão, quando na área não poluída foram registrados os maiores níveis de HP (AMADO et al., 2006).

Tagliari et al (2004) registraram níveis significativamente maiores de TBARS no fígado de animais capturados em uma área poluída de uma lago afetado por contaminação industrial, urbana e agrícola, quando comparados aos obtidos de animais do local de referência.

Da Silva et al. (2011) verificaram aumento nos níveis de HP em traíra (*Hoplias malabaricus*) exposta à saxitoxinas, sugerindo o comprometimento da integridade da membrana celular após a exposição. Semelhantemente, Silva de Assis et al. (2013) avaliou o processo de peroxidação lipídica pela concentração de HP de lipídeo no fígado de traíra causada pela exposição a saxitoxinas. O autor constatou a ocorrência desse processo oxidativo no tecido hepático, sugerindo que saxitoxinas podem causar danos à membrana do fígado.

Trabalho realizado por Sampaio et al. (2012) mostrou que a exposição ao cobre sob condições de hipercambia induziu estresse oxidativo em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), e que a utilização de biomarcadores como enzimas antioxidantes e a concentração de HP está condicionado às condições físico-químicas da água.

A formação elevada de produtos de HP é um indicativo da ocorrência do processo de peroxidação lipídica, o qual pode ser induzido pela presença de xenobióticos na água (FERREIRA et al., 2010). Estudos anteriores têm revelado que o índice de estresse oxidativo causado por xenobióticos depende do tipo de poluente avaliado e do tecido afetado (STARA et al., 2013).

Variações da temperatura da água podem alterar o metabolismo redox dos peixes resultando em alterações nas concentrações de indicadores bioquímicos do estresse oxidativo (BAGNYUKOVA et al., 2007; LEGGATT et al., 2007). Tecido hepático e muscular de *Platichthys stellatus* apresentou redução na concentração de tióis após exposição ao calor por 6 e 12 horas, respectivamente, sendo que no músculo, o conteúdo de tióis caiu dramaticamente até não ser mais possível sua detecção (BAGNYUKOVA et al., 2007). Lushchak e Bagnyukova (2006) estudando os efeitos do aumento da temperatura sobre o índice de estresse oxidativo em quatro tecidos de kinguio (*Carassius auratus*) constataram aumento das concentrações de tióis de baixo peso molecular no cérebro, rim e músculo, sendo que os tecidos hepático e muscular foram os únicos a apresentar aumento dos níveis de tióis de elevado peso molecular (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). Tensões causadas por deltametrina e estresse induzido por elevação da temperatura alteraram significativamente o conteúdo de GSH em *Channa punctata* (KAUR et al., 2011).

A concentração de tióis de baixo peso molecular sofreu diminuição em tecido cerebral, muscular e hepático de *Perccottus glenii* submetidos à baixa concentração de oxigênio. O cérebro não apresentou alteração significativa nos níveis de tióis proteicos. Com relação ao fígado e músculo, em ambos os tecidos os níveis de tióis proteicos foram significativamente reduzidos pela hipoxia (LUSHCHAK ; BAGNYUKOVA, 2007).

O nível de tióis pode ser afetado pela ação de xenobióticos sobre o organismo do animal. Tióis biologicamente ativos são caracterizados pela presença de resíduos sulfidrilos. Há relatos de que o grupo funcional sulfidril apresenta um importante papel no processo de desintoxicação do organismo causada por xenobióticos (DUH et al., 2009).

A exposição de kinguio (*Carassius auratus*) ao cobalto (Co^{2+}) elevou o conteúdo de tióis em proteínas nas brânquias e no baço do animal. Nas brânquias, a exposição induziu um aumento de 71% dos níveis de tióis em relação ao controle experimental, ao passo que no baço este conteúdo foi mais fortemente afetado pelo cobalto, onde aumentos desta ordem foram registrados com exposição a concentrações mais baixas do metal testado (KUBRAK et al., 2012).

A atuação dos tióis como agente redutor constitui o papel biológico mais importante dessas espécies químicas em sistemas celulares. Um exemplo desta função consiste na participação dos tióis biológicos em processos de desintoxicação celular, regulando o estado redox intracelular para proteger a célula contra a ação de xenobióticos tóxicos (DUH et al., 2009). Porém, as determinações individuais de parâmetros bioquímicos não são suficientes para avaliar a influência de fatores ambientais sobre o metabolismo de xenobióticos (BAGNASCO et al., 1991).

7 CONCLUSÕES

As enzimas antioxidantes catalase e GSH-Px exibiram mudanças em suas atividades entre os meses estudados para as quatro espécies, sendo piauí três pintas a que apresentou os

maiores valores para ambas as enzimas. Logo, este comportamento ao longo do período de estudo tendeu a apontar características potenciais dessas enzimas como indicadores bioquímicos ambientais.

Os níveis dos subprodutos do metabolismo oxidativo avaliados, TT e HP, registrados para as quatro espécies, apresentaram mudanças entre os meses de coleta. Os níveis de tióis totais apresentaram a menor variação entre todos os parâmetros avaliados em todas as espécies estudadas, incluindo as enzimas analisadas.

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que a atividade da AChE cerebral sofreu alterações ao longo dos meses de estudos e apresentou diferentes tendências entre as espécies estudadas. O piau três pintas foi a espécie que apresentou os maiores valores de atividade para esta enzima.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Methods of enzymatic analysis. **London: Academic Press**. V. 1, p.137-158, 1974.

AL GHOULEH, I. et al. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: New concepts in reactive oxygen species signaling. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 51, p. 1271-1288, 2011.

ALEXANDROVA, M. et al. Acetylcholinesterase in the rat neurohypophysis is decreased after dehydration and released by stimulation of the pituitary stalk. **Neuroscience**. v. 21, p. 421-427, 1987.

AL-GUBORY, K.H.; FOWLER, P.A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 42, p. 1634-1650, 2010.

AL-GUBORY, K.H. et al. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 25, p. 551-560, 2012.

ALVES, M.F.; LEÃO, F.P.; POMPEU, P.S. Alimentação do piau-três-pintas *Leporinus reinhardti* (lütken, 1874) (Anostomidae, Characiformes). **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. 23- 28 de Setembro de 2007, Caxamba- MG.

ALVES COSTA, J.R.M. et al. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 67, p. 82–88, 2007.

AMADO, L.L. et al. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Marine Pollution Bulletin**. v. 52, p. 199–206, 2006.

ASSIS, C.R.D. et al. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment**. v. 441, p. 141- 150, 2012.

ATLI, G. et al. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 143, p. 218-224, 2006.

BAGNASCO, M. et al. Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted seawater. **Mutation Research**. v. 262, p. 129-137, 1991.

BAGNYUKOVA, T.V. et al. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. **Brain Research**. v. 1052, p. 180-186, 2005.

BAGNYUKOVA, T.V. et al. Heat shock induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. **Journal of Thermal Biology**. v. 32, p. 255–260, 2007.

BERNARD, V. et al. Analysis of the neurons expressing the acetylcholinesterase gene in the rat brain, with special reference to the striatum. **Neurosciencen**. v. 64, p. 995-1005, 1995.

BEYER, W.F., JR.; FRIDOVICH, I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. **Analytical Biochemistry**. v. 161, p. 559-566, 1987.

BOTTÉ, E.S. et al. Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. **Marine Pollution Bulletin**. v. 65, p. 384-393, 2012.

BOVERIS, A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 78, 67–82, 1977.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**. v. 34, 707–717, 1973.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BUČKOVÁ, M. et al. Production of catalases by *Aspergillus niger* isolates as a response to pollutant stress by heavy metals. **Current Microbiology**. v. 50, 175–179, 2005.

BUČKOVÁ, M. et al. Isolates of *Comamonas* spp. exhibiting catalase and peroxidase activities and diversity of their responses to oxidative stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 73, p. 1511–1516, 2010.

BULLOCK, T.H. et al. Aspectos do uso de descarga do órgão elétrico e eletrorrecepção nos Gymnotoidei e outros peixes amazônicos. **Acta Amazônica**. v. 9, p. 549-572, 1979.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M.L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**. v. 15, p. 186-190, 2010.

BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. **Toxicology in Vitro**. v. 24, p. 1491–1497, 2010.

CHUIKO, G.M.; PODGORNAYA, V.A.; ZHELNIN, Y.Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 135, p. 55–61, 2003.

CHERNYAK, B.V. et al. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1757, p. 525-534, 2006.

CORSI, I. et al. Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon, Italy. **Marine Pollution Bulletin**. v. 46, p. 203–212, 2003.

CREMLYN, R. Pesticides, John Wiley and Sons, New York. p. 159-212, 1978.

CUNHA BASTOS, V.L.F. et al. Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. **Biochimie**. v. 89, p. 1332-1342, 2007.

DA SILVA, C.A. et al. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. **Toxicon**. v. 57, p. 141–147, 2011.

DAVID, M. et al. Impact of sodium cyanide on catalase activity in the freshwater exotic carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 92, p. 15-18, 2008.

- DE LA TORRE, F.R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 131, p. 271–280, 2002.
- DE LIMA, D.; ROQUE, G.M.; ALMEIDA, E.A. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**. v. 30, p. 1-7, 2012.
- DI ILIO, C. et al. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in cancerous and non-cancerous human kidney tissues. **Cancer Letters**. v. 91, p. 19-23, 1995.
- DOS SANTOS SILVA, D. et al. conserved karyotype of *Sternopygus macrurus* (Sternopygidae, Gymnotiformes) in the Amazon region: Differences from other hydrographic basins suggest cryptic speciation. **Micron**. v. 39, p. 1251-1254, 2008.
- DUH, P.-D. et al. Effects of three biological thiols on antimutagenic and antioxidant enzyme activities. **Food Chemistry**. v. 114, p. 87–92, 2009.
- ELLMAN, G.L. Tissue sulphydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 82, p. 70-77, 1959.
- ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p. 88–95, 1961.
- FABRÍCIO, L.F.F. et al. Elaboração de caldo de peixe em cubos compactados utilizando pirambeba (*Serrasalmus brandtii*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**. v. 34, p. 241-252, 2013.
- FATTMAN, C.L.; SCHAEFER, L.M.; OURY, T.D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 35, p. 236-256, 2003.
- FERREIRA, D. et al. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. **Chemosphere**. v. 79, p. 914–921, 2010.
- FILIPAK NETO, F. et al. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. **Toxicology in Vitro**. v. 22, p. 1705–1713, 2008.
- FLORA, S.J.S. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 51, p. 257-281, 211.
- FONSECA, M.B. et al. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 69, p. 416–420, 2008.
- GIODA, C.R. et al. Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere**. v. 69, p. 170-175, 2007.
- GLUSCZAK, L. et al. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 65, p. 237–241, 2006.
- GODOČÍKOVÁ, J. et al. Production of catalases by *Comamonas* spp. and resistance to oxidative stress. **Folia Microbiol.** v. 50, 113–118, 2005.

GUILHERME, S. et al. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 743, p. 1-9, 2012.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 393, p. 561-564, 2010.

HACKENBERGER, B.K. et al. The effect of formalin on acetylcholinesterase and catalase activities, and on the concentration of oximes, in the earthworm species *Eisenia andrei*. **European Journal of Soil Biology**. v. 50, p. 137-143, 2012.

HAFEMAN, D.G.; SUNDE, R.A.; HOEKSTRA, W.G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **The Journal of Nutrition**. v. 104, p. 580-587, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **American Journal of Medicine**. v. 91, p. 14-22, 1991.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M.V.; LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **Federation of European Biochemical Societies**. v. 486, p. 10-13, 2000.

HALLIWELL, B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? **Federation of European Biochemical Societies**. V. 540, p.3-6, 2003.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 476, p. 107-112, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – *quo vadis*? **Trends in Pharmacological Sciences**. V. 32, p 125-130, 2011.

HEISE, K. et al. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 134, p. 79-90, 2003.

HOARAU, P. et al. Effect of three xenobiotic compounds on Glutathione S-Transferase in the clam *Ruditapes decussates*. **Aquatic Toxicology**. v. 68, p. 87-94, 2004.

IKEDA, K. et al. Purification and characterization of canine manganese superoxide dismutase and its immunohistochemical localization in canine heart compared with that of copper-zinc superoxide dismutase. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 27, p. 1257-1265, 1995.

INESTROSA, N.C.; MORENO, R.D.; FUENTES, M-E. Monomeric amphiphilic forms of acetylcholinesterase appear early during brain development and may correspond to biosynthetic precursors of the amphiphilic G₄ forms. **Neuroscience Letters**. v. 173, p. 155-158, 1994.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**. v. 283, p. 65-87, 2011.

KAUR, M. et al. The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**. v. 193, p. 216–224, 2011.

KAUR, K. et al. Chemodosimeters: An approach for detection and estimation of biologically and medically relevant metal ions, anions and thiols. **Coordination Chemistry Reviews**.v. 256, p. 1992-2028, 2012.

KELLY, S. et al. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine models. **Environmental Health Perspect.** v. 106, p. 375– 384, 1998.

KOEHLER, A. et al. Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder (*Platichthys flesus* (L.)). **Acta Histochemica**. v. 106, p. 155-170, 2004.

KRYSTON, T.B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**. v. 711, p. 193-201, 2011.

KUBRAK, O.I. et al. Goldfish exposure to cobalt enhances hemoglobin level and triggers tissue-specific elevation of antioxidant defenses in gills, heart and spleen. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 155, p. 325–332, 2012.

LANDWEHRMEYER, B. et al. Expression of acetylcholinesterase messenger rna in human brain: an *in situ* hybridization study. **Neurosciencr**. v. 57, p. 615-634, 1993.

LEGGATT, R.A. et al. Effects of acclimation and incubation temperature on the glutathione antioxidant system in killifish and RTH-149 cells. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 146, p. 317–326, 2007.

LI, Q. et al. Ofloxacin induces oxidative damage to joint chondrocytes of juvenile rabbits: Excessive production of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA damage. **European Journal of Pharmacology**. v. 626, p. 146-153, 2010.

LINO-NETO, T. et al. Identification of *Zantedeschia aethiopica* *Cat1* and *Cat2* catalase genes and their expression analysis during spathe senescence and regreening. **Plant Science**. v. 167, p. 889-898, 2004.

LUCAS, A.C.; KREUTZBERG, G.W. Regulation of acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures.-1. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin. **Neuroscience**.v. 14, p. 349-360, 1985.

LUO, D.; RANDO, T.A. The regulation of catalase gene expression in mouse muscle cells is dependent on the CCAAT-binding factor NF-Y. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 303, p. 609-618, 2003.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 143, p. 30–35, 2006.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v. 148, p. 390–397, 2007.

MAESTRO, R.D.; MCDONALD, W. Distribution of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 41, p.29-38, 1987.

MARTINEZ-TABACHE, L. et al. Aquatic **Ecosystem Health and Management**. v. 1, p. 317–322, 1998.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; FENERICK JR, J. Larval *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in *Hoplias malabaricus* and *Hoplerhynchus unitaeniatus* (Osteichthyes: Erythrinidae) of economic importance in occidental marshland of Maranhão, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 127, p. 51-59, 2005.

MATES, J.M., SANCHEZ-JIMENEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. **Frontiers Bioscience**. v. 4, p. 339–345, 1999.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. Biological markers of environmental contamination. **Biomarkers of Environmental Contamination**. p. 3-14, 1990.

MCKINNEY, M.A. et al. Characterization and profiling of hepatic cytochromes P450 and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence River Estuary and the Canadian Arctic. **Aquatic Toxicology**. v. 69, p. 35-49, 2004.

MIRON, D. et al. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology Environmental Safe**. v. 61, p. 398–403, 2005.

MIRON, D.S. et al. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**. v. 74, p. 1–5, 2008.

MONTEIRO, D.A. Impacto de diferentes vias de contaminação por mercúrio inorgânico sobre os biomarcadores de estresse oxidativo, a função cardio-respiratória e o potencial de bioconcentração e biomagnificação em matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) e em traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas)-Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011. p. 423.

MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M. Molecular mechanisms of hypertension—reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. **Canadian Journal of Cardiology**.v. 28, p. 288-295, 2012.

MORAES, B.S. et al. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**. v. 68, p. 1597–1601, 2007.

OBERLEY, L.W. et al. Manganese superoxide dismutase in normal and transformed human embryonic lung fibroblasts. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 6, p. 379-384, 1989.

OIKARI, A.; KUNNAMMO-OJALA. Tracing of xenobiotic contamination in water with the aid of fish bile metabolites: a field study with caged rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquatic Toxicology**. v. 9, p. 327-341, 1987.

OLIVEIRA, A. K. et al. Diet shifts related to body size of the pirambeba *Serrasalmus brandtii* Lütken, 1875 (Osteichthyes, Serrasalminae) in the Cajuru reservoir, São Francisco river basin, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 64, p.117-124, 2004.

OLIVERO-VERBEL, J. et al. *Contracaecum* sp. infection in *Hoplias malabaricus* (moncholo) from rivers and marshes of Colombia. **Veterinary Parasitology**. v. 140, p.90-96, 2006.

OLSON, D.L.; CHRISTENSEN, G.M. Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (*in Vitro*). **Environmental Research**. v. 21, p. 327-335, 1980.

PETERS, L.D.; O'HARA, S.C.M.; LIVINGSTONE, D.R. Benzo[a]pyrene metabolism and xenobiotic-stimulated reactive oxygen species generation by subcellular fraction of larvae of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 114, p. 221-227, 1996.

PETERSEN, S.V.; ENGHILD, J.J. Extracellular superoxide dismutase: structural and functional considerations of a protein shaped by two different disulfide bridge patterns. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 59, p. 175-182, 2005.

PETUSHOK, N. et al. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments. **Aquatic Toxicology**. v. 61, p. 65-72, 2002.

PINER, P.; ÜNER, N. In vivo acetylcholinesterase inhibition in the tissues of spinosad exposed *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 34, p. 473-477, 2012.

PLOCH, S.A. et al. Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to *tert*-butyl hydroperoxide. **Aquatic Toxicology**. v. 46, p. 231-240, 1999.

POMPEU, P.S. Dieta da pirambeba *Serrasalmus brandtii* Reinhardt (Teleostei, Characidae) em quatro lagoas marginais do rio São Francisco, Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 16, p. 19-26, 1999.

POSPÍŠIL, P. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1817, p. 218-231, 2012.

RABITTO, I.S. et al. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 60, p. 147-156, 2005.

REISCHL, E. et al. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 146, p. 22-53, 2007.

REZG, R. et al. Biochemical evaluation of hepatic damage in subchronic exposure to malathion in rats: Effect on superoxide dismutase and catalase activities using native PAGE. **Comptes Rendus Biologies**. v. 331, p. 655-662, 2008.

RICHMOND, R. et al. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. **Analytical Biochemistry**. v. 118, p. 328-335, 1981.

RIOS, F.S. et al. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 140, p. 281-287, 2005.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. vol. 24, p. 112-119, 2001.

SAMPAIO, F.G. et al. Antioxidant defenses and biochemical changes in the neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus*: Responses to single and combined copper and hypercarbia exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 156, p. 178-186, 2012.

SARDINA, J.L. et al. Reactive oxygen species: Are they important for haematopoiesis?. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 81, p. 257-274, 2012.

SCHISLER, N.J.; SINGH, S.M. Modulation of selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GSH-Px) activity in mice. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 4, p. 147-153, 1988.

SCHMIDT-DANNERT, C. et al. Improved properties of bovine erythrocyte acetylcholinesterase, isolated by papain cleavage. **Journal of Biotechnology**. v. 36, p. 231-237, 1994.

SILVA, K.C.C. et al. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**. v. 126, p. 191-197, 2013.

SILVA DE ASSIS, H.C. et al. Hematologic and hepatic responses of the freshwater fish *Hoplias malabaricus* after saxitoxin exposure. **Toxicon**. v. 30, p. 1-6, 2013.

SMALL, D.H.; SIMPSON, R.J. Acetylcholinesterase undergoes autolysis to generate trypsin-like activity. **Neuroscience Letters**. v. 89, p. 223-228, 1988.

SOLÉ, M. et al. Hepatic biomarkers of xenobiotic metabolism in eighteen marine fish from NW Mediterranean shelf and slope waters in relation to some of their biological and ecological variables. **Marine Environmental Research**. v. 70, p. 181-188, 2010.

STARA, A. et al. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 105, p. 18-23, 2013.

STRAUS, D.L.; CHAMBERS, J.E. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion, and S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). **Aquatic Toxicology**. v. 33, p. 311-324, 1995.

TAGLIARI, K.C. et al. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. **Mutation Research**. v. 561, p. 101-117, 2004.

TAKASHIMA, M. et al. Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: A rational basis and practical application. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 52, p. 1242- 1252, 2012.

TRASVIÑA-ARENAS, C.H. et al. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v. 164, p. 44-52, 2013.

UMASUTHAN, N. et al. A manganese superoxide dismutase with potent antioxidant activity identified from *Oplegnathus fasciatus*: Genomic structure and transcriptional characterization. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 34, p. 23-37, 2013.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 1161-1208, 2005.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, p. 44-84, 2007.

VASYLKIV, O.Y. et al. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 101, p. 1-5, 2011.

VINAGRE, C. et al. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecological Indicators**. v. 23, p. 274-279, 2012.

WEBER, E.S. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? **Vet Clin Exot Anim**. v. 14, p. 21-32, 2011.

WILHELM FILHO, D. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**. v. 244, p. 349– 357, 2005.

WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. **Methods in Enzymology**. v. 233, p. 182-189, 1994.

XING, H. et al. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 103, p. 74– 80, 2012.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**. v. 6, p. 787-793, 1998.

ZHANG, P. et al. Distribution of manganese-dependent superoxide dismutase in the human brain. **Neuroscience**. v. 61, p. 317-330, 1994.

ZHANG, R. et al. Butin reduces oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction via scavenging of reactive oxygen species. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, p. 922-927, 2010.