



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL

RENATA CAIADO CAGNIN

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO SOBRE JUVENIS DE
ROBALO-PEVA *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae)
EM DIFERENTES SALINIDADES**

ARACRUZ

2013

RENATA CAIADO CAGNIN

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO SOBRE JUVENIS DE
ROBALO-PEVA *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae)
EM DIFERENTES SALINIDADES**

Dissertação defendida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Oceanografia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes

ARACRUZ

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO SOBRE JUVENIS DE ROBALO-PEVA
Centropomus parallelus (Teleostei: Centropomidae) EM DIFERENTES
SALINIDADES

RENATA CAIADO CAGNIN

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador – Examinador Interno UFES

Prof. Dr. Renato Rodrigues Neto
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno UFES

Prof. Dr. Adalto Bianchini
Universidade Federal do Rio Grande-FURG
Examinador Externo FURG

Aracruz, 17 de abril de 2013

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO SOBRE JUVENIS DE ROBALO-PEVA
Centropomus parallelus (Teleostei: Centropomidae) EM DIFERENTES
SALINIDADES

Por

Renata Caiado Cagnin

Submetido como requisito parcial para a obtenção de grau de

Mestre em Oceanografia Ambiental

na

Universidade Federal do Espírito Santo

Abril de 2013

©Renata Caiado Cagnin

Por meio deste, o autor confere ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da UFES permissão para reproduzir e distribuir cópias parciais ou totais deste documento de Dissertação para fins não comerciais.

Assinatura do autor.....
Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental – PPGOAM / UFES

Certificado por.....
Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes / Orientador / DOC / UFES

Certificado por.....
Dr. Renato Rodrigues Neto / Examinador Interno / DOC / UFES

Certificado por.....
Dr. Adalto Bianchini / Examinador externo / FURG

Aceito por.....
Dra. Valéria da Silva Quaresma / Coordenador do PPGOAM / CCHN / UFES

À memória do meu avô, o poeta

Athayr Cagnin

*“Na vida que a gente tece
somos ondas a oscilar:
- esta sobe, aquela desce,
mas todas morrem no mar.”*

AGRADECIMENTOS

Sou grata pela oportunidade que me foi dada pelo professor e orientador Luiz Fernando Loureiro Fernandes. Foi uma grande experiência!

Sou grata por toda a contribuição do corpo docente do Programa de Pós-graduação em Oceanografia Ambiental (UFES) para a minha especialização na área da Oceanografia, agradável novidade que surgiu na minha formação acadêmica após a biologia.

Sou grata pelo apoio imprescindível dos parceiros Adalto Bianchini e Leandro Machado de Carvalho na realização da pesquisa.

Sou grata pela ajuda de duas gurias muito especiais que me guiaram na realização das análises no Rio Grande do Sul: Mari Lauer, nas determinações bioquímicas na FURG; e Diana Muratt, nas análises químicas de especiação na UFSM. Foram dias de muito conhecimento e companheirismo.

Sou grata por cruzar 45km de lindas praias até a Base Oceanográfica da UFES, um lugar mágico que a rota já prediz.

Serei eternamente grata pelas grandes amizades que esta jornada me deu!

Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Juvenil de robalo-peva (*Centropomus parallelus*).....26

Figura 2: Valores da CL₅₀, CEO e CENO em mg/L de As para os juvenis de *Centropomus parallelus* após 96 horas de exposição a diferentes concentrações letais (n=15). Os valores correspondem a 2 experimentos de exposição letal.....43

Figura 3: Mortalidade dos juvenis de *Centropomus parallelus* pelas concentrações em mg/L de As após 96 horas de exposição. Os valores correspondem a 2 experimentos de exposição letal. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn (p<0,05). Os valores representam a média de quinze indivíduos (n=15) por tratamento.....44

Figura 4: Atividade da catalase (CAT) no tecido branquial dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metalóide) nas diferentes salinidades durante 96h. A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μmol de H_2O_2 min^{-1} . Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn (p<0,05). Os valores representam a média de cinco indivíduos (n=5) por tratamento, com duas determinações enzimáticas cada.....46

Figura 5: Atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido branquial dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metalóide) nas diferentes salinidades durante 96h. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de 50% do citocromo c. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de variância One-way

ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média de cinco indivíduos ($n=5$) por tratamento, com duas determinações enzimáticas cada.....48

Figura 6: Atividade colinesterásica (AChE) no tecido cerebral dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metalóide) nas diferentes salinidades durante 96h. A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg de proteína. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de variância One-way ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média de cinco indivíduos ($n=5$) por tratamento, com três determinações enzimáticas cada.....50

Figura 7: Níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido branquial dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metalóide) nas diferentes salinidades durante 96h. Os níveis de glutathiona foram expressos em nM/mg de proteína. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). Os valores representam a média de cinco indivíduos ($n=5$) por tratamento, com duas determinações enzimáticas cada.....52

Figura 8: Lipoperoxidação nas brânquias dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metalóide) nas diferentes salinidades durante 96h. O dano oxidativo (LPO) foi expresso em TBARS por $\mu\text{mol/mg}$ de proteína. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de variância One-way ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média de cinco indivíduos ($n=5$) por tratamento, com seis determinações de MDA cada.....53

Figura 9: Consumo de oxigênio em mg/peso do peixe/h medido por respirometria ao longo de 30 minutos ao final das 96h de exposição ($n=3/\text{tratamento}$). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de variância One-way ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....55

Figura 10: Valores de Arsenito (As III) nas soluções-teste determinados por voltametria nos experimentos de exposição de *C. parallelus*. O T0h indica os valores das amostras da solução-teste ainda sem a exposição dos organismos e T24h corresponde aos valores de As III após a exposição e as respectivas concentrações: C1 (0.1mg As/L); C2 (1.25mg As/L) e C3 (2.5mg As/L). Os valores representam a média de três amostras filtradas (biodisponível) da solução-teste (n=3) por tratamento.....57

Figura 11: Valores de Arsenito (As III) nas soluções-teste determinados por voltametria nos experimentos do comportamento do arsênio na solução-teste. O T0h e T24h indicam os tempos de coleta das amostras e as respectivas concentrações: C1 (0.1mg As/L); C2 (1.25mg As/L) e C3 (2.5mg As/L). Os valores representam a média de três amostras filtradas (biodisponível) da solução-teste (n=3) por tratamento.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis físico-químicas das soluções-teste do bioensaio com <i>C. parallelus</i> de acordo com os tratamentos: Controle, C1 (0.1mg As/L), C2 (1.25mg As/L) e C3 (2,5mg As/L) medidos a cada 24h.....	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
±	Mais ou menos
mg	Miligramas
L	Litros
min	Minuto
nmol	nanomol
μmol	micromol
As	Arsênio
As ₂ O ₃	Trióxido de arsênio
As ^{III}	Arsenito
As ^V	Arsenato
MMA ^{III}	Monometilarsenito
DMA ^{III}	Dimetilarsenito
-SH	Radical Sulfidril
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
GSH	Glutathiona reduzida

GSSG	Glutationa oxidada
GR	Glutationa redutase
As ^{III} (GS) ₃	Arsenitotriglutationa
NADH	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo Nicotinamida e Adenina
MDA	Malondialdeido
LPO	Lipoperoxidação/Peroxidação Lipídica
AChE	Acetilcolinesterase
pH	Potencial Hidrogeniônico
OD	Oxigênio Dissolvido
°C	Graus Celsius
T0h C1	Tempo 0h de coleta para 0,1mg As/L
T0h C2	Tempo 0h de coleta para 1,25mg As/L
T0h C3	Tempo 0h de coleta para 2,5mg As/L
T24h C1	Tempo 24h de coleta para 0,1mg As/L
T24h C2	Tempo 24h de coleta para 1,25mg As/L
T24h C3	Tempo 24h de coleta para 2,5mg As/L

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT	14
1 APRESENTAÇÃO.....	16
1.1 CARACTERIZAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS COSTEIROS	16
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ARSÊNIO	17
1.2.1 A SALINIDADE E A DISPONIBILIDADE DO ARSÊNIO	18
1.3 MARCADORES BIOQUÍMICOS DA TOXICIDADE DO ARSÊNIO.....	20
1.3.1 ESTRESSE E DANO OXIDATIVO.....	20
1.3.2 MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE	21
1.3.3 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO).....	23
1.3.4 ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	24
1.4 A ECOTOXICOLOGIA E A UTILIZAÇÃO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES.....	25
1.4.1 <i>Centropomus parallelus</i> COMO MODELO BIOLÓGICO.....	26
1.5 ESPECIAÇÃO DO ARSÊNIO POR VOLTAMETRIA	27
2 INTRODUÇÃO	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 GERAL.....	32
3.2 ESPECÍFICOS	32
4 HIPÓTESES.....	33
4.1 HIPÓTESE 1:.....	33
4.2 HIPÓTESE 2:.....	33
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
5.2 DETERMINAÇÕES.....	36
5.2.1 CATALASE (CAT) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	36
5.2.2 ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	37
5.2.3 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	38
5.2.4 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO/TBARS)	38

5.3 CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	40
5.4 ESPECIAÇÃO.....	40
5.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	41
6 RESULTADOS.....	43
6.1 CL _{50-96h}	43
6.2 CATALASE (CAT).....	45
6.3 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	47
6.4 ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	49
6.5 GLUATIONA REDUZIDA (GSH).....	51
6.6 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO).....	53
7 DISCUSSÃO.....	60
8 CONCLUSÕES.....	71
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

RESUMO

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO SOBRE JUVENIS DE ROBALO-PEVA *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) EM DIFERENTES SALINIDADES

Cagnin, R. C.; Lauer, M. M.; Cantarela, B. A.; Muratt, D. T.; Silva, B. F.; Bianchini, A.; Carvalho, L. M.; Gomes, L. C.; Fernandes, L. F. L.

O arsênio (As) é um metalóide amplamente distribuído na costa sudeste do Brasil, em especial no estado do Espírito Santo, fazendo com que os animais aquáticos fiquem expostos à toxicidade por ele provocada. Desta forma, determinar a toxicidade desse elemento sobre juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) a partir da avaliação de alterações bioquímicas é de extrema importância, visto que se trata de uma espécie de relevância ecológica e econômica. Juvenis de *C. parallelus* foram expostos a 0,1, 1,25, 2,5 mg As/L (como As₂O₃) durante 96h e em salinidade 5 e 25. Foram verificados os efeitos do As sobre as defesas antioxidantes CAT, SOD e GSH nas brânquias, bem como os danos oxidativos a lipídios (LPO). Além disso, foi verificada a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e o consumo de oxigênio através da respirometria após as exposições. Com a especiação química do arsenito (iAs^{III}) nas soluções-teste, foi possível traçar um comparativo entre o comportamento do As nos ambientes experimentais e a efetiva absorção ocorrida nos bioensaios. Confirmou-se a alta toxicidade do As sobre os juvenis de robalo-peva a partir da observação da inibição das enzimas de defesa antioxidante CAT e SOD, e a diminuição dos níveis de GSH, primeira linha de ação contra as ROS, nas concentrações de 1,25mg As/L e 2,5mg As/L. Com os mecanismos de defesa prejudicados, ocorreu a peroxidação lipídica nas brânquias também nessas concentrações. Da mesma forma, houve a diminuição no consumo de oxigênio, possivelmente pela deficiência no

metabolismo energético causada pelo estresse oxidativo. A atividade da AChE evidenciou o potencial neurotóxico do As, pois mesmo na menor concentração (0,1mg As/L) foi possível observar a inibição da enzima. A especiação constatou a predominância de As^{III} nas amostras de água dos bioensaios, onde houve uma nítida diminuição do arsenito após a exposição, sugerindo a absorção pelos organismos. Em todas as variáveis testadas não foram observadas alteração das respostas fisiológicas entre as salinidades, e nem houve variação na composição química das soluções-teste, mostrando que este semi-metal é estável ao longo do tempo, independentemente do meio de exposição. A importância desta pesquisa está no fato desta fornecer dados inéditos acerca dos efeitos tóxicos do arsênio sobre a fisiologia do robalo-peva (*C. parallelus*), um teleósteo marinho ainda pouco estudado e de fundamental importância ecológica e econômica, e ressalta ainda a necessidade do biomonitoramento dos ecossistemas marinhos contaminados pelo este elemento.

Palavras-chave: Arsênio, estresse oxidativo, robalo-peva.

ABSTRACT

EFFECTS OF ARSENIC EXPOSURE ON JUVENILES OF ROBALO-PEVA *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) AT DIFFERENT SALINITIES

Cagnin, R. C.; Lauer, M. M.; Cantarela, B, A.; Muratt, D. T.; Silva, B. F.; Bianchini, A.; Carvalho, L. M.; Gomes, L. C.; Fernandes, L. F. L.

Arsenic (As) is a metalloid widely distributed in the coastal region of Brazil, in particular in the state of Espírito Santo State, exposing the aquatic animals to its toxicity. Thus, to determine the toxicity of this element on juveniles of the fat-sook *C. parallelus* by evaluating biochemical alterations is extremely important, since this is an important ecological and economical species. Juveniles of *C. parallelus* were exposed to 0,1, 1,25 and 2,5mg As/L (as As₂O₃) during 96h in salinities 5 and 25. The effects of As on antioxidant defenses CAT, SOD and GSH in gills, as well as the oxidative damage in lipids (LPO) were evaluated. Furthermore, the activity of acetylcholinesterase (AChE) on brain and the oxygen consumption by respirometry after exposure were verified. With the chemical speciation of arsenite (As^{III}) in test solutions, we draw a comparison between the arsenic behavior and the effective uptake by fish on assays. The high toxicity of As for juveniles of *C. parallelus* was confirmed by inhibition of the antioxidant defense enzymes CAT and SOD, and decreasing GSH levels, the first line of defense against ROS. The loss of the defense mechanisms led to lipid peroxidation on gills in 1,25mg As/L and 2,5mg As/L treatments. Likewise, there was a decrease in the oxygen consumption, probably due to the deficit on energy metabolism caused by the oxidative stress. Inhibition of the AChE at 0,1mg As/L emphasizes the neurotoxic potential of arsenic. Speciation shows the predominance of As^{III} on the water samples of the bioassays, where a decrease in arsenite after exposure suggests uptake by the organisms. In all tested parameters, there was no variation between both

salinities, and even no variations on chemical compounds, indicating the stability of this metalloid over time and tests conditions. This research provides unpublished data about the arsenic effects on *C. parallelus*, an important marine teleost, and highlights the necessity of biomonitoring As contaminated ecosystems.

Key-words: Arsenic, oxidative stress, *C.parallelus*.

1 APRESENTAÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS COSTEIROS

Os ambientes costeiros marinhos são de extrema relevância ambiental, pois possuem áreas como estuários, praias e a plataforma continental, que juntos abrigam uma vasta gama de espécies. Os estuários, especificamente, são verdadeiros berçários para diversos organismos (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002). Esses ambientes são caracterizados por abrigarem uma rica ictiofauna composta de espécies comercialmente importantes que estão constantemente em contato com a contaminação antrópica ou mesmo com os diversos compostos carregados naturalmente dos rios para o mar (ELLIOTT, 2002; MARTINHO, 2005).

A maior parte da população mundial encontra-se localizada nas regiões costeiras devido, principalmente, ao caráter turístico e econômico dessas regiões. Diante disso, o ambiente marinho recebe todo tipo de resíduo produzido pelo homem, seja por descarte direto ou fontes não pontuais do continente (BATISTA-NETO *et al.*, 2008; ARAÚJO; COSTA, 2003; MORAES; JORDÃO, 2002). Esses despejos ocorrem em todas as cidades costeiras, pois se acredita que os oceanos tem uma boa capacidade de assimilação desses compostos (FANG *et al.*, 2006). Porém, como estão localizados em áreas rasas, onde a circulação local só permite a diluição parcial dos poluentes, estes produzem efeitos tóxicos sobre a fauna afetando o equilíbrio ecológico (ABESSA; SOUZA; TOMMASI, 2006).

Em alguns casos devem ser considerados os aspectos naturais referentes às altas concentrações de componentes tóxicos nos ambientes costeiros. Essas regiões recebem a descarga de rios que trazem metais e outros elementos traço provenientes do intemperismo de rochas e solos. Dependendo da região, a formação geológica pode reter compostos tóxicos que são disponibilizados pelo intemperismo químico (MAHER; BUTLER, 1988; NAIR *et al.*, 2003).

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ARSÊNIO

O arsênio (As) é um metalóide comumente encontrado no meio ambiente, podendo ser proveniente de fontes naturais através do intemperismo de rochas e solos, pela deposição atmosférica e por fenômenos geotermiais e vulcânicos, ou ainda de fontes antrópicas como efluentes industriais, utilização de pesticidas e herbicidas, na mineração e fundição, na queima de combustíveis fósseis, na conservação da madeira, na fabricação de papel e na produção de ferro e aço (GONTIJO; BITTENCOURT, 2005; NG *et al.*, 2003).

O aumento da concentração desse metal em ambientes aquáticos como consequência das atividades da civilização moderna acaba contaminando alimentos e a água oriundos desse meio, expondo os seres humanos e a biota a um risco iminente (ANDREAE; ANDREAE, 1989; MANTOVANI; ANGELUCCI, 1992). O arsênio é considerado um problema de saúde global, tendo em vista que em diversas regiões do mundo ocorre à exposição crônica e este tóxico, que muitas vezes é de ocorrência natural (NG *et al.*, 2003).

A origem natural do arsênio ocorre principalmente através da formação de minerais, como óxidos, arsenetos, arsenatos, sulfetos e sulfossais, sendo que a arsenopirita é o mineral mais comum das mineralizações. A liberação do As a partir de rochas minerais se dá pela oxidação da arsenopirita por O^2 e Fe^{3+} . Este semi-metal fica retido nas rochas através da adsorção em óxidos de ferro e argilo-minerais, e são então disponibilizados pelo intemperismo (FIGUEIREDO, 2000; GRAY *et al.*, 1999; SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002). Regiões com formações geológicas com essas composições estão mais propensas a apresentarem maiores concentrações de As nos solos e sedimentos (LIAO *et al.*, 2011).

O As possui diversas formas químicas com propriedades metálicas e não metálicas que o definem como metalóide, e o caracterizam como um elemento químico mais complexo. As formas trivalentes e pentavalentes são as mais comuns, existindo ainda compostos orgânicos derivados da metilação. Um dos compostos mais comuns é o trióxido de arsênio (As_2O_3), que disponibiliza principalmente o arsenito (As III), considerado 60 vezes mais tóxico do que a

forma oxidada (As V) (GUPTA *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2002; THOMAS, 2001).

Os organismos marinhos acumulam quantidades substanciais de arsênio de modo mais eficiente que os organismos terrestres, e muitas vezes essa absorção é facilitada pela similaridade do As com o fosfato, que é essencial para a vida (GUPTA *et al.*, 2012). Além de atacar os grupos sulfidríla (-SH) de enzimas essenciais para a homeostase do organismo, o As tem propriedade carcinogênica relacionada à exposição prolongada (BARRA *et al.*, 2000; LUNDE, 1970). Entre as consequências da exposição estão a competição com o fosfato durante a fosforilação oxidativa, a inibição da respiração mitocondrial, a genotoxicidade e a diminuição das defesas antioxidantes (APOSHIAM, 1997; HUGHES, 2002).

O metabolismo do arsênio tem um importante papel nos seus efeitos tóxicos, onde a oxidação do arsenito forma espécies tóxicas metiladas. Antigamente, autores como Cullen *et al.* (1989) descreviam a metilação do As como o processo de detoxificação, porém, atualmente, considera-se que os intermediários metilados no estado de oxidação trivalente, como monometilarsenito e dimetilarsenito (MMA^{III} e DMA^{III}), retém o potencial citotóxico e inibidor de algumas enzimas. Dessa forma, o processo de metilação do As deve ser tratado como potencializador da toxicidade (HALL *et al.*, 2007; HUGHES *et al.*, 2011; THOMAS *et al.*, 2004).

1.2.1 A SALINIDADE E A DISPONIBILIDADE DO ARSÊNIO

É reconhecido que a simples existência de elementos químicos na natureza é dependente de fatores físico-químicos como o pH, dureza, alcalinidade e salinidade. Esses agentes complexantes são capazes de alterar a biodisponibilidade de metais e outros elementos na água (BIANCHINI *et al.*, 2002a). Da mesma forma, a presença de material orgânico pode influenciar na solubilidade e precipitação de íons metálicos e semi-metálicos. O cloreto (Cl^-) é um dos mais comuns formadores de complexos inorgânicos no ambiente

marinho, mesmo em baixas concentrações (CHEN; JIAO, 2008; CHENG *et al.*, 2012). Além deste, bicarbonatos e tiosulfatos também são abundantes em ambientes aquáticos, se complexando com tais elementos (BIANCHINI *et al.*, 2002a).

Estudos realizados por Paquim *et al.* (2002) sugerem uma modelagem das relações entre diversos ligantes bióticos e suas interferências na biodisponibilidade de metais e outros elementos químicos. Bianchini *et al.* (2002b) também vêm realizando pesquisas acerca do tema, onde os mesmos sugerem que estes interferentes possuem influência na toxicidade dos elementos químicos através da especiação, complexação e ligação competitiva dos metais a outros cátions, de forma que os organismos não consigam absorvê-los devido à incompatibilidade do sítio de ligação. É plausível utilizar esta mesma abordagem para a disponibilidade do As no ambiente.

Outra linha de pensamento acerca do comportamento do arsênio se baseia no fato de que, quando em forma trivalente de baixa eletronegatividade (As^{3+}), o comportamento metálico leva a complexações com frações orgânicas e adsorção a sais, como carbonato, cloreto e tiosulfatos. Essas associações podem afetar a disponibilidade do As dissolvido no meio. Em contrapartida, o caráter não-metálico eletronegativo pode diminuir este potencial de complexação. Assim, é importante conhecer as propriedades da água para saber as possíveis influências físico-químicas sobre o caráter eletrostático do contaminante (BIDWELL; GORRIE, 2006; OH *et al.*, 2012).

Baseado nas afirmações de Bianchini *et al.* (2002ab) e na característica do arsênio em se associar ao sulfeto (SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002), é importante saber, por exemplo, o padrão de distribuição dos íons de enxofre (-2) e dos compostos sulfurados no ambiente natural. Os autores chamam a atenção para águas oxigenadas, onde a oxidação destes sulfetos pode influenciar na biodisponibilidade de elementos químicos. Considerando esse fator, a biodisponibilidade do arsênio também pode ser influenciada pelos compostos sulfurados presentes no ambiente aquático.

1.3 MARCADORES BIOQUÍMICOS DA TOXICIDADE DO ARSÊNIO

1.3.1 ESTRESSE E DANO OXIDATIVO

Como consequência de uma vida aeróbica, os organismos devem estar sempre preparados para lidar com a geração contínua de espécies reativas de oxigênio (em inglês Reactive Oxygen Species - ROS) como produto intermediário do metabolismo (LIVINGSTONE, 2001). O potencial das ROS em danificar tecidos corresponde ao dano oxidativo e o termo estresse oxidativo se refere à situação em que a célula está exposta a níveis excessivos de ROS. Algumas das espécies reativas de oxigênio mais comuns são o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (LIVINGSTONE, 2001; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

Um dos grandes prejuízos causados pelas ROS nos seres vivos é a oxidação dos aminoácidos e de grupos sulfidrilas de proteínas, que levam a mudanças na sua conformação e função. Outro efeito das espécies reativas de oxigênio é a oxidação de ácidos graxos, sendo as membranas particularmente susceptíveis a esta degradação (STOREY, 1996; VALAVANIDIS *et al.*, 2006). As organelas, em especial as mitocôndrias, também sofrem danos e disfunções provocados pelos altos níveis de ROS, causando a depleção da energia metabólica e consequente diminuição do consumo de oxigênio pelos seres vivos (LEE *et al.*, 2012).

As defesas antioxidantes que combatem os efeitos das ROS podem ser de natureza enzimática, como a superóxido dismutase e a catalase (SOD e CAT) e não enzimática como a glutathiona reduzida (GSH), que é umas das primeiras a atuar na linha de defesa antioxidante (LESSER, 2006; SIES, 1993). O desequilíbrio causado pelo excesso de agentes oxidantes e a deficiência no sistema protetor gera a condição de estresse oxidativo que pode causar danos celulares por vezes irreversíveis (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002).

Quando bioacumulado, o arsênio pode afetar os processos enzimáticos, estrutura de membrana, funções fisiológicas, além de danos nucleares, teciduais e redução no consumo de oxigênio, causados pela produção excessiva de radicais livres (GUPTA *et al.*, 2012; HUGHES *et al.*, 2011). Considerando as propriedades metálicas do arsênio, os efeitos podem ser

comparados aos efeitos dos metais pesados que são capazes de interagir com os organismos e, dependendo da concentração e do tempo de exposição, pode interferir na comunidade e culminar com o desequilíbrio ecológico e populacional (WOO *et al.*, 2009).

1.3.2 MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

1.3.2.1 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH, L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina), como já citado anteriormente, é um importante agente antioxidante e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Seu potencial de ação de redução é determinado pelo grupamento -SH, presente na cisteína (SAKURAI *et al.*, 2005). Como defesa, a GSH protege a célula contra as lesões resultantes da exposição a agentes oxidantes, preservando o seu estado redox. Além disto, atua como transportadora e reservatório da cisteína, participa da detoxificação de xenobióticos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. A GSH é ainda requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (DICKINSON, FORMAN, 2002).

Os níveis de GSH são regulados a partir de mecanismos que controlam sua síntese, como as reações de conjugação com outros elementos que consomem GSH, e as reações de produção de glutathiona oxidada (GSSG). A manutenção dos níveis normais acontece pela redução da GSSG através da glutathiona redutase (GR). Especificamente em relação ao arsênio, a glutathiona tem mostrado servir como um doador de elétrons para a redução do arsenato a arsenito no organismo, tornando possível a metilação, que ocorre preferencialmente pelo substrato reduzido (As^{III}). Neste complexo, o As (III) é ligado aos grupos tíois dos resíduos de cisteína de três moléculas de GSH formando arsenitotriglutathiona ($\text{As}^{\text{III}} (\text{GS})_3$) (SAKURAI *et al.*, 2005; THOMAS *et al.*, 2001; WANIBUCHI *et al.*, 2004).

O arsenito (AsIII), como sugerem Gupta *et al.* (2007), pode ainda inibir a formação de co-enzimas reduzidas como NADH e NADHP, e essa escassez pode ter efeito direto nas defesas antioxidantes, já que prejudica a redução da glutatona oxidada (GSSG) diminuindo os níveis de glutatona reduzida (GSH).

1.3.2.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Pertencente a classe das oxirredutases, a superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima que participa do mecanismo primário de defesa ao dano oxidativo das formas reativas de oxigênio (ESCOBAR *et al.*, 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A função e distribuição da enzima nos tecidos foram confirmadas por McCord e Fridovich (1969), que tem como papel a catalização da dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Gerado normalmente no metabolismo aeróbico, o superóxido possui uma via específica de eliminação representada pela ação da superóxido dismutase (FLOHÉ; ÖTTING, 1984).

A SOD tem sido utilizada como biomarcadora em vários organismos devido à sensibilidade que apresentam a agentes tóxicos, respondendo com alterações em suas atividades enzimáticas (FRIDOVICH, 1995). As respostas de peixes a metais denota a sensibilidade da SOD a este tipo de contaminante (BRUCKA-JASTRZEBSKA, 2010).

1.3.2.3 CATALASE (CAT)

Assim como a SOD, a catalase é também classificada como uma oxirredutase que participa da defesa antioxidante dos organismos. Por esse motivo, a catalase é amplamente utilizada como marcador para respostas de contaminação ambiental (NICHOLLS *et al.*, 2001). Mais uma vez, o comportamento do arsênio como metal tende a promover a inibição da enzima

devido ao aumento das ROS. O radical superóxido (O_2^-) é tido como inibidor da catalase, assim, a atividade da SOD é capaz de reduzir a inibição da catalase. Da mesma forma, se uma inibição da atividade da SOD for observada, haverá também uma redução da atividade da CAT (FILHO *et al.*, 1993; NELSON; COX, 2007).

A catalase é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, principalmente nos peroxissomos. Com isso, uma vez que este importante mecanismo de defesa antioxidante é inibido, o processo de desativação das ROS é prejudicado, levando ao estresse oxidativo (NICHOLLS *et al.*, 2001). Autores como Ahsan *et al.* (2003), relatam a influência do arsênio sobre a atividade da CAT, normalmente reduzindo o seu poder de ação.

1.3.3 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

O aumento excessivo das ROS, principalmente do radical hidroxila (OH^-), provoca danos celulares devido ao ataque a estrutura lipídica da membrana, que está diretamente relacionado com a fluidez celular e o estado de saturação da bicamada lipídica. Um dos produtos formados na degradação dos lipídios é o malondialdeído (MDA), que é utilizado como marcador do dano celular. Ao causar dano na membrana mitocondrial, por exemplo, as espécies reativas do oxigênio inibem a produção de ATP por essa estrutura celular, levando muitas vezes a apoptose (LESSER, 2006; LIMA; ABDALLA, 2001).

A investigação do dano oxidativo pela lipoperoxidação em peixes quando expostos a tóxicos tem sido feita, como Brucka-Jastrzebska (2010) e Modesto e Martinez (2010) propõem para diferentes compostos químicos em seus trabalhos. Em ambos, é verificado aumento do dano lipídico (LPO) quando os animais são expostos ao contaminante, confirmando a sensibilidade da membrana celular a alterações dos níveis das ROS por xenobióticos. Assim, este dano oxidativo é bem empregado como marcador de contaminação ambiental (BARBER; BERNHEIM, 1967)

1.3.4 ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A acetilcolinesterase é uma enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (neurotransmissor sináptico) em acetato e colina com a liberação de um próton. O neurotransmissor (AChE) cumpre o seu papel permitindo a abertura de canais de íons Na^+ e a consequente despolarização da membrana, o que proporciona um potencial de ação com a propagação do impulso. A hidrólise evita a propagação contínua do impulso nervoso, que, caso contrário, poderia acarretar em efeitos comportamentais como hiperatividade, asfixia e morte (MATHEW *et al.*, 2010; STURM *et al.*, 1999).

A inibição da atividade da acetilcolinesterase pelo arsênio está diretamente relacionada com a propriedade neurotóxica desse contaminante. A mais típica característica da neurotoxicidade do arsênio, de acordo com Jomova *et al.* (2011), é a neuropatia periférica, onde há uma redução na velocidade da condução nervosa que leva a degradação axonal. Estudos que investiguem a influência deste xenobiótico no sistema nervoso central são necessários para se entender os potenciais neurotóxicos neste sítio de ação. A inativação de enzimas importantes para o metabolismo celular gera a neurodegeneração através das mudanças na estrutura do citoesqueleto e hiperfosforilação (LIONETTO *et al.* 2003).

A acetilcolinesterase é uma das mais conhecidas substâncias neurotransmissoras nas sinapses químicas. A AChE está sempre presente e se encarrega de remover o neurotransmissor, inibindo os impulsos nervosos contínuos. A medida que diminui a quantidade de neurotransmissor, o potencial pós-sináptico diminui. Se por influência do arsênio a atividade da enzima é reduzida, o impulso nervoso é constantemente emitido (MATHEW *et al.*, 2010).

1.4 A ECOTOXICOLOGIA E A UTILIZAÇÃO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES

A ecotoxicologia, como descrita por Flohr *et al.* (2005) e Walker *et al.* (1996), é a ciência que estuda o comportamento dos organismos vivos quando expostos a compostos tóxicos presentes no ambiente através de bioensaios. Esses testes mostram de forma preditiva quais os possíveis efeitos tóxicos que ocorrerão no meio natural para a espécie testada (BONFIM, 2005; RÖRING *et al.*, 2007). Segundo Magalhães e Filho (2008) e Costa *et al.* (2008), esta ciência surgiu como forma de se conhecer os problemas de contaminação dos corpos d'água por substâncias tóxicas. Desta forma, os testes de toxicidade desempenham um papel crucial no estudo do impacto causado por substâncias químicas no ambiente natural (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os bioindicadores são representados por organismos que sinalizam a degradação ambiental com eficiência, por se tratarem de espécies de ampla distribuição geográfica, abundantes e dominantes. Esses organismos tendem a bioacumular componentes tóxicos nos tecidos que geram danos metabólicos diversos como resposta aos estímulos ambientais. Em termos práticos, os bioindicadores para bioensaios devem ser de fácil captura, manuseio e manutenção (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os testes de exposição induzida ao contaminante em laboratório são geralmente conduzidos nos estágios de vida inicial dos organismos marinhos. Isso por que essa fase corresponde a mais sensível do ciclo de vida do animal, fornecendo respostas precoces a possíveis desequilíbrios ambientais (AZEVEDO; CHASIN, 2006). Essa metodologia é aplicada para a utilização de diversos organismos-teste, como por exemplo, peixes em fase juvenil.

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois apresentam ampla distribuição geográfica e participam, ainda, de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (MELA,

2004). Dessa forma, esses organismos contam com mecanismos acentuados de bioconcentração e biomagnificação, sendo, portanto, considerados excelentes modelos biológicos de estudos ecotoxicológicos (PAN; WANG, 2012).

1.4.1 *Centropomus parallelus* COMO MODELO BIOLÓGICO

O gênero de peixes *Centropomus*, popularmente conhecidos como robalo, está amplamente distribuído ao longo da costa brasileira. Trata-se de um grupo chave dentro da cadeia alimentar, onde qualquer perturbação a nível populacional acarretaria no distúrbio do ecossistema como um todo (RIVAS, 1962; TSUZUK *et al.*, 2007). Figueiredo e Menezes (1985) citam que no Brasil são encontradas quatro espécies do gênero *Centropomus*, sendo uma delas *Centropomus parallelus* (Figura 1), escolhida como organismo-teste nesse trabalho.



Figura 1: *Centropomus parallelus*.

C. parallelus é uma espécie-chave de topo de cadeia que possui grande representatividade econômica devido às ricas propriedades organolépticas da carne, que levam a grande demanda do consumo humano deste pescado. Além disso, possui ainda um forte aspecto social, pois parte da captura é proveniente da pesca artesanal. São peixes marinhos de águas costeiras que

penetram em rios e estuários durante todas as fases do seu ciclo de vida em busca de boa qualidade ambiental e disponibilidade de alimento. Durante o ciclo reprodutivo, buscam a foz de rios e estuários para acasalamento. Portanto, são espécies eurihalinas, ou seja, suportam grandes variações de salinidade (BARROSO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009).

As respostas do robalo peva (*C. parallelus*) à exposição em laboratório atuam como um elo aos possíveis estímulos fisiológicos e ecológicos na natureza, sendo ideal para avaliar os efeitos de poluentes. Além disso, a tendência já comprovada em estudos como os de Joyeux *et al.* (2004), Cavalcanti (2003) e Seixas *et al.* (2007) é dos contaminantes químicos se acumularem nos tecidos dos organismos, levando a biomagnificação através da migração nos níveis tróficos até as camadas superiores da cadeia, causando prejuízos à biodiversidade quase sempre irreparáveis (CLEMENTS; REES, 1997; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Essa bioacumulação ocorre mesmo quando as quantidades desses tóxicos estão bem abaixo dos limites permitidos por lei (CAMPOS *et al.*, 2002).

1.5 ESPECIAÇÃO DO ARSÊNIO POR VOLTAMETRIA

A especiação se resume em identificar e quantificar a distribuição de diferentes formas do elemento químico, que juntas constituem a totalidade do elemento na amostra. A voltametria envolve os métodos eletroanalíticos que compreende a relação entre a corrente e o potencial durante a eletrólise da espécie química de interesse. Através de um sistema potenciostático de três eletrodos são feitas as medidas de corrente, e o potencial resultante é registrado simultaneamente, gerando a curva (voltamograma) (HARRIS, 2001).

A voltametria é amplamente utilizada na determinação de arsênio inorgânico em matrizes aquosas devido a sua sensibilidade. Ressalta-se o método voltamétrico de redissolução anódica (ASV), pois este é bastante sensível por

envolver uma etapa de pré-concentração eletroquímica do As com potencial constante e controlado, na qual o As(III) é depositado no eletrodo de trabalho. Esta etapa é seguida por uma etapa de repouso e uma de determinação, sendo que esta última consiste na redissolução de volta à solução da espécie anteriormente eletrodepositada (CARVALHO *et al.*, 2004).

Através da especiação do As^{III} em uma solução é possível dizer a concentração efetiva da espécie tóxica em um sistema e afirmar com mais contundência os possíveis efeitos desse elemento sobre a biota. O foco nesta espécie se justifica devido a maior toxicidade da mesma sobre os seres vivos (HARRIS, 2001; HUGHES *et al.*, 2011). Trabalhos ecotoxicológicos que fornecem dados referentes à química da água tornam-se mais confiáveis e completos.

2 INTRODUÇÃO

O arsênio é um elemento químico de ocorrência global considerado de risco para a saúde humana e para o ecossistema. Estudos recentes têm revelado que há exposição crônica humana a este elemento há séculos, que, em muitos casos, esta relacionada com as propriedades geoquímicas de aquíferos que fornecem o abastecimento de água para determinadas regiões (LIAO *et al.*, 2011; ROOT *et al.*, 2009). Esta geodisponibilização já foi comprovada em diversos locais, principalmente em países asiáticos, como verificado por Ng *et al.* (2003) e Berg *et al.* (2001), e também na América Latina (BUNDSCHUH *et al.*, 2012).

Bundschuh *et al.* (2012) revelam que pelo menos 20 países na América Latina são afetados pela alta concentração de As na composição mineralógica. No Brasil, as regiões diagnosticadas estão no estado de Minas Gerais, local onde há grande riqueza e exploração mineral. Como já mencionado, o As pode ser disponibilizado de forma antrópica no ambiente através de atividades metalúrgicas (SHIBAYAMA *et al.*, 2010), que são frequentes nessa porção sudeste do Brasil.

No estado do Espírito Santo já foram constatadas, através de estudos ambientais e monitoramento de regiões portuárias, concentrações elevadas de As na matriz sedimentar de estuários e da plataforma continental (IEMA, 2008; IEMA, 2008; MIRLEAN *et al.*, 2012). Especula-se que esse fato seja decorrente de backgrounds geoquímicos naturais, porém, deve-se considerar um possível reflexo potencializador da disponibilidade de As pelas atividades de mineração. Mirlean *et al.* (2012) sugerem ainda que as formações calcárias recifais retém o arsênio, que é derivado do grupo barreiras, em sua composição. Esta formação geológica rica em sulfetos é comum no estado do Espírito Santo.

Em função disso, é de extrema importância investigar se essas contaminações por As são capazes de afetar significativamente os ecossistemas costeiros. Isso por que, uma vez biodisponibilizado, o As pode ser assimilado pelos organismos aquáticos, gerando danos ao ecossistema e até mesmo a saúde humana. Com isso, os estudos aplicados aos efeitos causados por esse

contaminante à biota local tornam-se imprescindíveis, subsidiando propostas para a conservação desses ambientes.

A escolha do robalo peva (*C. parallelus*) como organismo-teste, além dos motivos já citados anteriormente, se deve ainda a possibilidade de trabalhar com a realidade de ambos os ambientes reconhecidamente contaminados: a região costeira de plataforma continental e os estuários. Como se trata de um organismo diádromo (anfídromo), ou seja, realiza migrações entre o oceano e os rios ao longo de toda a vida por causa das demandas fisiológicas (SILVA *et al.*, 2011), essa espécie é, de fato, representativa ecologicamente e suporta grandes variações de salinidade.

Além disso, como afirmado por Lavanya *et al.* (2011), os peixes são bons bioindicadores por estarem sempre expostos ao As, no caso de ambientes contaminados como a costa do ES, e ainda podem agir como vetores da contaminação humana através do seu consumo. Há ainda a carência de estudos sobre as consequências bioquímicas do impacto do arsênio sobre peixes (LAVANYA *et al.*, 2011).

Para a determinação das concentrações sub letais de exposição dos juvenis de *C. parallelus* ao As, são empregadas técnicas tradicionais de avaliação dose-resposta da toxicidade aguda (CL_{50-96h}) da substância sobre o organismo-teste (CRUZ *et al.*, 2004). As concentrações sub letais encontradas são utilizadas para delinear os parâmetros fisiológicos, como as alterações enzimáticas e danos oxidativos, o que é proposto por Ventura-Lima *et al.* (2009) para o zebrafish (*Danio rerio*). Esses distúrbios oxidativos muitas vezes provocam a redução do consumo de oxigênio, que funciona como outra importante reposta à toxicidade. A especificação do elemento químico utilizado nas soluções-teste, a partir de técnicas padronizadas, é indispensável para um resultado mais expressivo de acordo com Carvalho *et al.*, 2004, Boock e Machado-Neto (2005), Medeiros *et al.* (2008), entre outros.

A problemática do As reforça a ideia de que tem sido um grande desafio para pesquisadores e legisladores de política do meio ambiente conciliar o desenvolvimento humano e a manutenção das características ecológicas. Mesmo que sejam de fontes naturais, os compostos tóxicos disponibilizados podem levar a sérios prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente. Dessa

forma, este trabalho visa fornecer informações pertinentes para o banco de dados ecotoxicológicos a partir da resposta de uma importante espécie-chave de topo de cadeia (*Centropomus parallelus*) à exposição ao arsênio (As), elemento de grande relevância ecotoxicológica, em especial para o estado do Espírito Santo (MIRLEAN *et al.*, 2012). Do ponto de vista do modelo biológico escolhido, a espécie *C. parallelus* ainda é pouquíssimo estudada, especialmente em relação aos impactos de contaminantes sobre esta. Sendo assim, existe a necessidade de fomento deste tipo de pesquisa, a fim de facilitar o entendimento mais preciso sobre os níveis seguros dessa substância no ambiente aquático.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a toxicidade do arsênio (As) sobre juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) a partir da observação de alterações fisiológicas nas brânquias e no cérebro, e determinar se há influência da salinidade na toxicidade do elemento.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar as atividades das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) nas brânquias;
- Avaliar os níveis da glutathiona reduzida (GSH) nas brânquias como resposta toxicológica do *C. parallelus* ao arsênio;
- Estimar o dano oxidativo nas brânquias através da verificação de lipoperoxidação (TBARS/LPO);
- Determinar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro;
- Verificar se existe influência da salinidade nessas alterações fisiológicas;
- Analisar o comportamento do arsênio na água sem a influência fisiológica do organismo-teste;
- Quatificar as espécies inorgânicas trivalentes de arsênio nas amostras de solução-teste dos bioensaios.

4 HIPÓTESES

4.1 HIPÓTESE 1:

H_1 – A exposição de juvenis de *C. parallelus* ao arsênio causam alterações enzimáticas e danos celulares significativos nas brânquias e no cérebro, evidenciando o potencial tóxico do elemento sobre um organismo de importância ecológica e econômica.

H_0 - A exposição de juvenis de *C. parallelus* ao arsênio não causam alterações enzimáticas e danos celulares significativos nas brânquias e no cérebro, evidenciando que este elemento não é potencialmente tóxico a este organismo de importância ecológica e econômica.

4.2 HIPÓTESE 2:

H_1 – A salinidade afeta a toxicidade do arsênio sobre os juvenis de *C. parallelus* a partir da menor disponibilidade das espécies químicas mais tóxicas e redução dos danos fisiológicos.

H_0 - A salinidade não afeta a toxicidade do arsênio sobre os juvenis de *C. parallelus*, pois não reduz significativamente a disponibilidade das espécies químicas mais tóxicas, mantendo as alterações fisiológicas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os exemplares juvenis de robalo peva (*C. parallelus*) foram obtidos de um cultivo em Linhares/ES e a aclimação foi feita no Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos (LabCOM/UFES). Os juvenis foram mantidos em sistema de recirculação em tanques de 400L contendo água com salinidade 15 ± 5 , filtrada ($5\mu\text{m}$) e com aeração constante, sendo alimentados diariamente com ração comercial INVE NRD 1,2mm (60% de proteína). As biometrias dos peixes utilizados na exposição foram realizadas periodicamente, sendo os valores médios dos organismos expostos de $10\pm 1,5\text{cm}$ e $8\pm 1\text{g}$.

Após a aclimação, os peixes foram transferidos em grupos de 5 indivíduos para aquários de vidro de 10L, com três réplicas para cada concentração, onde foram realizados os experimentos. Esses aquários foram mantidos sob aeração e temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$) constantes e fotoperíodo 12:12hs (claro:escuro). O teste foi semi-estático, feito com a renovação total da solução todos os 4 dias (96h). A alimentação foi administrada antes da troca da água evitando a contaminação por matéria orgânica no meio experimental.

O arsênio possui uma particularidade relacionada à sua solubilidade em água, que não ocorre instantaneamente e deve ser feita em uma solução básica de hidróxido de sódio (NaOH). Para chegar as concentrações desejadas foram feitas soluções-mãe com base na diluição de 1,32g de As_2O_3 (trióxido de arsênio) em 100ml de solução alcalina (1M NaOH) por três horas em agitador magnético, onde se alcançou uma solução com 10g de As/L (EPA, 1978). O pH foi ajustado para 8 com a adição de HCl como sugere Roy e Bhattacharya (2005). A partir dessa solução foram realizadas as diluições para alcançar as concentrações desejadas nos experimentos, sendo que as soluções-teste eram preparadas 24h antes de cada troca de água.

Para a determinação da concentração letal para 50% dos peixes ($CL_{50\%}$), foi feita a exposição dos indivíduos juvenis de *Centropomus parallelus* a diferentes concentrações de As apenas na salinidade 25. Estes foram distribuídos em grupos de 5 em recipientes de vidro com três réplicas cada ($n=15$ por concentração). Os organismos foram expostos as concentrações de 1, 3, 5, 8 e 10 mg de As/L durante 96h, determinadas em testes piloto. Foi verificada a mortalidade nas primeiras 24h (6h, 12h e 24h) e depois a cada 24h até completar as 96h. O critério de mortalidade adotado foi a ausência de qualquer tipo de movimento quando estimulados por toque.

Os testes sub-letais foram realizados com base nos resultados obtidos na determinação da CL_{50-96h} . As exposições foram fatoriais (25% e 50% da CL_{50-96h}) mais uma concentração de As mais baixa para visualizar os efeitos em soluções mais diluídas. Cada concentração de exposição teve três réplicas, perfazendo um total de 12 unidades experimentais distribuídas nas baterias de teste com a salinidade 5 e 25. As características físico-químicas da água foram monitoradas diariamente por meio de um multiparâmetro YSI Professional Plus. Amostras da água de arsênio eram coletadas nos tempo T0h e T24h de exposição e fixadas com NHO_3 suprapuro (1%).

Ao final das 96h de exposição, os peixes foram colocados em solução anestésica (Benzocaína, 100 mg/L) até que os movimentos diminuíssem. A dissecação foi realizada em placas refrescadas com gelo seco, e os tecidos dispostos em eppendorfs devidamente identificados e em gelo seco. Foram separados o cérebro e as brânquias para posteriores análises bioquímicas. Os tecidos foram armazenados a $-80^{\circ}C$ em ultrafreezers no LabPeixe - Universidade de Vila Velha/ES.

5.2 DETERMINAÇÕES

Todas as análises enzimáticas e de dano oxidativo foram realizadas no laboratório de determinações do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Rio Grande – FURG. As amostras foram mantidas em ultrafreezers e permaneceram em gelo durante todos os procedimentos de determinação analítica. Foram analisadas aleatoriamente amostras representantes de cada réplica, para que todos os ambientes experimentais fossem contemplados, sendo o n amostral total igual a 5, que corresponde a 5 peixes em cada concentração. Os resultados foram dependentes dos valores de proteína total, que foram obtidos pelo método do Biureto ou pela técnica de Bradford, esta última quando necessária maior precisão analítica. Todas as determinações de proteína foram feitas, pelo menos, em duplicata (ZAIA *et al.*, 1998)

5.2.1 CATALASE (CAT) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

As análises da atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) foram feitas nas brânquias através do protocolo metodológico proposto por Beutler (1975) e modificado por Bainy (1996) para a CAT, e o protocolo de McCord e Fridovich (1969) revisado por Bainy *et al.* (1996) para a análise da SOD. Ambas as leituras foram feitas em cubetas de quartzo em espectrofotômetro.

O primeiro método (CAT) consistiu em verificar a atividade da catalase por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à 240 nm por 60 segundos. Para a determinação da Catalase, as brânquias foram homogeneizadas em 1M tampão TRIS-HCl, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA, e centrifugados a 9.000g, durante 30 minutos a 4° C. O meio de reação, 1 mL, continha 40 mM tampão TRIS-HCl, pH 8,0, com 5 mM de EDTA e 12 mM de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). A reação foi iniciada pela adição de 10 µL do extrato bruto a 700µl de tampão de reação.

A determinação da superóxido dismutase (SOD) se deu com a homogeneização das brânquias em tampão de 1M tampão TRIS-HCl, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA, e centrifugados a 9.000g, durante 30 minutos a 4° C. O extrato enzimático, 10µL, foi incubado em 700µl de meio de reação contendo 1M tampão K₂HPO₄, pH7,8, contendo 0,1mM de EDTA, 0,043µM de xantina (Sigma X7375), 10 µM citocromo c (Sigma C7752) e 0,2 U/mL de xantina oxidase (Sigma X1875). A reação foi iniciada pela adição de 25µL de xantina oxidase. A concentração de XO (xantina oxidase) promoveu uma variação do branco de 0,030 unidades por minuto. O íon superóxido, gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase, reduziu o citocromo c, que foi monitorado a 550 nm por 60 segundos. A atividade enzimática foi expressa em unidades de SOD por mg de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo c.

5.2.2 ACETILCOLINESTERASE (AChE)

O método para a determinação da acetilcolinesterase baseia-se no trabalho de Ellman *et al.* (1961) que consiste na determinação da taxa de produção de tiocolina. O substrato, iodeto de acetilcolina, foi hidrolisado pela enzima, liberando tiocolina e acetato. A tiocolina reagiu com o DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) produzindo o ânion âmarelho. A absorbância foi lida a 412 nm em leitor de Elisa por três minutos.

Os tecidos cerebrais dos peixes foram homogeneizados em tampão de fosfato preparado por 8.5g de KH₂PO₄ em 250ml de água MilliQ e 2,5g de NaOH em 250ml de água MilliQ, onde se misturou 50ml da primeira solução em 39,5ml da segunda ajustando o pH para 7,4. O substrato feito de iodeto de acetilcolina consistiu em 5,4mg do reagente para 1ml de água MilliQ. O reagente de cor foi feito com 39,6mg de DTNB dissolvido em 10ml de tampão fosfato (0,1M), onde foi adicionado 15mg de bicarbonato de sódio. A atividade colinesterásica foi dosada pela adição de 1ml do tampão de homegeneização, 50µl de reagente de cor, 50µl do substrato e 50µl do extrato homogeneizado.

5.2.3 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Os níveis de glutatona (GSH) nas brânquias foram determinados a partir do protocolo de White *et al.* (2003). Esse método se baseia na reação do naftalenodicarboxialdeído (NDA) em glutatona para formar produtos ciclizados que são altamente fluorescentes. A fluorescência foi medida (472nm ex/528nm) em placa de fluorescência (Victor 2, Perkin Elmer). As amostras de cérebro foram homogeneizadas em tampão de Tris-HCl 110mM, EDTA 2mM MgCl 5mM em pH 7,5, e centrifugadas a 10.000g por 20 minutos a 4°C.

Sendo assim, foi preparado um coquetel de reação de 400mM de Tris-HCl, 40mM de ATP, 20mM de glutamato, 20mM de EDTA, 20mM de borato de sódio, 2mM de serina e 40mM de MgCl, sempre imediatamente antes do começo do ensaio para prevenir a degradação do ATP. Foram adicionados 50µl de ácido sulfossalicílico (SSA, 200Mm) e depois 2mM cisteína. A montagem foi feita em placa de fundo cônico que foram centrifugadas por 5 minutos a 2000g e a alíquota do sobrenadante retirada e transferida para novas placas para a leitura da fluorescência no Victor 2 (Perkin Elmer).

Uma curva padrão para GSH foi realizada com as concentrações de GSH de 1,25nM, 2,5nM, 5nM, 10nM, 20nM e 40nM através do preparo da uma solução de 4000nM de GSH, pesando 6,1mg e levando a 5ml em tampão de homogeneização, realizando em seguida as devidas diluições.

5.2.4 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO/TBARS)

O estabelecimento do dano oxidativo lipídico nas brânquias foi determinado pelo método TBARS de acordo com Oakes e Van der Kraak (2003). Este método envolve a reação do malondialdeído (MDA), um produto de degradação de lipídios peroxidados, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob condições de alta temperatura e acidez, gerando um cromógeno que é quantificado por fluorimetria. A quantificação de MDA é utilizada como marcador do dano oxidativo em moléculas lipídicas.

Os reagentes utilizados foram solução estoque de hidroxitoluenobutilado (BHT) na proporção de 15,5 mg de BHT para 50 ml de etanol. Foi feita uma solução de ácido acético a 20%, pH a 3,5, e uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,8%, ou seja, 0,4 g de TBA em 50 mL de água Milli Q. Esta solução foi preparada no momento de efetuar a dosagem. Também foi preparada uma solução de DSS (dodecil sulfato de sódio) 8,1%, que funciona como um detergente na dosagem de TBARS que facilita a extração de malondialdeído.

Assim como para GSH, no método TBARS por fluorimetria foi determinada a fluorescência das amostras e da curva padrão. A curva padrão foi construída através de uma diluição seriada, onde primeiramente adicionou-se 5 μ L de 1,1,3,3-tetramethoxypropano (TMP) a 25 ml de água Milli Q, da qual foram obtidas as demais diluições de valor conhecido da substância.

Adicionou-se 10 μ L de amostra e 41,2 μ L de cada padrão em tubos de vidro (em duplicata). Logo após, adicionou-se 20 μ L de solução estoque de BHT, apenas em tubos referentes às amostras. Em seguida, colocou-se 150 μ L da solução de ácido acético 20% e 150 μ L da solução de TBA 0,8%. Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de água Milli Q e 20 μ L de SDS 8,1%. Após misturar em vórtex, os tubos foram aquecidos em banho-maria a 95 °C por 30 minutos. Os tubos foram esfriados por 10 minutos a temperatura ambiente e depois foram adicionados 100 μ L de água Milli Q e 500 μ L de n-butanol em cada tubo. Misturou-se em vórtex novamente e centrifugou-se a 3.000 g por 10 minutos a 15°C, para promover a separação da fase aquosa da alcoólica. Logo após foram removidos 150 μ L da fase orgânica (sobrenadante), sendo adicionada em microplacas brancas para fluorescência. A leitura foi feita em fluorímetro, com comprimento de excitação de 520 nm e emissão de 580 nm (Víctor 2, Perkin Elmer) e os resultados foram expressos em nmol de equivalentes de TMP por mg de tecido fresco.

5.3 CONSUMO DE OXIGÊNIO

A avaliação do consumo de oxigênio foi realizada através da utilização de uma câmara hermeticamente fechada (respirômetro), onde era acoplado o multiparâmetro YSI Professional Series para a medida do OD em mg/L. O respirômetro possui saídas de escape para possíveis bolhas formadas dentro da câmara antes desta ser fechada. As medidas foram realizadas ao final do período de exposição (96h), onde se mediu o consumo de oxigênio de um indivíduo por réplica por 30 minutos ($n=3$ por concentração de As). Procurou-se manter a homogeneidade biométrica durante as medições, assim como para todo o experimento, minimizando a possibilidade de resultados influenciados pela diferença de biomassa entre os peixes.

A determinação do tempo de medição necessário do consumo de oxigênio pelos juvenis de robalo-peva foi feita a partir de testes-piloto, até que se chegasse ao consumo correspondente a 30% do oxigênio total. Isso se deve ao fato de que abaixo de 70% da saturação de oxigênio no meio o organismo pode se tornar osmoconformador, se adaptando as condições de baixa oxigenação (WRIGHT, 2007). Foi verificada a saturação do oxigênio da água antes de cada medição para se determinar estes 70%, tanto para a salinidade 25 quanto para a salinidade 5. Também antes de cada medição, os indivíduos foram mantidos por 10 minutos dentro do respirômetro para amenizar os efeitos do estresse pelo manuseio.

5.4 ESPECIAÇÃO

A especiação do arsênio foi determinada por voltametria no Laboratório de Análises Químicas da Universidade Federal de Santa Maria (LACHEM/UFSM). A técnica consistiu em determinar as concentrações de arsenito (As^{III}) nas soluções-testes utilizadas em casa ensaio. O arsenito, entre as espécies

inorgânicas, é considerado o mais tóxico. Por isso, é importante saber a efetiva concentração dessa espécie que foi fornecida para os juvenis de robalo-peva.

As análises foram realizadas tanto nas amostras de água dos bioensaios, como nas amostras obtidas em um experimento para a verificação do comportamento do arsênio sem a influência dos organismos. Ou seja, foram fornecidas as mesmas condições dos bioensaios, porém sem os peixes para verificar o que aconteceu com o metalóide. Os tempos de coletas foram antes (T0h) e depois (T24h) das exposições (ou sem exposição) para todos os experimentos.

O aparelho de medição foi o Processador 693 VA Processor (Metrohm). As soluções foram preparadas em água destilada, deionizada e purificada em um sistema Milli-Q e os reagentes utilizados foram de grau analítico. A solução padrão de As(III) 1g L^{-1} foi preparada pela dissolução de 0,0330g do sal As_2O_3 em 250 μL de NaOH 25% que foi posteriormente acidificada com 500 μL de HCl diluído em balão volumétrico de 25ml com água ultrapura.

Para a análise por ASV preparou-se uma solução de HCl 1 mol L^{-1} pela adição de 850 μL de HCl concentrado diretamente na célula voltamétrica com 10 mL de amostra (valores base). Na metodologia sugerida por Stefanello (2007), foram adicionados 100 μL da solução padrão para obter o sinal do arsênio na curva. O desaeramento da solução foi feito por borbulhamento de nitrogênio durante cinco minutos. Antes da deposição do As(III) no eletrodo, foi aplicado um potencial de limpeza de 0,70 V por 30 segundos para garantir a reprodutibilidade das medidas. O tempo de sinal bem como o volume da amostra variou de acordo com as concentrações de As.

5.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A normalidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, baseado nos momentos de curtose e simetria (Zarr, 1999). A atividade enzimática foi utilizada como variável dependente e a concentração do As como variável independente. Diferenças entre os tratamentos (análise de variância) foram

analisadas por ANOVA de uma via ($p \leq 0,05$), e posteriormente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), quando os dados eram paramétricos, e por Kruskal-Wallis com post-test de Dunn ($p < 0,05$) para dados não-paramétricos. Os dados gerados na CL_{50-96h} foram analisados utilizando-se o programa computacional Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977).

6 RESULTADOS

6.1 CL_{50-96h}

A concentração letal para 50% dos organismos (CL_{50-96h}) foi de 5mg As/L, como indica a figura 2. Da mesma forma, a menor concentração de efeito observado (CEO) e a maior concentração de efeito observado (CENO) também estão indicadas no gráfico.

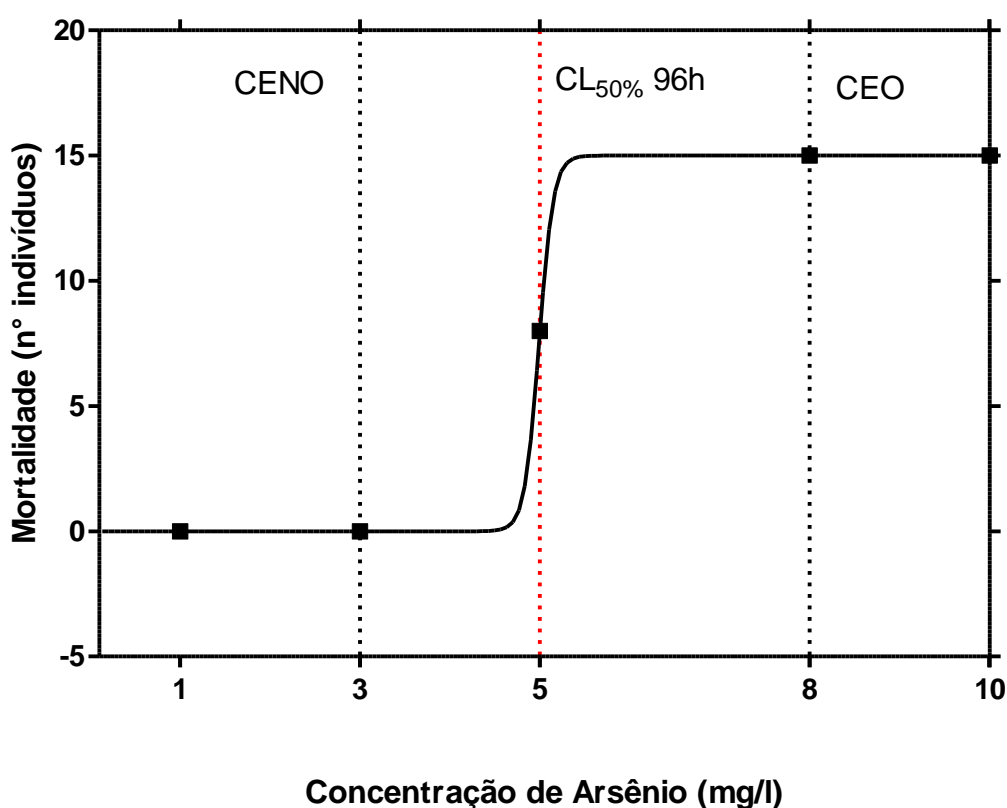


Figura 2: Valores da CL₅₀, CEO e CENO em mg/L de As para os juvenis de *Centropomus parallelus* após 96 horas de exposição a diferentes concentrações letais (n=15). Os valores correspondem a 2 experimentos de exposição letal.

Com base na CL_{50-96h} foram determinadas as concentrações fatoriais de 25% e 50% de 5mg As/L. Assim, as concentrações utilizadas para as posteriores exposições sub letais foram de 1,25mg As/L, 2,5mg As/L, além do controle e de uma concentração mais baixa de 0,1mg As/L.

Na figura 3 é possível visualizar os efeitos letais do As sobre os juvenis de *C. parallelus*. Neste gráfico observa-se que até a concentração de 3mg As/L não houve mortalidade, sendo que a partir de 5mg As/L a mortalidade foi crescente, e a partir das exposições a 8mg As/L e 10mg As/L foi de 100%. É ainda interessante observar que, com o aumento da concentração de As fornecida (8mg As/L e 10mg As/L), já nas primeiras 6 e 12 horas verifica-se mortalidade. Além disso, essa representação ainda favorece a percepção do tempo em que os organismos podem resistir mesmo em condições extremamente tóxicas, como é o caso da concentração 8mg As/L, onde cerca de 60% dos indivíduos resistiram até às 48h.

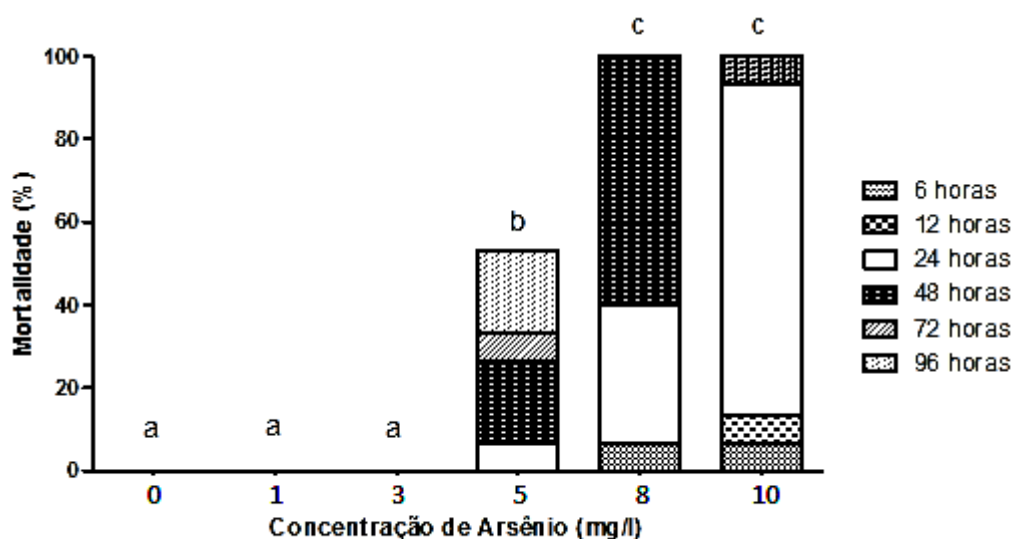


Figura 3: Mortalidade dos juvenis de *Centropomus parallelus* pelas concentrações em mg/L de As após 96 horas de exposição. Os valores correspondem a 2 experimentos de exposição letal. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). Os valores representam a média de quinze indivíduos ($n=15$) por tratamento.

Como a mortalidade foi nula para 1mg As/L e 3mg As/L, é possível dizer que este tratamento não diferiu do controle. Já a concentração letal (CL_{50}) apresenta diferenças para o controle, para as concentrações inferiores e para as concentrações superiores, pois esta se manteve com um resultado intermediário de mortalidade. Entre 8mg As/L e 10mg As/L não houve diferença, pois em ambas 100% dos juvenis morreram.

Em todos os testes os parâmetros físico-químicos da água foram aferidos diariamente com o objetivo de manter a qualidade experimental. Esses valores foram expressos em média \pm desvio padrão de todas as medidas na tabela 1. Todos os padrões foram mantidos sem grandes alterações dentro de cada salinidade e as condições que estas oferecem.

Tabela 1: Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis físico-químicas das soluções-teste do bioensaio com *C. parallelus* de acordo com os tratamentos: Controle, C1 (0.1mg As/L), C2 (1.25mg As/L) e C3 (2,5mg As/L) medidos a cada 24h.

Tratamentos		pH	OD (mg/L)	Temperatura (°C)	Salinidade
Salinidade 25	Controle	7,75 \pm 0,24	5,8 \pm 0,25	25 \pm 1	25 \pm 0,5
	C1	7,82 \pm 0,28	5,5 \pm 0,27	25 \pm 1	25 \pm 0,34
	C2	7,61 \pm 0,12	5,3 \pm 0,18	25 \pm 1	25 \pm 0,41
	C3	7,45 \pm 0,29	5,5 \pm 0,15	25 \pm 1	25 \pm 0,56
Salinidade 5	Controle	6,15 \pm 0,35	6,67 \pm 0,28	25 \pm 1	5 \pm 0,15
	C1	6,12 \pm 0,20	6,26 \pm 0,26	25 \pm 1	5 \pm 0,25
	C2	6,21 \pm 0,19	6,36 \pm 0,21	25 \pm 1	5 \pm 0,32
	C3	6,14 \pm 0,17	6,5 \pm 0,24	25 \pm 1	5 \pm 0,2

6.2 CATALASE (CAT)

Os dados da atividade da catalase nas brânquias de *Centropomus parallelus* nas diferentes salinidades estão demonstrados na figura 4. Nesse caso, é possível observar uma nítida inibição da atividade da enzima, tanto para a salinidade 5 quanto para a 25, nas maiores concentrações. Na concentração mais baixa (0,1mg As/L) não houve uma inibição significativa da atividade da CAT.

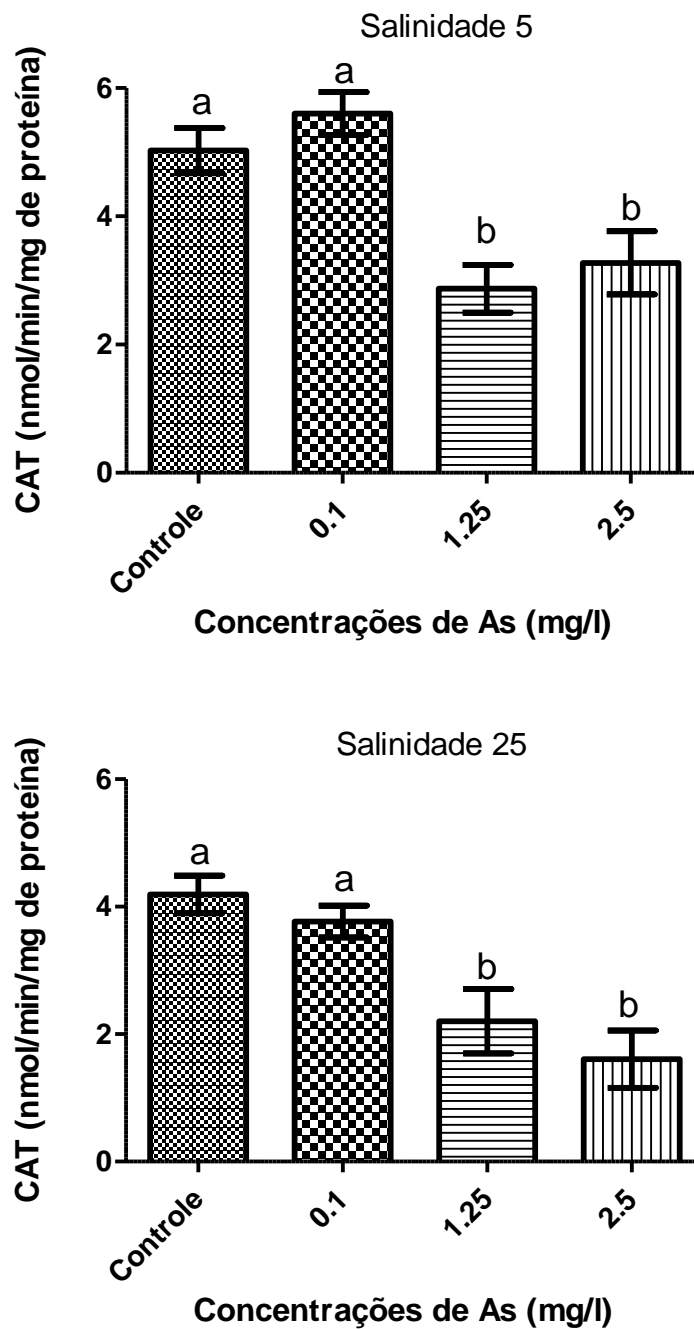


Figura 4: Atividade da catalase (CAT) no tecido branquial dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metalóide) nas diferentes salinidades durante 96h. A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μmol de H_2O_2 min^{-1} . Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). Os valores representam a média de cinco indivíduos ($n=5$) por tratamento, com duas determinações enzimáticas cada.

As letras indicam que houve uma diferença significativa na inibição da CAT nas concentrações 1,25mg As/L e 2,5mg As/L em relação ao controle, porém essas concentrações não foram estatisticamente diferentes entre si. Ou seja, o As proporcionou um declínio substancial na atividade da catalase nas altas concentrações e em ambas as salinidades, porém esta inibição não foi maior em 2,5mg As/L do que 1,25mg As/L, mesmo com o maior fornecimento de As. Observações pontuais podem ser feitas acerca da concentração 0,1mg As/L, onde a atividade da CAT foi relativamente maior na salinidade 5 do que na salinidade 25, porém, a letra igual a do controle indica que estatisticamente esta diferença não foi significativa.

6.3 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD nas brânquias está representada na figura 5, que mostra que houve uma diminuição desta atividade conforme o aumento das concentrações de As.

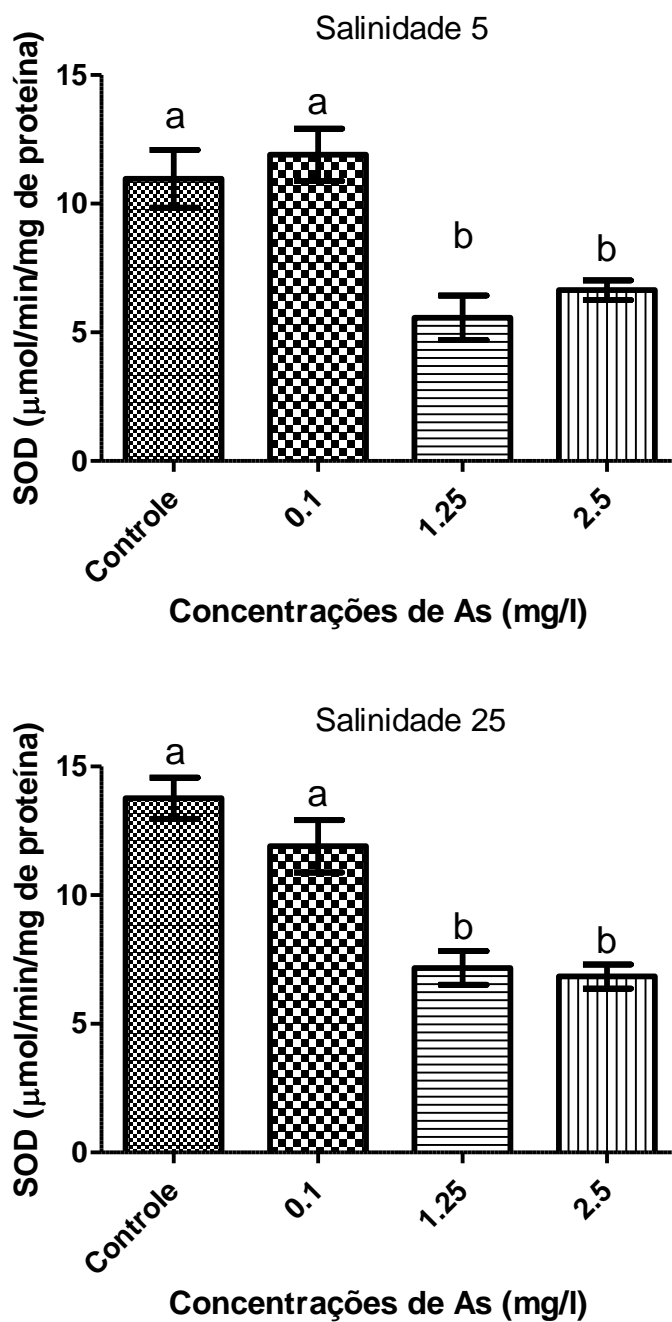


Figura 5: Atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido branquial dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metalóide) nas diferentes salinidades durante 96h. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de 50% do citocromo c. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de variância One-way ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média de cinco indivíduos ($n=5$) por tratamento, com duas determinações enzimáticas cada.

A diferença pontual está ligada ao fato de que desta vez é possível observar um leve aumento na atividade para as concentrações 0,1mg As/L e 2.5mg As/L na salinidade 5, porém a concentração inferior não é estatisticamente diferente do controle, bem como 2.5mg As/L não é diferente de 1.25mg As/L. As concentrações superiores não tiveram diferenças estatísticas entre si, mas foram diferentes do controle nas duas salinidades.

Fica claro que o comportamento da SOD foi semelhante ao da CAT, sendo que para os dois importantes agentes antioxidantes (CAT e SOD) a inibição foi marcante nas duas maiores concentrações (1.25 e 2.5mg As/L) quando os valores são comparados ao controle. Não houve diferenças significativas na resposta à exposição entre as salinidades para a SOD

6.4 ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A acetilcolinesterase no cérebro de *C. parallelus* respondeu claramente aos efeitos do arsênio através da redução da atividade enzimática conforme o aumento das concentrações, mas não é possível observar a influência da salinidade na toxicidade do As (figura 6). Ambas as salinidades apresentaram uma resposta semelhante para a concentração 0,1mg As/L, a qual não apresentou diferenças estatísticas ao controle, mas também não é diferente das concentrações superiores.

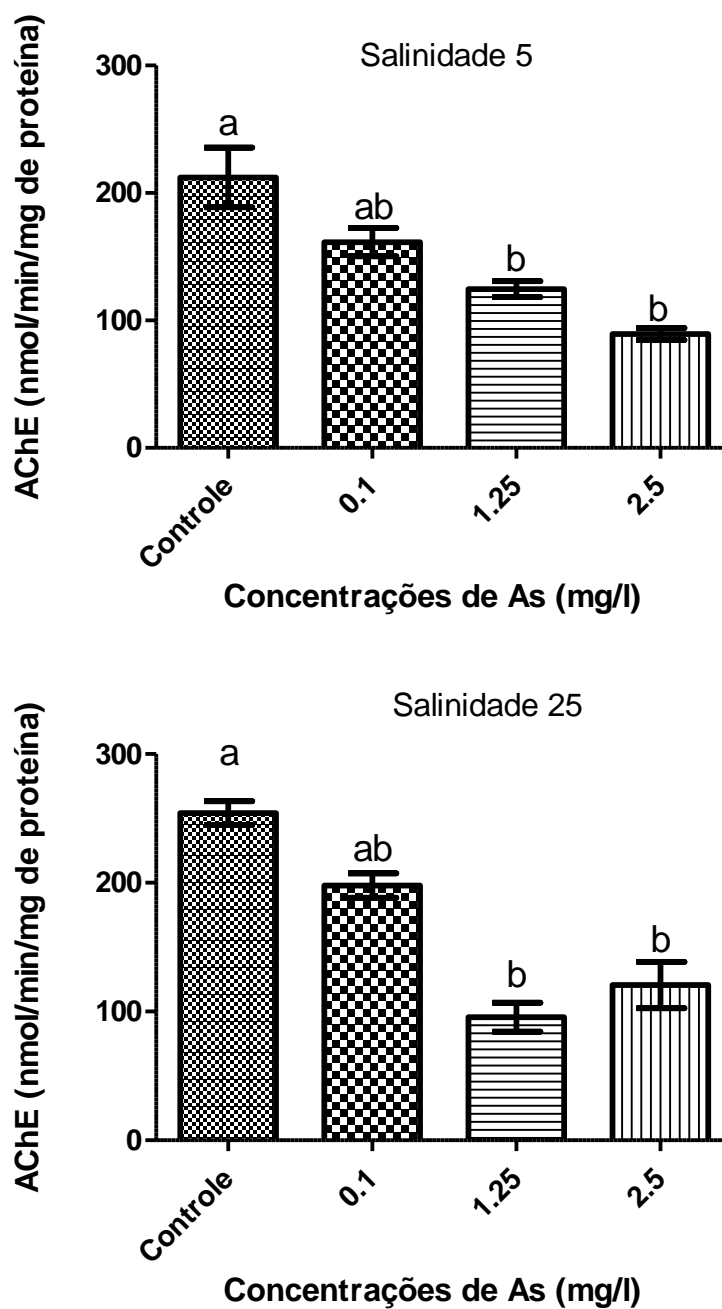


Figura 6: Atividade colinesterásica (AChE) no tecido cerebral dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metaloide) nas diferentes salinidades durante 96h. A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg de proteína. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de variância One-way ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média de cinco indivíduos ($n=5$) por tratamento, com três determinações enzimáticas cada.

Quando se observa o comportamento da enzima perante a exposição ao arsênio, nota-se que nas concentrações de 1,25mg As/L e 2,5mg As/L houve uma forte inibição do componente colinesterásico (AChE) em ambas as salinidades. Novamente as altas concentrações não diferiram entre si, mas são significativamente diferentes do controle.

6.5 GLUATIONA REDUZIDA (GSH)

A resposta dos níveis de glutathiona nas brânquias de *C. parallelus* apresentou um comportamento semelhante os das enzimas de defesa CAT e SOD, como pode ser observado na figura 7. Ou seja, não houve diferenças significativas entre as concentrações mais altas, mas estas se diferem do controle, pois foi em 1,25mg As/L e 2,5mg As/L que houveram as maiores diminuições nos níveis da GSH. A menor concentração (0,1mg As/L) não foi estatisticamente diferente do controle em ambas as salinidades.

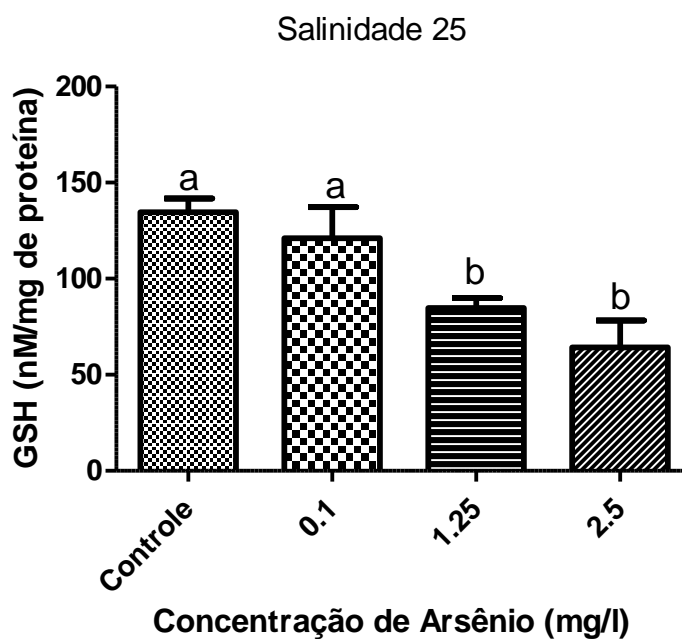
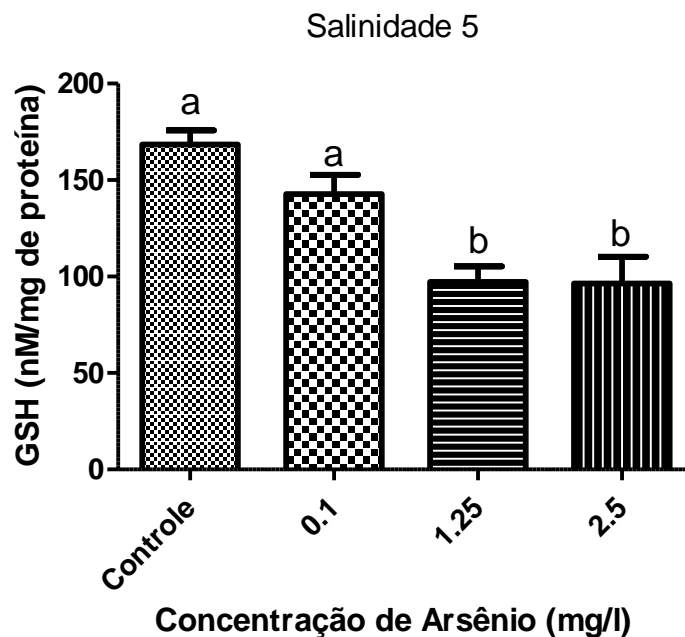


Figura 7: Níveis de glutatona reduzida (GSH) no tecido branquial dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metaloide) nas diferentes salinidades durante 96h. Os níveis de glutatona foram expressos em nM/mg de proteína. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). Os valores representam a média de cinco indivíduos ($n=5$) por tratamento, com duas determinações enzimáticas cada.

6.6 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

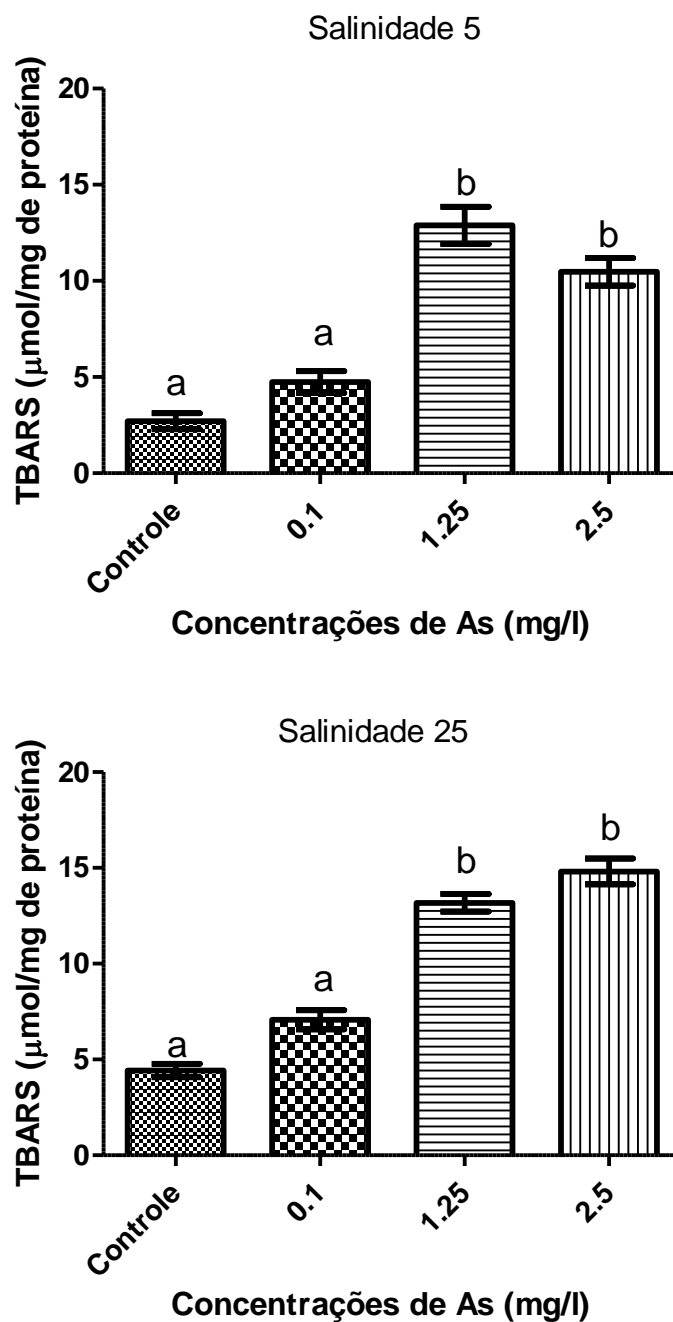


Figura 8: Lipoperoxidação nas brânquias dos juvenis de robalo peva expostos a três concentrações de arsênio (As) e ao grupo controle (sem o metalóide) nas diferentes salinidades durante 96h. O dano oxidativo (LPO) foi expresso em TBARS por $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de variância One-way ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média de cinco indivíduos ($n=5$) por tratamento, com seis determinações de MDA cada.

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) mostrou que o aumento do dano oxidativo lipídico foi bem evidente de acordo com o aumento da concentração de arsênio, como mostra a figura 8. Um detalhe pontual é que a concentração 1,25mg As/L refletiu numa peroxidação mais elevada do que 2,5mg As/L na salinidade 5, mas não a ponto de serem estatisticamente diferentes entre si. Da mesma forma que os demais biomarcadores, para 1,25mg As/L e 2,5mg As/L a LPO foi efetivamente maior e diferente estatisticamente do controle. A concentração de 0,1mg As/L não foi diferente do controle, mas é possível observar um aumento relativo em relação a este, demonstrando a sensibilidade dos juvenis de *C. parallelus* ao arsênio.

6.7 RESPIROMETRIA

Após a verificação da efetiva ocorrência do estresse oxidativo provocado pelo arsênio sobre os juvenis de robalo-peva, confirma-se que esta resposta refletiu no consumo de oxigênio pelos indivíduos, como ilustra a figura 9. Ao analisar os resultados, é importante ressaltar que as variações ocorridas entre as salinidades são dependentes das maiores concentrações de O₂ encontradas em águas de baixa salinidade, devido a maior concentração do gás nesses ambientes.

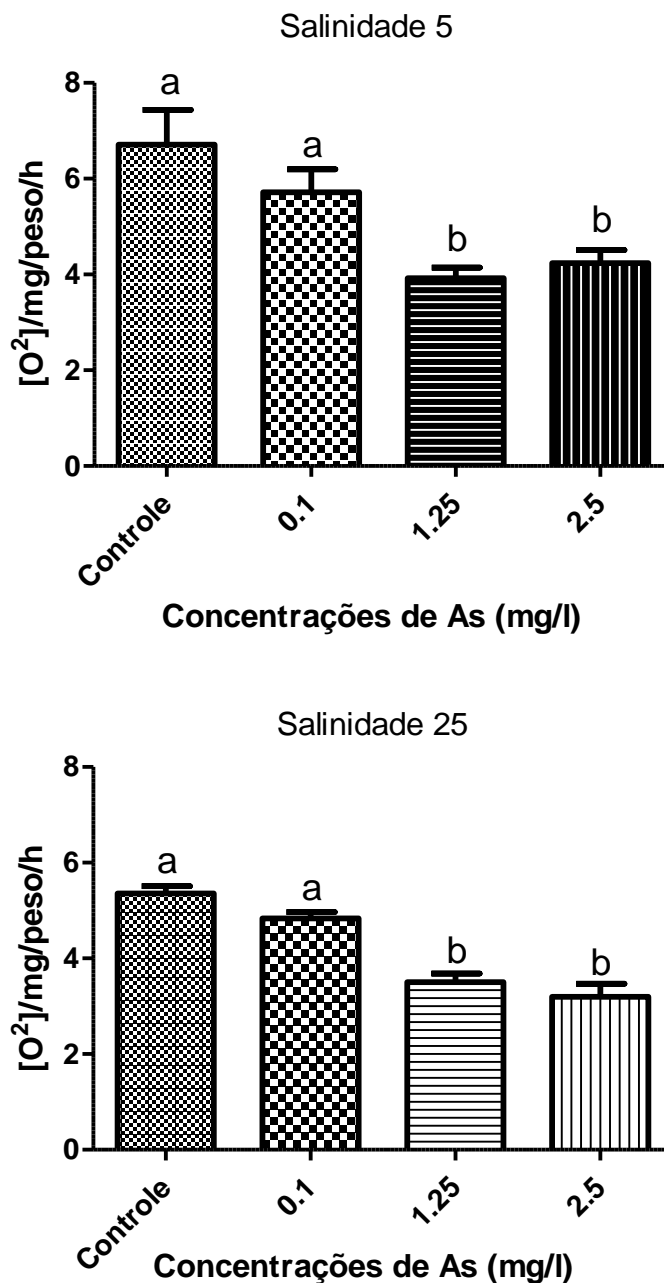


Figura 9: Consumo de oxigênio em mg/peso do peixe/h medido por respirometria ao longo de 30 minutos ao final das 96h de exposição (n=3/tratamento). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de variância One-way ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao observar os gráficos acima, confirma-se que houve uma diminuição no consumo de oxigênio de acordo com os tratamentos, sendo que nas maiores concentrações de arsênio essa diminuição foi significativa. Observa-se ainda

que a menor concentração não diferiu significativamente do controle, mas foi diferente das concentrações superiores.

Na salinidade 5 a diminuição do consumo de oxigênio foi menos regular, uma vez que os indivíduos na maior concentração apresentaram um leve aumento na absorção de O_2 . Provavelmente isso aconteceu devido à similaridade das respostas entre as condições de intoxicação de 1,25mg As/L e 2,5mg As/L em todas as variáveis bioquímicas analisadas.

6.8 ESPECIAÇÃO QUÍMICA

A especiação do arsênio nas substâncias-teste (amostras de água) é primordial para entender a relação entre a real concentração do componente tóxico e os seus efeitos. Com isso, os valores da especiação do arsenito (As^{III}), ilustrados na figura 10, que correspondem as amostras de água dos bioensaios, mostram que, de acordo com o aumento das concentrações, maior foi a disponibilidade do elemento. Além disso, é possível observar que no tempo 0h de coleta a disponibilidade de As^{III} era muito maior. Isso se deve ao fato de ainda não ter ocorrido à exposição e a consequente absorção do tóxico pelos organismos. O contrário acontece no tempo 24h, quando o elemento ocorre em menores concentrações.

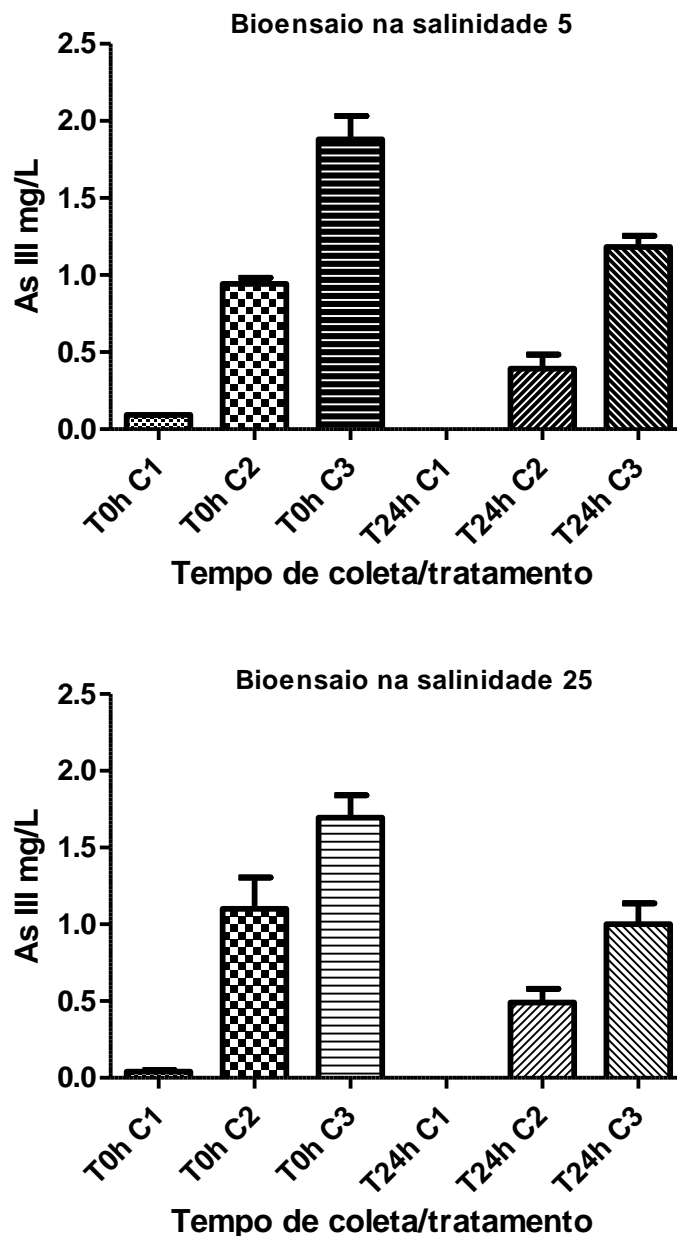


Figura 10: Valores de Arsenito (As III) nas soluções-teste determinados por voltametria nos experimentos de exposição de *C. parallelus*. O T0h indica os valores das amostras da solução-teste ainda sem a exposição dos organismos e T24h corresponde aos valores de As III após a exposição e as respectivas concentrações: C1 (0.1mg As/L); C2 (1.25mg As/L) e C3 (2.5mg As/L). Os valores representam a média de três amostras filtradas (biodisponível) da solução-teste (n=3) por tratamento.

A fim de traçar um comparativo entre a concentração inicial (T0h) e concentração final (T24h) entre as salinidades, cada gráfico expressa essa relação para os diferentes tratamentos. O mesmo é representado para o comportamento do arsênio nas soluções-teste (figura 11).

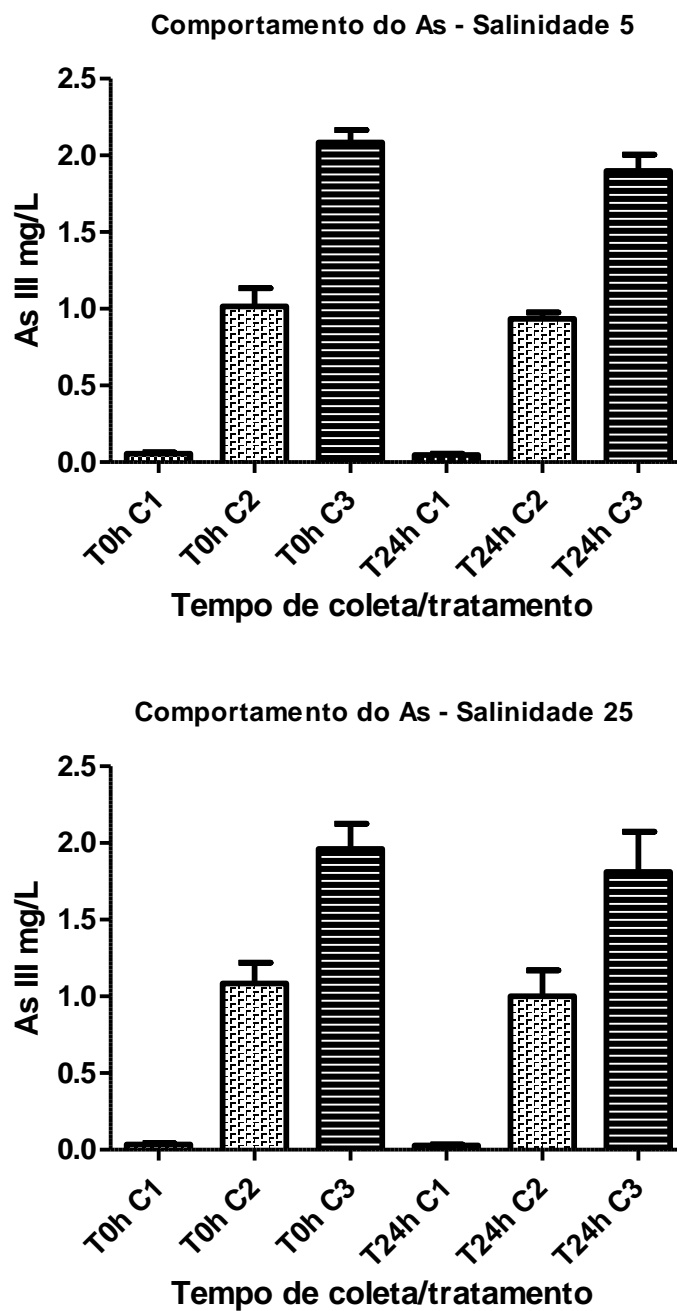


Figura 11: Valores de Arsenito (As III) nas soluções-teste determinados por voltametria nos experimentos do comportamento do arsênio na solução-teste. O T0h e T24h indicam os tempos de coleta das amostras e as respectivas concentrações: C1 (0.1mg As/L); C2 (1.25mg As/L) e C3 (2.5mg As/L). Os valores representam a média de três amostras filtradas (biodisponível) da solução-teste (n=3) por tratamento.

É possível observar nesta figura que, quando não há a exposição, o arsênio possui um comportamento estável ao longo do tempo e independente da condição experimental, pois após as 24h a quantidade do elemento perdida por reações de complexação e adsorção não é representativa em ambas as salinidades. Esses valores são importantes para confirmar que, quando há a exposição, a quantidade de As perdida pode, de fato, ser atribuída à absorção dos juvenis de *C. parallelus*. Para todas as análises de especiação, não houve diferenças significativas na disponibilidade do arsenito entre as salinidades.

7 DISCUSSÃO

O valor letal de arsênio proposto para os juvenis de *C. parallelus* esta abaixo dos valores encontrados em outros trabalhos envolvendo outras espécies de peixes. Exemplos das diferentes respostas letais do As sobre peixes são dados por Das *et al.* (2012), que determinaram a CL₅₀ do As para o teleósteo *Channa punctatus* de 42mg/L, bem como Lavanya *et al.* (2011) descrevem a CL₅₀ de As para *Catla catla* de 20,41mg As/L. Em ambos os experimentos os peixes eram adultos e por isso as concentrações são mais elevadas. Esse valor pode ser ainda maior de acordo com a biomassa, como para adultos de *Clarias batrachus* (peixe-gato), onde 50% resistem a até 80mg As/L (GHOSH *et al.*, 2006). Erickson *et al.* (2012) propõem a CL₅₀ para juvenis de truta (*Oncorhynchus mykiss*) de 15mg As/L.

Essa diferença entre as respostas pode ser explicada, pela variabilidade entre as espécies, estágio de desenvolvimento, biomassa e pelos aspectos ambientais. No caso do robalo, os mesmo estavam em estágio juvenil inicial, o que corresponde a uma fase mais sensível do ciclo de vida do organismo, por isso a CL_{50-96h} foi de 5mg As/L. Normalmente, a morte pela exposição aguda ao As é provocada pelo aumento da produção de muco no epitélio branquial que causa sufocamento (BHATTACHARYA *et al.*, 2007).

Diante dos resultados obtidos com a exposição crônica dos juvenis de robalo-peva ao arsênio, constatou-se que este tóxico é capaz de induzir o estresse oxidativo e causar danos celulares por vezes irreversíveis aos organismos. Tendo em vista o princípio do Modelo do Ligante Biótico (BLM), proposto por Paquin *et al.* (2002) e aprimorado por estudos de Biachini e Wood (2002ab), a brânquia é considerada um ligante biótico carregado negativamente, a qual o As pode se ligar, sendo que os efeitos tóxicos são considerados a partir do grau de saturação dos sítios de ação. Neste caso, como todas as variáveis bioquímicas avaliadas nas brânquias foram alteradas com a exposição ao As, considera-se que esses distúrbios foram provocados por esta saturação dos sítios de ação das membranas celulares das brânquias.

O efeito tóxico do arsênio para os juvenis de *C. parallelus* deve ainda ser discutido do ponto de vista do metabolismo do xenobiótico nos seres vivos. Como já citado anteriormente, uma vez absorvido pelo organismo o arsênio tende a ser enzimaticamente metilado formando compostos orgânicos que, ao contrário do que se pensava, não funciona como uma via de detoxificação, pois as formas orgânicas podem manter o seu potencial citotóxico (AHSAN *et al.*, 2007). Ou seja, mesmo o mecanismo que era considerado o responsável pela desativação da toxicidade, hoje já é conhecido como um potencializador dos efeitos, fomentando os prejuízos do As aos juvenis de robalo-peva.

O estresse oxidativo observado se deve ao fato de que este metalóide tem a capacidade de atacar os grupos sulfidril de enzimas e proteínas, provocando sua inativação e levando ao desequilíbrio do sistema oxidante com o aumento das ROS. Esta característica tóxica metabólica do arsênio está ligada às propriedades metálicas do elemento, visto que os elementos metálicos possuem ação sobre o sítio de ligação da sulfidril induzida pela atração iônica (HUGHES *et al.*, 2002; HUGHES *et al.*, 2011; NELSON *et al.*, 2007).

Além disso, como o arsênio foi fornecido em concentrações elevadas (na ordem de ppm) era de se esperar que efeitos sobre o mecanismo de defesa antioxidante fossem observados, pois esta é a primeira alteração metabólica que ocorre na presença de xenobióticos. Além disso, esses desequilíbrios são previsíveis e o dano iminente, pois a brânquia é o tecido alvo (ligante biótico) e via direta de absorção (BIANCHINI; BOWLES, 2002; JAISWALL, 1994).

Os resultados encontrados, por exemplo, para a catalase, na qual e mesma foi inibida significativamente nas maiores concentrações de exposição, pode ser explicado pelo comportamento metálico do As, uma vez que já foi verificado que os metais têm capacidade de inibir a atividade da CAT em diversos organismos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; WOO *et al.*, 2009). Contudo, a catalase pode apresentar resultados contraditórios de acordo com o tipo de exposição, de modo que o aumento da atividade também indique estresse oxidativo com o objetivo de regular os níveis das ROS. Assim, tanto a indução

como a inibição pode ser observada como resposta após a exposição a poluentes ambientais (VAN DER OOST *et al.*, 2003). O mesmo pode ser considerado para a SOD e GSH.

Ventura-Lima *et al.* (2009) constataram que para o zebrafish (*Danio rerio*) o arsênio não apresentou efeito sobre a atividade da catalase nas brânquias, o que pode estar associado as baixas concentrações de As administradas na pesquisa (1µg, 10µg e 100µg As/L). Além disso, estes mesmos autores fazem um comparativo com o aumento de alguns componentes de defesa antioxidante que ajudam a manter o equilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante, como a GSH. O mesmo não foi observado neste trabalho, onde todos os elementos de defesa foram afetados negativamente pela exposição ao As, não sendo possível regular esse sistema.

Bhattacharya *et al.* (2007) sugerem que o estresse oxidativo do As é mediado pelo H₂O₂. Essa característica, somada ao fato de que altas concentrações desse substrato inibem a CAT (AEBI, 1982), permite dizer que os níveis de H₂O₂ provavelmente foram muito elevados nos juvenis de robalo-peva, fazendo com que a CAT não pudesse agir na decomposição dessa espécie reativa do oxigênio. Possivelmente, quando em concentrações mais baixas, deve haver o aumento inicial na atividade da CAT para tentar diminuir os níveis de H₂O₂ (BHATTACHARYA; BHATTACHARYA, 2007; VENTURA-LIMA *et al.*, 2009), seguido por uma forte inibição no caso do fornecimento de concentrações elevadas de As, como foi feito para *C. parallelus*. Bhattacharya e Bhattacharya (2007) ainda relatam que *C. batrachus* expostos ao arsênio apresentaram diminuição da atividade da CAT. O mesmo aconteceu para *Channa punctatus* (ALLEN; RANA, 2004) e com os juvenis de robalo-peva.

O radical superóxido é agente inibidor da catalase, contudo, em presença de SOD, a inibição da CAT é reduzida (FILHO *et al.*, 1993; KONO; FRIDOVICH, 1982), devido a dismutação do O₂⁻ pela SOD. Como ambas as defesas foram inibidas, visto que ocorreu a efetiva diminuição das atividades nas concentrações mais altas de As para as duas enzimas, este equilíbrio do

sistema oxidativo não se manteve. Mesmo que não tenha havido diferenças significativas, é possível observar que na salinidade 5 a atividade da CAT na menor concentração foi um pouco maior do que o controle, sugerindo que este aumento seja decorrente de uma tentativa inicial de decomposição do peróxido de hidrogênio. Este fato também se baseia na maior atividade da SOD também nesta condição (salinidade 5), o que reforça a ideia de que a ação da CAT é potencializada na presença da SOD.

A sensibilidade da SOD a metais pesados é reconhecida, o que possibilita o seu uso como biomarcador em vários organismos que apresentam alterações em suas atividades enzimáticas (VUTUKURU *et al.*, 2006). Vutukuru *et al.* e Huang *et al.* (2006) confirmaram esta sensibilidade ao determinarem as alterações estruturais e inibições na atividade enzimática da SOD em peixes quando expostos a metais pesados.

Os efeitos da SOD diante da exposição a diferentes xenobióticos podem ser muito variáveis. Vieira *et al.* (2009) demonstram ativação de 100% da SOD ao expor peixes da espécie *Pomatoschistus micros* ao cobre. Bhattacharya e Bhattacharya (2007) descrevem a redução da atividade da SOD para o teleósteo *C. batrachus* após a exposição ao arsênio, assim como o observado para *C. parallelus* neste trabalho. Levin *et al.* (1996) estudaram também a influência da SOD no comportamento e aprendizado de peixes, mostrando que esta enzima possui função primordial na adaptação e sobrevivência de teleósteos em meio natural.

O arsenito é tido como um potente inibidor da acetilcolinesterase (AChE), como é reportado por Roy *et al.* (2006), levando esta enzima a níveis basais conforme o aumento do tempo de exposição. Autores afirmam que, mesmo que haja a inibição de 10-20% da AChE, os peixes são capazes de sobreviver por um certo tempo, apesar do indispensável papel desta enzima na neurotransmissão dos impulsos nervosos durante a sinapse colinérgica (STOYTCHEVA *et al.*, 1998). Embora a AChE não contenha grupos sulfidríla (alvo de ataque do arsênio) é reconhecido que este tóxico é capaz de inibir a sua ação (ROY *et al.*, 2006).

Assis *et al.* (2012) estudaram o efeito de pesticidas organofosforados, que contém As em sua composição, sobre a atividade colinesterásica cerebral de três diferentes espécies de peixes tropicais: pirarucu (*Arapaima gigas*), cobia (*Rachycentron canadum*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*), e descobriram que para todas as espécies houve uma inibição substancial da AChE, chegando a níveis basais quando em 8ppm dos compostos orgânicos testados. Outro trabalho com juvenis de tilápia relata que a inibição da AChE por pesticidas está ainda relacionada com a fase de vida do peixe, sendo que os peixes em estado inicial de desenvolvimento de fato apresentam maior sensibilidade (CHADRASEKARA, PATHIRATNE, 2007).

Os resultados da AChE obtidos para os juvenis de robalo-peva mostram a diminuição da atividade da enzima nas maiores concentrações, mas também há inibição na menor concentração (0,1mg As/L), que apresenta semelhança estatística com as concentrações de 1,25mg As/L e 2,5mg As/L. Ou seja, neste caso, mesmo em concentrações mais baixas o arsenito teve efeito sobre o componente colinérgico, reafirmando o seu potencial neurotóxico (PAZHANISAMY *et al.*, 2007). Apesar de existir algumas pesquisas com esta ênfase, o conhecimento dos efeitos do As sobre a AChE ainda é muito limitado (BHATTACHARYA *et al.*, 2007; STURM *et al.* 1999).

Ao testar os efeitos do As em ratos, Mittal e Flora (2006) relataram a diminuição da GSH e da SOD, e o aumento nas TBARS, assim como ocorreu para os juvenis de *C. parallelus*, confirmando que esta alteração ocorre em diferentes organismos, deixando-os susceptíveis aos danos bioquímicos. É interessante ainda destacar o potencial genotóxico do As através de diminuição catalítica de aminotransferases, como pode ser visto em estudos de Das *et al.* (2012) tendo como organismo-teste uma espécie de peixe. Respostas também são vistas em parâmetros sanguíneos e fatores de crescimento, os quais são fortemente afetados pela presença do arsênio (LAVANYA *et al.*, 2011; COCKELL; HILTON, 1988). Por mais que estas variáveis fisiológicas não tenham sido o foco de investigação desta pesquisa, deve-se considerar que toda e qualquer alteração causada pelo As pode desencadear danos

bioquímicos em estruturas essenciais para a estabilização do sistema fisiológico que garante a manutenção da vida.

A glutathiona reduzida (GSH) é conhecida como um importante elemento protetor das células contra as ROS geradas por xenobióticos. Especificamente em relação aos peixes, diversos trabalhos abordam a glutathiona como uma importante defesa antioxidante não enzimática que ocorre em altas concentrações. Existem diferentes respostas dose-específicas do status da GSH para peixes, onde para alguns metais é reportado o aumento da GSH com a exposição (THOMAS; WOFFORD, 1984), até mesmo para o arsênio (VENTURA-LIMA, *et al.*, 2009). De forma contrária, Das *et al.* (1998) identificou a diminuição nos níveis de GSH, assim como ocorreu com os juvenis de robalo-peva neste trabalho. Roy e Bhattacharya (2006) identificaram uma oscilação de acordo com o tempo de exposição nos níveis de GSH para *Channa punctatus* expostos ao arsênio, quando ao final de 7 e 14 dias houve uma diminuição nos níveis quando comparado ao controle.

Bhattacharya *et al.* (2007) mencionam que a enzima glutathiona redutase (GR) tem um papel crucial na manutenção dos níveis de GSH, contudo, esses autores reportam que peixes expostos a baixas concentrações de As apresentam redução da atividade da GR. Esta é uma outra possibilidade para a diminuição da GSH nos juvenis de *C. parallelus*, tendo em vista que foi fornecida uma alta quantidade de As. Além disso, segundo Bandyopadhyay, *et al.* (1999), o arsenito pode inibir enzimas que geram co-enzimas reduzidas como NADH e NADPH. A escassez de NADPH pode ter um efeito direto nos níveis de glutathiona reduzida (GSH), já que prejudica a redução da glutathiona oxidada (GSSG) pela glutathiona redutase (GR).

A GSH possui um papel inicial de detoxificação de xenobióticos, o que pode promover um aumento nos níveis desta proteína. Nesta hora, ressalta-se o papel da glutathiona no processo de metilação do arsênio com propósito de eliminação (detoxificação). A glutathiona serve como doador de elétrons para a redução do arsenato a arsenito no organismo, tornando possível a metilação, que ocorre, preferencialmente, pelo substrato reduzido (As^{III}) formando

arsenitotriglutationa (As^{III} (GS)₃) (KOBAYASHI *et al.*, 2005). Porém, mais uma vez ressaltando a exposição a concentrações altas de As, possivelmente a diminuição observada nos níveis de GSH é um reflexo de uma reação aguda, onde o tempo de exposição (96h) inviabilizou a observação do aumento nos níveis representado pelo aumento da atividade de detoxificação (VAN DER OOST *et al.*, 2003)

No trabalho de Ventura-Lima *et al.* (2009) a concentração mais alta de As testada corresponde a concentração mais baixa deste trabalho. O resultado para esta concentração (0,1mg As/L) não mostrou um aumento da GSH para *C. parallelus*, mas também não houve uma diminuição significativa quando comparado ao controle. Isso pode indicar que, para os juvenis de robalo-peva, a resposta da metilação pela GSH seja limitada. Além disso, a ocorrência das outras alterações fisiológicas neste trabalho é explicada pela diminuição dos níveis de GSH, caso contrário, esses danos possivelmente não teriam ocorrido ou seriam amenizados.

O dano oxidativo pesquisado neste trabalho foi determinado pelas TBARS, que envolvem a peroxidação de ácidos graxos pelas ROS. Soundararajan *et al.* (2009) identificaram dano lipídico para *Tilapia mossambica* expostos ao arsênio. De forma similar, Pedlar *et al.* (2002) relatam a ocorrência de peroxidação lipídica para a truta *Salvelinus namaycush* exposta a diferentes concentrações de As, onde os autores citam ainda a indução da LPO com a exposição do teleósteo *Anadas testudineus* a 1.5mg As/L durante 48h. Por outro lado, Schlenk *et al.* (1997) não observaram grandes alterações lipídicas no fígado do peixes-gato após o condicionamento ao As, resultados também obtidos por Ventura-Lima *et al.* (2009) nas brânquias do peixe-zebra. Este desequilíbrio provocado pelo aumento das ROS é o responsável pelos danos oxidativos, como a lipoperoxidação (MATÉS, 2000).

Uma das mais drásticas consequências da lipoperoxidação é o dano à estrutura lipídica da membrana celular, desestabilizando fisiologicamente as propriedades celulares. As consequências para as membranas biológicas podem ser de vários níveis de severidade, dependendo da natureza e

concentração do oxidante, variando desde reduções localizadas na fluidez da membrana até a ruptura total da integridade da bicamada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005).

Esse dano é normalmente verificado em células do fígado, devido ao sua maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo (BHATTACHARYA *et al.*, 2007). Bhattacharya e Bhattacharya (2007) demonstram o estresse oxidativo imposto pelo arsênio sobre a espécie de peixes *Clarias batrachus*, pois o mesmo causou aumento significativo das TBARS/MDA, que é explicado pelo aumento das ROS. Da mesma forma, Grim *et al.* (2011) destacam o papel antioxidante da CAT na prevenção de danos lipídicos em diversas espécies marinhas de peixes através da degradação do peróxido de hidrogênio. Como a CAT foi inibida nos juvenis de robalo-peva, assim como as outras defesas antioxidantes, houve o aumento da lipoperoxidação para *C. parallelus*.

Normalmente as concentrações de exposição de As em bioensaios são da ordem de ppb, o que muitas vezes pode não ser suficiente para provocar distúrbios bioquímicos evidentes. Bagnyukova *et al.* (2007), por exemplo, ao exporem o peixe-dourado a 200µg As/L, não observaram peroxidação lipídica, mas houve um aumento nos níveis hepáticos de GSH. Mais uma vez fica a hipótese de que, provavelmente, quando o As é administrado em pequenas doses, a GSH consegue exercer o seu papel antioxidante, diminuindo as ROS e o estresse oxidativo. Porém, quando em quantidades elevadas, este balanço não se mantém.

O forte efeito percebido sobre os juvenis de robalo-peva das concentrações 1,25mg As/L e 2,5mg As/L sobre os níveis de GSH e TBARS e na atividade de importantes enzimas antioxidantes como CAT e SOD nas brânquias, e a AChE no cérebro, é reflexo do maior fornecimento de As e o aumento da biodisponibilidade para a absorção pelos peixes sob essas condições experimentais. Os resultados obtidos para a CAT, SOD, GSH e LPO na concentração de 0,1mg As/L indicam que esta condição não foi suficiente para causar o estresse oxidativo evidente. O resultado contrário encontrado para a AChE deve ser baseado especificamente na propriedade neurotóxica do As

sobre esta enzima. Não foi possível observar influência da salinidade sobre a toxicidade do As, mesmo que pontualmente haja algumas variações entre as concentrações nas diferentes salinidades.

Quanto a redução do consumo de oxigênio pelos peixes após a exposição, fica claro o poder tóxico do arsênio sobre o metabolismo energético. O arsenito (As^{III}) é efetivo inibidor da piruvato desidrogenase, enzima atuante no ciclo de Krebs e produção de energia. Sendo assim, o arsênio reduz a respiração mitocondrial fazendo com que haja o menor consumo de oxigênio pelos juvenis de robalo-peva. A mitocôndria, como principal sítio de produção de energia celular, é diretamente atingida pelo arsênio, levando a prejuízos generalizados no metabolismo energético celular (HUGHES, 2002). Além disso, sendo a brânquia o órgão respiratório dos peixes e tecido alvo do arsênio, a exposição provocou a diminuição da troca gasosa nas altas concentrações.

De acordo com Fattorini *et al.* (2004), devido a sua similaridade, o arsênio compete com o fosfato durante a fosforilação oxidativa, podendo inibir a síntese de ATP, aumentando, assim, a produção de ROS. Logo, os elétrons que deveriam atravessar a cadeia de transporte de elétrons acumulam-se e poderão se ligar a outras moléculas, dentre elas o oxigênio, gerando espécies intermediárias que, como dito anteriormente, são responsáveis pelos danos oxidativos a macromoléculas e a diminuição do potencial energético celular.

Visto que houve estímulo bioquímico sobre os juvenis de *C. parallelus* à exposição ao arsênio, deve ser ressaltado a influência da espécie química predominante em todas as condições experimentais, o arsênio (As^{III}). Com este resultado, fica ainda mais claro entender a as injúrias causadas pelo arsênio neste trabalho, pois o arsenito é tido como a espécie química mais tóxica aos seres vivos. Este aspecto deve ser considerado para todos os resultados obtidos, visto que esta foi, provavelmente, a espécie precursora dos efeitos observados.

Diversas pesquisas utilizam o trióxido de arsênio (As_2O_3) como veículo, pois este disponibiliza o arsênio como As^{III} (JIANG *et al.*, 2003; SHEN, 1997). O

que é interessante é que mesmo na salinidade 25 o arsênio se manteve majoritariamente como arsenito, mesmo que este meio tenha a tendência em oxidá-lo e transformá-lo em As^V (BARRA *et al.*, 2000). É indispensável ressaltar que, como foi feito o teste para a verificação do comportamento do arsênio sem a exposição dos peixes neste trabalho, é possível afirmar que a diminuição do As^{III} após a exposição nos bioensaios foi provocada, efetivamente, pela absorção dos organismos. Esta é mais uma ferramenta que permite atribuir os efeitos fisiológicos observados ao arsenito.

Embora autores como Zhang *et al.* 2012, ao estudarem a espécie marinha de peixe *Terapon jarbua*, tenham identificado um alto potencial de detoxificação do As através da conversão metabólica em arsenobetaina (AsB), este padrão não foi observado para os juvenis de robalo-peva. Os autores sugerem ainda que a via de detoxificação pela metilação (MMA e DMA) ocorre como forma de eliminação ou diminuição dos potenciais tóxicos do As ao metabolismo, ideia esta que não é defendida em outras pesquisas (ARNOLD *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 2004), que fomentam que as formas metiladas retêm a toxicidade sobre os organismos, especialmente em estágio III de oxidação. Além do mais, com a redução nos níveis de glutathiona (mediadora da metilação) esse processo provavelmente foi prejudicado nos juvenis de *C. parallelus*.

A salinidade não afetou a especiação, pois foi verificado um padrão altamente conservativo do arsênio inorgânico trivalente (As^{III}) após as 24h nos experimentos com ou sem exposição. Além disso, a influência da salinidade deve ser interpretada pelo caráter semi-metálico do arsênio, pois as propriedades metálicas e não metálicas regem a disponibilidade do elemento através da maior ou menor susceptibilidade a sofrer reações com o meio (GREGG; SING, 1982). Esta propriedade pode ser vista como limitante da adsorção com os cloretos, pois esta ligação ocorre prioritariamente com cátions metálicos (AGUIAR *et al.*, 2002; CERQUEIRA; AGUIAR, 2000).

Uma abordagem interessante da influência do ambiente aquático sobre a disponibilidade de elementos químicos deriva das pesquisas realizadas por Bianchini e Bowles (2002), Bianchini *et al.* (2002), onde os autores revelam que os sais presentes em água salobra e salgada influenciam a disponibilidade de metais devido a complexação. Em contrapartida, a água doce possui quantidades superiores de sulfetos do que águas salgadas, o que balanceia as possíveis influências nas duas vertentes (MYLON; BENOIT, 2001; TANG; SANTSCHI. 2000). Considerando que o As com o seu comportamento metálico se liga fortemente aos compostos sulfatados, é possível dizer que a salinidade não influenciou significativamente no efeito tóxico do arsênio sobre as variáveis bioquímicas, porque as concentrações de arsenito eram semelhantes em ambos os ambientes, como comprovado na especiação.

8 CONCLUSÕES

Os efeitos tóxicos do arsênio sobre os juvenis de robalo-peva (*C. parallelus*) foram evidentes através da resposta imediata na indução do estresse oxidativo, Todos os biomarcadores utilizados nesta pesquisa (CAT, SOD, AChE, TBARS e GSH) responderam aos estímulos da exposição, onde foram influenciados negativamente pelo arsênio. Sendo assim, o arsênio possui um potencial inibitório das enzimas antioxidantes, revelando que este metalóide é extremamente tóxico para o organismo-teste, sobretudo, pelos danos oxidativos e alterações em importantes mecanismos de defesa, como a GSH. Além disso, o arsênio ainda diminuiu o consumo de oxigênio pelos peixes, o que leva a prejuízos devastadores no metabolismo energético.

A inexistência da alteração das respostas bioquímicas entre as salinidades permite afirmar que este fator físico-químico não é capaz de influenciar significativamente a toxicidade do arsênio sobre os juvenis de robalo-peva. As variações pontuais que ocorreram entre as salinidades são, na verdade, decorrentes da própria interação entre as defesas e outros fatores bioquímicos diante de uma condição de estresse oxidativo.

Na tocante ao que se refere às pesquisas que vem sendo realizadas sobre os efeitos do arsênio em organismos marinhos aquáticos, estas são escassas, sendo que ainda não se sabe os reais danos que este metalóide pode causar sobre um ecossistema. Diante da realidade global das elevadas concentrações de arsênio em meio natural, que muitas vezes condicionam a exposição crônica dos seres humanos e da biota e este químico, é imprescindível a investigação do potencial de ação do arsênio e suas consequências sobre os seres vivos. Neste quesito, é ainda importante que haja a preocupação em se estabelecer ações de controle e fiscalização das possíveis fontes de contaminação e exposição ao arsênio, bem como o biomonitoramento através de espécies-chave, como *C. parallelus*

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M. N.; SOUZA, E. C. P. M.; TOMMASI, L. R. Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. **Rev. Geologia**, Fortaleza, v. 19, n. 2, p. 253-261, 2006.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. v.105, p.121-126, 1984.

AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Quim. Nova**. v.25, p. 1145-1154, 2002.

AHSAN, H.; CHEN, Y.; KIBRIYA, M. G.; SLAVKOVICH, V.; PARVEZ, F.; JASMINE, F.; GAMBLE, M. V.; AND GRAZIANO, J. H. Arsenic metabolism, genetic susceptibility, and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev**. v.16, p.1270–1278, 2007.

AHSAN, H.; CHEN, Y.; KIBRIYA, M. G.; ISLAM, M. N.; SLAKOVICH, V. N.; GRAZIANO, J. H.; SANTELLA, R. M. Susceptibility to arsenic-induced hyperkeratosis and oxidative stress genes myeloperoxidase and catalase. **Cancer Lettes**, v. 201, n.1, p. 57–65, 2003.

ALLEN, T.; RANA, S. V. S. Effect of Arsenic (AsIII) on Glutathione-Dependent Enzymes in Liver and Kidney of the Freshwater Fish *Channa punctatus*. **Biological Trace Element Research** v. 100, 2004.

ANDREAE, M. O.; ANDREAE, T. W. Dissolved arsenic species in the Scheldt estuary and watershed, Belgium. **Estuar., Coast. Shelf Sci.**, v. 29: 421-433, 1989.

APOSHIAM, H. V. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.37, p. 397-410, 1997.

ARAÚJO, M. C. B.; COSTA, M. F. Lixo no ambiente marinho. **Ciência hoje**, v. 1, n. 191, p. 64-67, 2003.

- ARNOLD, L. L.; ELDAN, M.; VAN GEMERT, M.; CAPCA, C.; COHEN, S. M. Chronic studies evaluating the carcinogenicity of monomethylarsonic acid in rats and mice. **Toxicology**. v.190, p.197–219, 2003.
- ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A. G.; OLIVEIRA, V. M.; FRANÇA, R. C. P.; CARVALHO, E. V. M. M.. BEZERRA, R. S.; CARVALHO, L. B. C. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of The Total Environment**. v. 441, n.15, p.141–150
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. Rima: São Carlos, 2006.
- BAGNYUKOVA, T.V.; LUZHNA, L.; POGRIBNY, I.; LUSHCHAK, V. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. **Environ. Mol. Mutagen**. v.48, p. 658–665, 2007.
- BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v.34, p. 151-162, 1996.
- BANDYOPADHYAY, V.; DAS, D.; BANERJEE, R. K. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. **Current Science**, v.77, p. 658-666, 1999.
- BAPTISTA-NETO, J. A.; WALLNER-KERSANACH, M.; PATCHINEELAM, S. M. **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Inetr ciência, 2008.
- BARBER, A. A., BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. **Adv. Gerontol. Res.** v.2, p. 355-403, 1967.
- BARRA, C. M.; ABRÃO, J. J.; SANTELLI, R. E. S.; GUARDIA, M. Especificação de arsênio: uma revisão. **Química Nova**, v. 23, n.1, 2000.
- BARROSO, M. V.; SOUZA, G. A.; THOMÉ, J. C. A.; LEITE, N. O. J.; MOREIRA, L. M. P.; SANGALIA, C.; SALES, E. F.; DURÃO, J. N. Estratégias de conservação das populações de robalos *Centropomus* spp. na foz do Rio Doce, Linhares, Espírito Santo, Brasil. **Rev. Bras. de Agroecologia**. v.2 n.2, 2007.

BERG, M.; TRAN, H.C.; NGUYEN, T.C.; PHAM, H.V.; SCHERTENLEIB, R.; GIGER, W. Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: A human health threat. **Environmental Science & Technology**. v. 35, p. 2621–2626, 2001.

BEUTLER, E. 1975. CATALASE. IN: BEUTLER, E. **Red Cells Metabolism - a manual of biochemistry methods**. New York: Grune & Straton, p. 89-90.

BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, A.; ROY, S. Arsenic-induced responses in freshwater teleosts. **Fish Physiol Biochem**. v. 33, p.463–473, 2007.

BHATTACHARYA, A.; BHATTACHARYA, S. Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.66, n.2, p.178-187, 2007.

BIANCHINI, A.; BOWLES, K. C. Metal sulfides in oxygenated aquatic systems: implications for the biotic ligand model. **Comparative Biochemistry and Physiology** v.133, p.51-64, 2002a.

BIANCHINI, A.; BOWLES, K. C.; BRAUNER, C. J.; GORSUCH, J. W.; KRAMER, J. R.; WOOD, C. M. Evaluation of the effect of reactive sulfide on the acute toxicity of silver (I) to *Daphnia magna*. Part 2: Toxicity results. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 21, p.1294-1300, 2002b.

BIANCHINI, A.; WOOD, C. M. Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna*. **Comp Biochem Phys**. v.133:137–145, 2002.

BIDWELL, J. R.; GORRIE, J. R. The influence of salinity on metal uptake and effects in the midge *Chironomus maddeni*. **Environmental Pollution**. v.139, p. 206-213, 2006.

BOOCK, M. V.; MAHCADO-NETO, J. G. Estudos sobre a toxicidade aguda do oxiclreto de cobre sobre o peixe *Poecilia reticulata*. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v.31, n.1, p. 29 - 35, 2005.

BRAND, M.D.; AFFOURITIT, C.; ESTEVES, T.C.; GREEN, K.; LAMBER, A.J.; Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. **Free Radic. Biol. Med.** v.37, p.755– 767, 2005.

BRUCKA-JASTRZEBSKA, E. The Effect of Aquatic Cadmium and Lead Pollution on Lipid Peroxidation and Superoxide Dismutase Activity in Freshwater Fish. **Polish J. of Environ. Stud.** v. 19, n. 6, p. 1139-1150, 2010.

BUNDSCHUH, J.; LITTER, M. I.; PARVEZ, F.; ROMÁN-ROS, G.; NICOLLI, H. B.; JEAN, J. S.; LIU, C. W.; LÓPEZ, D.; ARMIENTA, M. A.; GUILHERME, L. R. G.; CUEVAS, A. G.; CORNEJO, L.; CUMBAL, L.; TOUJAGUEZ, R. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. **Science of the Total Environment.** v.429, p. 2–35, 2012.

CAMPOS, M. L. A. M.; BENDO, A.; VIEL, F. C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação de metais traços em águas naturais. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, 808-813, 2002.

CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D.; SCHARF, M.; SILVA, M. R. Especificação analítica de compostos de arsênio empregando métodos voltamétricos e polarográficos: uma revisão comparativa de suas principais vantagens e aplicações. **Quim. Nova**, v. 27, n. 2, p. 261-269, 2004

CAVALCANTI, A. D. Monitoramento da contaminação por elementos traço em ostras comercializadas em Recife, Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n. 5, p.1545-1551, 2003.

CERQUEIRA A. A.; AGUIAR M. R. M. P. **Em Catalizadores e Adsorbentes Iberoamericanos para la Remoción de Metales Pesados de Efluentes Industriales.** Ed. Cited: Madrid, 2000.

CHEN, K.P.; JIAO, J. J. Metal concentrations and mobility and mobility in marine and groundwater in coastal reclamation areas: a case study in Shenzhen, China. **Environmental Pollution.** v.151, p. 576–584, 2008.

CHENG, H.; WANG, Y-S.; CHEN, D-T.; WANG, Y-T.; PENG, Y-L.; WANG, L-Y. Influence of N deficiency and salinity on metal (Pb, Zn and Cu) accumulation

and tolerance by *Rhizophora stylosa* in relation to root anatomy and permeability. **Environmental Pollution**. v.164, p.110-117, 2012.

CLEMENTS, W. H.; REES, D. E. Effects of heavy metals on prey abundance, feeding habits, and metal uptake of brown trout (*Salmotrutta*) in the Arkansas River, Colorado. **Trans. Am. Fish.Soc.** v.1, n. 26, 774–785, 1997.

COCKELL, K. A.; HILTON, J. W. Preliminary investigations on the comparative chronic toxicity of four dietary arsenicals to juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquatic Toxicology**, v.12, p. 73-82, 1988.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n.7, 2008.

CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J. G.; MENEZES, M. L. Toxicidade aguda do inseticida Paration Metílico e do biopesticida Azadiractina de folhas de Neen (*Azadirachtaindic*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractusmesopotamicus*). **R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v.4, p. 93-102, 2004.

CULLEN, W.R.; McBRIDE, B.C.; MANJI, H.; PICKETT, A.W.,REGLINSKI, J.; The metabolism of methylarsine oxide and sulfide. **Appl. Organomet. Chem.** v. 3, p. 71–78, 1989.

DAS, D.; SARKAR, D.; BHATTACHARYA, S. Lipid peroxidative damage by arsenic intoxication is countered by glutathione- glutathione-S-transferase system and metallothionein in the liver of climbing perch, *Anabas testudineus*. **Biomed Environ Sci.** v. 11, p.187–195, 1998.

DAS, S.; UNNI, B.; BHATTACHARJEE, M.; WANN, S. B.; RAO, P. G. Toxicological effects of arsenic exposure in a freshwater teleost fish, *Channa punctatus*. **African Journal of Biotechnology**. v.11, n. 19, p. 4447-4454, 2012.

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H.J.. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v.64, p.1019-1026, 2002.

ELLIOTT, M. **Fiches in Estuaries**. London: Blackwell Science, 2002.

ELLMAN G. L.; COURTNEY K. D., ANDRES V. JR.; FEATHERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v. 7, p.88-95, 1961.

EPA. **Method for Arsenic determination on AA instrument.** Method 206.2. Environmental Protection Agency (US), 1978.

ERICKSON, R.; MOUNT, D.; HIGHLAND, T.; HOCKETT, J. R.; HOFF, D.; JENSON, C.; LAHREN, T. **Toxicity of arsenic to fish: role of exposure route, fish species and chemical form.** U S Environmental Protection Agency, 2012.

ESCOBAR, J.A.; RUBIO, M.A.; LISSI, E.A. SOD and Catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, p. 285-290, 1996.

FANG, TIEN-HSI.; HWANG, JIANG-SHIU.; HSIAO, SHIH-HUI.; CHEN, HUNG-YU. Trace metals in seawater and copepods in the ocean area off the northern Taiwan coast. **Marine Environmental Research.** v. 61, p. 224-243, 2006.

FATTORINI, D.; BOCCHETTI, R.; BOMPADRE, S.; REGOLI, F. Total content and chemical speciation of arsenic in the polychaeta *Sabella spallanzanii*. **Marine Environmental Research**, v.58, p.839-843, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med Brasil.** v.47, n.1, p.61-68, 1997.

FIGUEIREDO, B.R. **Minérios e Ambiente.** Editora da Unicamp, Campinas, São Paulo, 2000, 401p.

FIGUEIREDO, J.L.; MENEZES, A. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. **Museu de Zoologia da USP**, v. 4, p.105, 1985.

FILHO, D. W.; GIULIVI, C.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish - I Teleosts. **Camp. Biochem. Physiol.** v. 106C, n. 2, p. 409-413, 1993

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 93-104, 1984

FLOHR, L.; BRENTANO, B. M.; CARVALHO-PINTO, C. R. S.; MACHADO, V. M.; MATIAS, W. G. Classificação de resíduos sólidos industriais com base em testes ecotoxicológicos utilizando *Daphnia magna*: uma alternativa. **Biotemas**, Florianópolis, v.18, n. 2, p. 7 - 18, 2005.

GARRISON, T. **Fundamentos de Oceanografia**. Cengage Learning, 2010.

GHOSH, D.; BHATTACHARYA, S.; MAZUMDER, S. Perturbations in the catfish immune responses by arsenic: Organ and cell specific effects. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.143, p.455–463, 2006.

GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. Arsênio: uma revisão história. **An. Ver. Bras. Dermat.** v.80, n.1. p. 81-85. 2005.

GRAY, D. J.; WILDMAN, J.E.; LONGMAN, G.D. Selective and partial extraction analyses of transported overburden for gold exploration in the Yilgarn Craton, Western Australia. **J. Geochem. Explor.** v.67, p.51–66, 1999.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, Surface Area and Porosity**. Academic Press: London, 1982.

GRIM, J. M.; HYNDMAN, K. A.; KRISKA, T.; GIROTTI, A. W.; CROCKETT, E. I. relationship between oxidizable fatty acid content and level of antioxidant glutathione peroxidases in marine fish. **The Journal of Experimental Biology**. v.214, p. 3751-3759, 2011.

HALL, M.; GAMBLE, M.; SLAVOVICH, V.; LIU, X.; LEVY, D.; CHENG, Z.; VAN GEEN, A.; YUNUS, M.; RAHMAN, M.; PILSNER, J. R.; GRAZIANO, J. Determinants of Arsenic Metabolism: Blood Arsenic Metabolites, Plasma Folate, Cobalamin, and Homocysteine Concentrations in Maternal–Newborn Pairs. **Environ Health Perspect.** v.115, n.10, p. 1503–1509, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J.** v.219, n. 1, p.1-14, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 936 p, 2005.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 11, p. 714-719, 1977

HARRIS, D.C. **Química Analítica Quantitativa**, 5. ed., Rio de Janeiro, RJ, Ed. LTC, 2001.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.133, p.537–556, 2002.

HUANG, Y.H.; SHIH, C.M.; HUANG, C.J.; LIN, C.M.; CHOU, C.M.; TSAI, M.L.; LIU, T.P.; CHIU, J.F.; CHEN, C.T. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.98, p. 577-589, 2006.

HUGHES, M. F. Arsenic toxicity and potencial mechanisms of action. **Toxicology Letters**. v.133, p. 1-16, 2002.

HUGHES, M. F.; BECK, B. D.; CHEN, Y.; LEWIS, A. S.; THOMAS, D. J. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. **Toxicological Sciences**. v. 123, n. 2, p. 305-332, 2011.

IEMA. Instituto Estadual de Meio Ambiente. **Estudo Ambiental para a Dragagem e Derrocagem do Porto de Vitória**. Vitória, 2008. 183 p.

IEMA. Instituto Estadual de Meio Ambiente. **Estudo da qualidade do sedimento da Praia do Além, Anchieta-ES**. Relatório Técnico da Samarco Mineradora, 2008. 79 p.

IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.** v.320, p. 61–67, 1996.

JAISWAL, A. K. Antioxidant response element. **Biochem. Pharmacol.** v.48, p. 439–444, 1994.

JIANG, G. Z.; GONG, X. F.; LI, W. R.; CULLEN, X. C. Interaction of trivalent arsenicals with metallothionein. **Chem. Res. Toxicol.** v.16, p. 873, 2003.

JOYEUX, J. C.; FILHO, E. A. C.; JESUS, H. C. Trace Metal Contamination in Estuarine Fishes from Vitória Bay, ES, Brazil. **Braz. A. Bio and Tech.** v. 47, n. 5, p. 765-774, 2004.

KOBAYASHI, Y.; CUI, X.; HIRANO, S. Stability of As metabolites As-triglutathione [As (GS)₃] and methylAs diglutathione [CH₃As(GS)₂], in rat bile. **Toxicol.** v. 211, p. 115–123, 2005.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 257, p. 5751-5754, 1982.

LAVANYA, S.; RAMES, M.; KAVITHA, H. C.; MALARVIZHI, A. Hematological, biochemical and ionoregulatory responses of Indian major carp *Catla catla* during chronic sublethal exposure to inorganic arsenic. **Chemosphere.** v. 82, p. 977–985, 2011.

LEE, J.; GIORDANO, S.; ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. **Biochem. J.** v.441, p. 523–540, 2012.

LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. **Annu. Rev. Physiol.** v.68, p.253–278, 2006.

LEVIN, E. D.; BRADY, T. C.; HOCHREIN, E. C.; OURY, T. D.; JONSSON, L. M.; MARKLUND, S. L.; CRAPO, J. D. Molecular manipulations of extracellular superoxide dismutase: functional importance for learning. **Behav. Genet.** v.28, p. 381–390, 1998.

LIAO, V. H-C.; CHU, Y-J.; SU, Y-C.; LIN, P-C.; HWANG, Y-H.; LIU, C-W.; LIAO, C-M.; CHANG, F-J.; YU, C-W. Assessing the mechanisms controlling the mobilization of arsenic in the arsenic contaminated shallow alluvial aquifer in the blackfoot disease endemic area. **Journal of Hazardous Materials.** v.197, p. 397– 403, 2011.

LIONETTO, M.G.; CARICATTO, R.; GIORDANO, M.E.; PASCARIELLO, M.F.; MARINOSCI, L.; SCETTINO, T. Integrated use of biomarkers

(acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Pollution Bulletin**. v.46, p.324–330, 2003.

LIVINGSTONE D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.** v.42, p. 656-666, 2001.

LIMA, É. L.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Ver. Br. de Ciên. Farm.** v. 37, n. 3, 2001

LUNDE, G. Analysis of arsenic and selenic in marine raw materials. **Journal of Science and Food Agriculture**. London, v.21, n.5, p.242-247, 1970.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.** v.12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MARTINHO, F. M. D. **O estuário do Mondego como viveiro para a ictiofauna: ecologia dos juvenis de *Dicentrarchus labrax*, *Platichthys flesus* e *Solea solea***. (Dissertação de mestrado)(Ecologia) Universidade de Coimbra, Coimbra, 2005.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**. v. 153, p. 83–104, 2000.

MEDEIROS, R.J.; MARSICO, E.T.; SAO CLEMENTE, S.C.; FERREIRA, M.S. Distribuição do metal mercúrio em atum (*Thunnusal bacares*) e pescada bicuda (*Cynoscionmi crolepidotus*) capturados no litoral do Rio de Janeiro, Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zotec.** v.60, n.3, p. 656-662, 2008.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, p. 6049- 6055, 1969.

MILLER, W.H.; Jr, SCHIPPER, H.M.; LEE, J.S.; SINGER, J.; WAXMAN, S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. **Cancer Res.** v.62, p. 3893–3903, 2002.

MIRLEAN, N.; MEDEANIC, S.; GARCIA, F. A.; TRAVASSOS, M. P.; BAISCH, P. Arsenic enrichment in shelf and coastal sediment of the Brazilian subtropics. **Continental Shelf Research**, v.35, p. 129–136, 2012.

MITTAL, M.; FLORA, S. J. S. Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. **Chemico-Biological Interactions**. v.162, p. 128–139, 2006.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**. v.78, n. 3, p. 294–299, 2010.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.

MYLON, S. E.; BENOIT, G. Subnanomolar detection of acid-labile sulfides by the classical methylene blue method coupled to HPLC. **Environ. Sci. Technol.** v.35, p. 4544–4548, 2001.

NAIR, M.; JOSEPH, T.; BALACHANDRAN, K.K.; NAIR, K.K.C. Arsenic Enrichment in Estuarine Sediments – Impact of Iron and Manganese Mining. **Envirosolutions**. v.37, n.1317, p.57-67, 2003.

NELSON, D.L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M.M. 2007. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

NG, J. C.; WANG, J.; SHRAIN, A. A global health problem caused by arsenic from natural sources. **Chemosphere**. v.52, p. 1353-1359. 2003.

NICHOLLS, P.; FITA, I; LOEWEN, P.C. Enzymology and structure of catalases. **Adv. Inorg. Chem.** 51, 5t-106, 2001.

OH, J-J.; CHOI, E-M.; HAN, Y-S.; YOON, J-H.; PARK, A.; JIN, K.; LEE, J-W.; CHOI, H.; KIM, S.; BROWN, M. T.; HAN, T. Influence of Salinity on Metal Toxicity to *Ulva pertusa*. **Toxicol. Environ. Health**. v. 4, n.1, p. 9-13, 2012.

OAKES, K.D.; VAN DER KRAAK, G.J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* v.63, p. 447-463, 2003.

PAN, K.; WANG, W. X. Trace metal contamination in estuarine and costal environments in China. *Science of the Total Environment.* v.421, p. 3-16.

PAQUIN, P.R.; GORSUCH, J.W.; APTE, S.; BATLEY, G.E.; BOWLES, K.C.; CAMPBELL, P.G.C.; DELOS, C.G.; TORO, D.M.D.; DWYER, R.L.; GALVEZ, F.; GENSEMER, R.W.; GOSS, G.G.; HOGSTRAND, C.; JANSSEN, C.R.; MCGEER, J.C.; NADDY, R.B.; PLAYLE, R.C.; SANTORE, R.C.; SCHNEIDER, U.; STUBBLEFIELD, W.A.; WOOD, C.M.; WU, K.B. The Biotic Ligand Model: a historical overview. **Comparative Biochemistry and Physiology.** v.133, p. 3-35, 2002.

PATACA, L. C. M.; BORTOLETO, G. G.; BUENO, M. I. M. S. Determinação de arsênio em águas contaminadas usando fluorescência de raios-X por energia dispersiva. **Quim. Nova.**, v. 28, n. 4, p. 579-582, 2005.

PAZHANISAMY, K.; VASANTHY, M.; INDRA, N. Bioaccumulation of arsenic in the freshwater fish *Labeo rohita* (Ham.). **The Bioscan.** n.2, v. 1, p. 67-69, 2007.

PEDLAR, R. M.; PTASHYNSKI, K. G.; WAUTIER, K. G.; EVANS, R. E.; BARON, C. L.; KLAVERKAMP, J. F. The accumulation, distribution, and toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Comparative Biochemistry and Physiology.** v. 131, p.73-91, 2002.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha.** Rio de Janeiro: Interciências, 2012.

RIVAS, L.R. The Florida fishes of the genus *Centropomus*, commonly known as snook. **Quarterly Journal of the Florida Academy of Science**, v.25, n.1, p.53-64, 1962.

RÖRIG, L. R.; TUNDISI, J. G.; SCHETTINI, C. A. F.; PEREIRA-FILHO, J.; MENEZES, J. T.; ALMEIDA, T. C. M.; URBAN, S. R.; RADETSKI, C. M.; SPERB, R. C.; STRAMOSK. C. A.; MACEDO, R. S.; CASTRO-SILVA, M. A.; PEREZ, J. A. A. From a water resource to a point pollution source: the daily journey of a coastal urban stream. **Braz. J. Biol.**, São Carlos, v. 67, n. 4, p. 597-609, 2007.

ROOT, R. A.; VLASSOPOULOS, D.; RIVERA, N. A.; RAFFERTY, M. T.; ANDREWS, C.; O'DAY, P. A. Speciation and natural attenuation of arsenic and iron in a tidally influenced shallow aquifer. **Geochimica Cosmochimica et Acta** v.73, p. 5528–5553, 2009

ROY, S.; BHATTACHARYA, A. Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Channa punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.65, p.218–229, 2006.

ROY, S.; CHATTORAJ, A.; BHATTACHARYA, S. Arsenic-induced changes in optic tectal histoarchitecture acetylcholinesterase – acetylcholine profile in *Channa punctatus*: amelioration by selenium. **Comp Biochem Physiol**, n. 1, p.16–24, 2006.

SAKURAI T.; OCHIAI, M.; KOJIMA, C.; OHTA, T.; SAKURAI, M.H.; TAKADA, N.O.; QU, W.; WAALKES, M.P.; HIMENO, S.; FUJIWARA, K. Preventive mechanism of cellular glutathione in monomethylarsonic acid-induced cytolethality. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, p.54-65, 2005.

SANTOS, A. A.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; JULIANO, I. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): Seasonal variation, sex and gonadal maturation. **Aquaculture**. v.296, p. 359–366, 2009.

SCHLENK, D.; WOLFORD, L.; CHELIUS, M.; STEVENS, J.; CHAN, K.M. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. **Comp. Biochem. Physiol**. v.118, 177–183, 1997.

SEIXAS, T. G.; MOREIRA, I.; KEHRING. H. A.; MALM, O. Distribuição de selênio em organismos marinhos da Baía de Guanabara/RJ. **Quim.Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p.554-559, 2007.

SHEN, Z. X. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. **Blood** v. 89,p. 33-54, 1997.

SHIBAYAMA, A.; TAKASAKI, Y.; WILLIAM, T.; YAMATODANI, A.; HIGUCHI, Y.; SUNAGAWA, S.; ONO, EIKI. Treatment of smelting residue for arsenic removal and recovery of copper using pyro–hydrometallurgical process. **Journal of Hazardous Materials**. v.181, p. 1016–1023, 2010.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European journal of Biochemistry**, v. 215, p.213-219, 1993.

SILVA, W. F.; EGAMI, M. I.; SANTOS, A. A.; ANTONIAZZI, M. M.; SILVA, M.; GUTIERRE, R. C.; PAIVA, M. J. R. Cytochemical, immunocytochemical and ultrastructural observations on leukocytes and thrombocytes of fat snook (*Centropomus parallelus*). **Fish & Shellfish Immunology**. v.31, p. 571-577, 2011.

SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G. **Applied Geochemistry**, v.17, p.517-568, 2002.

SOUNDARARAJAN, M.; VEERAIYAN, G.; SAMIPILLAI, S. S. Arsenic-induced oxidative stress in fresh water catfish *Tilapia mossambica*. **Journal of Phytology**, v. 1, n. 4, 2009.

STEFANELLO, R. Especificação de compostos de arsênio em águas e fluidos biológicos empregando pré-tratamento fotoquímico e métodos voltamétricos. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1715-1733, 1996.

STURM, A.; DA SILVA A.; H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, v.47, p.389-398, 1999.

TANG, D. G.; SANTOSCHI, P. H. Sensitive determination of dissolved sulfide in estuarine water by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography of methylene blue. **J. Chromatogr. A.** v. 883, p. 305–309, 2000.

THOMAS, D. J.; STYBLO, M.; LIN, S. The Cellular metabolism and systemictotoxicity of arsenic. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v.176, p.127-144, 2001.

THOMAS, D. J.; WATERS, S. B.; STYBLO, M. Elucidating the pathway for arsenic methylation. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v.198, p.319-326, 2004.

THOMAS, P.; WOFFORD, H. W. Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine and acid soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus*). **Toxicol Appl Pharmacol.** v.76, p.172–182, 1984.

TSUZUK, M. Y.; SUGAI, J. K.; MACIEL, J. C.; FRANCISCO, C. J.; CERQUEIRA, V. R. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. **Aquaculture.** v. 271, n., p. 319-325, 2007.

VALAVANIDIS A., VLAHOGIANNI T., DASSENAKIS M., SCOULLOS M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotox. Environ. Safety.** v.64, p. 178-189, 2006.

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

VENTURA-LIMA, J.; CASTRO, M. R.; ACOSTA, D.; FATTORINI, D.; REGOLI, R.; CARVALHO, L. M. C.; BOHRER, D.; GERACITANO, L. A.; BARROS, D. M.; MARINS, L. F. F.; SILVA, R. S.; BONAN, C. D.; BOGO, M. R.; MONSERRAT, J. M. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology.** v.149, p. 538–543, 2009.

VIEIRA, L.R.; GRAVATO, C.; SOARES, A.M.V.M.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior. **Chemosphere**, v.76, p.1416-1427, 2009.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e a química analítica. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n.1, São Paulo, 2004.

VUTUKURU, S.S.; CHINTADA, K.R.M.; RAO, J.V.; ANJANEYULU, Y. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 32, p. 221-229, 2006.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. 2ed, London: Taylor & Francis, 1996.

WANIBUCHI, H.; SALIM, E.; KINOSHITA, A.; SHEN, J.; WEI, M. MORIMURA K.; YOSHIDA, K.; KURODA, K.; ENDO, G.; FUKUSHIMA, S. Understanding arsenic carcinogenicity by the use of animal models. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** V.198, p. 366–376, 2004.

WHITE, C.C.; VIERNES, H.; KREJSA, C.M.; BOTTA, D.; KAVANAGH, T.J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. **Anal. Biochem.** v.318, p.175–180, 2003.

WOO, S.; YUM, S.; PARK, H.S.; LEE, T.K.; RYU, J.C. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.149, p. 289-299, 2009.

WRIGHT, P. A. Ionic, osmotic, and nitrogenous waste regulation. **Fish Physiology**. v. 26, p. 283–318, 2007.

ZHANG, W.; HUANG, L.; WANG, W-X. Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in a marine juvenile fish *Terapon jarbua* after waterborne and dietborne exposure. **Journal of Hazardous Materials**. v.221–222, p. 162– 169, 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.21, n. 6, 1998.

ZARR, J. H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Prentice-Hall Press, p. 663, 1999.