

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Biomarcadores de estresse oxidativo em tilápia do nilo,
Oreochromis niloticus (Teleostei; Cichlidae), expostas ao
sulfato de cobre aquático**

Antonio Carlos Tomasi Lucarelli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

São Carlos – SP

2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L932be

Lucarelli, Antonio Carlos Tomasi.

Biomarcadores de estresse oxidativo em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Teleostei; Cichlidae), expostas ao sulfato de cobre aquático / Antonio Carlos Tomasi Lucarelli. - São Carlos : UFSCar, 2006.
62 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Fisiologia comparada. 2. Estresse oxidativo. 3. Sulfato de cobre. 4. *Oreochromis niloticus*. I. Título.

CDD: 591.1 (20^a)

Orientador

Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin

Ao meu grande Amor, minha esposa Maria Diva e aos meus três tesouros, Gustavo, Natália e Guilherme que sempre me apoiaram, me incentivaram e lutaram comigo em todos os momentos de minha vida.

Aos meus Pais que sempre me amaram e não mediram esforços para que eu me tornasse o que sou.

AGRADECIMENTOS

À Deus, simplesmente por minha existência.

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, pela orientação, pelo exemplo profissional, crédito e atenção.

A Prof^a. Dra. Jeane Alves de Almeida, que apesar da distância, nunca mediu esforços para me acompanhar na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPG-CF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela oportunidade.

A todos os professores e Departamento de Ciências Fisiológicas pela atenção e auxílio.

Aos amigos do laboratório, por terem contribuído de uma forma ou de outra na realização deste trabalho.

RESUMO

Foram avaliados os efeitos do sulfato de cobre (CuSO_4) aquático sobre biomarcadores de estresse oxidativo no plasma, fígado, brânquias e coração de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas por 96 h a diferentes concentrações aquáticas crescentes deste sal. O uso indiscriminado de CuSO_4 como agente profilático em sistemas de aquicultura resulta em acúmulo do excesso do íon cobre (Cu^{2+}) e subsequente toxicidade para as espécies cultivadas. A peroxidação lipídica no plasma dos animais experimentais, determinada pela produção de reagentes do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e do hidroperóxido de lipídeo (HP), não mudou com a exposição ao cobre. Entretanto a defesa conferida pela glutathiona peroxidase (GSH-Px) aumentou nos grupos submetidos a 0,7; 1,5 e 3,0 mg.L^{-1} de CuSO_4 . No tecido hepático, não houve diferença significativa na produção de HP entre grupos submetidos ao CuSO_4 e animais controle. A defesa antioxidante conferida pela GSH-Px aumentou significativamente na concentração 0,35 mg.L^{-1} , mas apresentou uma diminuição significativa nas concentrações 0,70 e 4,00 mg.L^{-1} . A atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) manteve-se nos níveis controles, independentemente da concentração teste. Entretanto, nas brânquias ocorreu um aumento significativo dos níveis de HP, na atividade da SOD nas concentrações 0,7 e 1,5 mg.L^{-1} . A atividade GSH-Px não foi alterada e a CAT diminuiu nos grupos com a exposição 0,7 e 1,5 mg.L^{-1} . Esses dados permitem concluir que radicais livres de oxigênio são produzidos como mediadores da toxicidade do cobre. O desenvolvimento da resistência a altas concentrações do CuSO_4 está relacionado principalmente ao aumento dos níveis de GSH-Px plasmático e subsequente manutenção dos níveis dessa enzima nos tecidos estudados, conferindo importante defesa antioxidante e consequente proteção contra danos oxidativos induzidos pelo CuSO_4 , inibindo a lipoperoxidação principalmente no fígado dos animais experimentais.

ABSTRACT

In this study the effects of the aquatic copper (CuSO_4) on biological markers of oxidative stress were assessed in the plasma, liver, gills and heart of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed for 96 hours to crescent concentrations of this salt. The indiscriminate use of CuSO_4 as a prophylactic agent in aquaculture systems results in an accumulation of ion copper (Cu^{2+}) causing toxicity for the cultivated species. The lipid peroxidation in the plasma of experimental fish, determined by the production of the reactants of thiobarbituric acid (TBARS) and lipid hydroperoxide (HP) did not change with copper exposition. However, the defense promoted by the glutathione peroxidase (GSH-Px) increased in the groups submitted to 0.7, 1.5 and 3.0 mg.L^{-1} of CuSO_4 . In the hepatic tissue, there were no significant differences in the production of HP among groups submitted to CuSO_4 and control animals. The antioxidant defense induced by GSH-Px increased significantly in the concentration of 0.35 mg.L^{-1} . However, it decreased significantly in the concentrations of 0.70 and 4.00 mg.L^{-1} . The activity of the superoxide dismutase (SOD) and the catalase (CAT) continued in the control levels, independently of the test concentration. Nevertheless, in the gills occurred a significant increase in the HP levels in the SOD activity at concentrations of 0.7 and 1.5 mg.L^{-1} . The activity of GSH-Px did not change and the CAT decreased in the groups exposed to 0.7 and 1.5 mg.L^{-1} . These data allow to conclude that oxygen-free radicals are produced as mediators of the copper toxicity. The development of the resistance to high concentrations of CuSO_4 is mainly related to the increase in the levels of plasmatic GSH-Px and posterior maintenance of the levels of this enzyme on the studied tissues, thus granting important oxidant defense and consequent protection against oxidative damages induced by the CuSO_4 , obstructing the lipid peroxidation, mainly in the liver of experimental animals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de Tilápia do nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	27
Figura 2. Análise de regressão não linear e determinação da CL ₅₀ -96 h de sulfato de cobre para tilápia do nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Parâmetros físicos e químicos da água nos tanques usados nos testes de resistência para determinação da CL₅₀-96 h de sulfato de cobre na espécie estudada.....30
- Tabela 2. Médias ± desvios padrão do peso (g) inicial e massa corpórea final de *Oreochromis niloticus* submetida à exposição ao CuSO₄ aquático por 96h.....38
- Tabela 3. Médias ± desvios padrão do comprimento total (CT), comprimento padrão (CP) e índice hepático somático (HSI) de *Oreochromis niloticus* após 96 h de exposição ao CuSO₄ aquático.....39
- Tabela 4. Médias ± desvios padrão de hidroperóxido de lipídeos (TBARS e FOX) e da glutaciona peroxidase (GSH-Px) do plasma de *Oreochromis niloticus* submetidas ao CuSO₄ (mg.L⁻¹) por 96 h.....40
- Tabela 5. Médias ± desvios padrão de hidroperóxido de lipídio, da superóxido dismutase, da glutaciona peroxidase e da catalase no fígado de *Oreochromis niloticus* submetida ao CuSO₄ por 96 h.....41
- Tabela 6. Médias ± desvios padrão de hidroperóxido de lipídeos, da superóxido desmutase, da glutaciona peroxidase e da catalase nas brânquias de *Oreochromis niloticus* submetida ao CuSO₄ (mg.L⁻¹) por 96 h.....42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CuZn SOD = Superóxido Dismutase dependente de cobre e zinco

DNA = Ácido Desoxiribonucléico

ERO = Espécies reativas de oxigênio

GSH-Px = Glutaciona Peroxidase

GSH = Glutaciona Reduzida

GSSG = Glutaciona Oxidada

H₂O₂ = Peróxido de Hidrogênio

HO• = Hidroxila

Mn SOD = Superóxido Dismutase dependente de manganês

NADP = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

NADPH = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato, forma oxidada

O₂ = Dioxigênio; Oxigênio Molecular

O₂•- = Superóxido

1 O₂ = Oxigênio Singlet

RO• = Radical Alcoxil

ROO• = Radical Peroxil

ROOH = Hidroperóxido Orgânico

SOD = Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. POLUIÇÃO AMBIENTAL.....	01
1.2. Sulfato de cobre (CuSO ₄).....	04
1.3. Oxidação.....	09
1.4. Formação de Eros.....	14
1.5. Antioxidantes.....	17
1.5.1. Antioxidantes não-enzimáticos.....	17
1.5.2. Antioxidantes enzimáticos.....	20
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Material biológico.....	27
3.2. Descrição morfofisiológica.....	28
3.3. Uso econômico.....	28
3.4. Área de distribuição onde a espécie é nativa.....	29
3.5. Ambiente natural.....	29
3.6. Ambientes preferenciais para invasão.....	29
3.7. Coleta e manutenção em laboratório.....	30
3.8. Toxicidade do cobre.....	31
3.9. Amostragens.....	31
3.10. Análises bioquímicas.....	33
3.10.1. Determinação de proteínas totais.....	33

3.10.2. Determinação do TBARS.....	33
3.10.3. Determinações da concentração do hidroperóxido de lipídio(HP).....	33
3.10.4. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD. E.C.1.15.1.1.).....	34
3.10.5. Determinação da catalase (CAT - E.C. 1.11.1.6.).....	34
3.10.6. Determinação da glutathiona peroxidase (GSH-Px – E.C.1.11.1.9.).....	35
3.11. Análises estatísticas.....	36
4. RESULTADOS.....	37
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Poluição Ambiental

A poluição do ambiente por metais tóxicos é uma realidade preocupante, decorrente de muitas atividades industriais (Hemphill, 1992).

Entre os poluentes mais prejudiciais ao ecossistema estão os metais pesados, que podem ser definidos como elementos químicos que apresentam número atômico superior a 22 (Nriagu, 1973). Também podem ser definidos por sua singular propriedade de serem precipitados por sulfetos (Lamy et al., 1993). Entretanto, a definição mais difundida é aquela relacionada com a saúde pública: "metais pesados são aqueles que apresentam efeitos adversos à saúde humana" (Viel, 1994). Estes elementos existem naturalmente no ambiente e são necessários em concentrações mínimas na manutenção da saúde dos seres vivos (são denominados oligoelementos, ou micronutrientes). Alguns metais essenciais aos organismos são o ferro, cobre, zinco, cobalto, manganês, cromo, molibdênio, vanádio, selênio, níquel e estanho, os quais participam do metabolismo e formação de muitas proteínas, enzimas, vitaminas, pigmentos respiratórios (como o ferro da hemoglobina humana ou o vanádio do sangue das ascídias) (Willians,1981). No entanto, quando ocorre o aumento destas concentrações, normalmente acima de dez vezes, efeitos deletérios começam a surgir.

Apesar da toxicidade de cada metal variar de acordo com a espécie, existe uma classificação da toxicidade relativa dos metais mais comuns no meio ambiente, em ordem decrescente de periculosidade: Hg, Ag, Cu, Zn, Ni, Pb, Cd, As, Cr, Sn, Fe, Mn, Al, Be, Li (Willians, 1981).

Um dos efeitos mais sérios da contaminação ambiental por metais pesados é a bioacumulação dos poluentes pelos organismos vivos (Lamy et al., 1993). Animais e plantas podem concentrar os compostos em níveis milhares de vezes maiores que os presentes no ambiente.

O acúmulo de metais e outros poluentes industriais pelos organismos, pode ter efeito bastante abrangente, já que possibilita o transporte dos contaminantes via teia alimentar para diversos níveis tróficos da cadeia alimentar de tal forma que os predadores apresentam as maiores concentrações, ou seja, este efeito culmina com a ocorrência das maiores taxas de contaminação nos níveis mais altos da cadeia trófica (consumidores secundários e terciários) (Brown, 1975).

Nas águas, os metais pesados constituem contaminantes químicos, pois em pequenas concentrações trazem efeitos adversos à saúde (Boyd, 1990). Desta forma, podem inviabilizar os sistemas públicos de água, uma vez que as estações de tratamento convencionais não os removem eficientemente e os tratamentos especiais necessários são muito caros.

Esses metais pesados constituem-se em padrões de potabilidade estabelecidos pela Portaria 1.469 do Ministério da Saúde.

Com o avanço da tecnologia, o consumo de metais tem influenciado o aumento de rejeitos industriais altamente contaminados, que são lançados, na maioria das vezes, *in natura* no ambiente, afetando não só as águas superficiais e subterrâneas, como também solo e plantas (Azevedo, 1970). Desta forma, os metais, em particular os metais pesados, têm sido alvo de muita atenção devido à sua alta persistência no meio ambiente e toxicidade para uma grande variedade de organismos, incluindo o homem.

No Brasil, a agroindústria é uma atividade que apresenta um rápido desenvolvimento e é responsável por importante parcela da balança comercial do país. Para garantir a eficiência dessa atividade, os empresários e produtores rurais muitas vezes utilizam-se de produtos químicos com o intuito de garantir e maximizar suas produções (Azevedo, 1970). A administração desses produtos pode trazer conseqüências gravíssimas ao meio ambiente, já que sob forma de contaminantes mostram-se biodisponíveis a serem acumulados nos organismos. Nem sempre essa administração é efetuada de maneira controlada, sendo que seu uso indiscriminado prejudica consideravelmente as condições ambientais e os seres vivos participantes do ecossistema (Brown, 1975). O grande volume de defensivos agrícolas e de metais pesados lançados em ambiente aquático nos últimos anos, contribuiu para um significativo aumento da poluição neste ambiente.

Um desses metais é o cobre, proveniente de várias fontes: corrosão de tubulações de latão por águas ácidas, efluentes de estações de tratamento de

esgotos, uso de compostos de cobre como algicidas aquáticos, escoamento superficial e contaminação da água subterrânea a partir de usos agrícolas do cobre como fungicidas, pesticidas e precipitação atmosférica de fontes industriais (Brown, 1975). As principais fontes industriais incluem indústrias de mineração, fundição e refinação.

1.2. Sulfato de Cobre (CuSO₄)

Na forma de sulfato de cobre (CuSO₄), o cobre é frequentemente utilizado em aquicultura para reduzir a quantidade de fitoplâncton e controlar a floração de algas responsáveis por alterações no sabor da carne (Chen & Lin, 2001), pois quando aplicado em dosagens até 0,5 mg.L⁻¹ é um poderoso algicida. É também utilizado com finalidade terapêutica, diminuindo a incidência de endoparasitas em espécies cultivadas (Shelenk et al., 1999).

A aplicação do cobre varia de 0,025 a 2 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O, resultando em acúmulo do excesso do íon cobre e subsequente toxicidade, o que reduz o crescimento, a reprodução e a alimentação dos organismos expostos (Boyd, 1990). Além disso, pode ser letal aos peixes por desencadear um processo de coagulação do muco branquial e, conseqüentemente a asfixia. Os efeitos tóxicos do CuSO₄ podem resultar da ação do Cu²⁺ como agente pró-oxidante, embora existam dados indicando os efeitos benéficos, como o aumento das defesas antioxidantes em animais experimentais (Linder, 2001). Dados associando concentrações de sulfato

de cobre e efeitos pró-oxidantes e antioxidantes em animais de importância econômica permitirão estabelecer mecanismos de toxicidade do Cu^{2+} , levando ao uso racional de metais em aquicultura, sem afetar o bem estar animal.

Em sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes oxidantes e o sistema de defesa antioxidante. Todos os organismos têm desenvolvido defesas antioxidantes, com componentes enzimáticos ou não enzimáticos. As defesas enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD, Cu-Zn SOD e a Mn SOD) e a catalase, que detoxificam radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente, bem como a glutathione peroxidase (GPX) e o sistema glutathione-S-transferase (GST) que catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GR) a xenobióticos nucleofílicos ou a componentes celulares danificados pela ação de oxiradicais.

Desde que foi descoberta a importância de reações de radicais livres nos processos biológicos e para os mecanismos de toxicidade de xenobióticos, várias pesquisas sobre processos pró-oxidantes e antioxidantes tem sido realizadas, principalmente em mamíferos (Halliwell & Gutteridge, 1989).

No presente trabalho foram estudados os efeitos do Cu^{2+} em tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), expostas a concentrações sub-letais, sobre os biomarcadores de estresse oxidativo observando-se que recentemente, pesquisas buscam evidências que associem a produção de espécies reativas de oxigênio à contaminação ambiental. O dano oxidativo pode ser o principal mecanismo da toxicidade de poluentes (Livingstone, 2001; Almeida et al., 2002).

As concentrações teste ficam próximas às utilizadas com fins profiláticos em sistemas de aquicultura. Isso nos permitiu associar possíveis efeitos deletérios do CuSO_4 nos diferentes tecidos das tilápias do nilo bem como o comprometimento do bem estar deste animal.

No Reservatório do Guarapiranga, utilizado para abastecimento público de significativa parcela da cidade de São Paulo, a rotina de aplicação do sulfato de cobre pode gerar problemas para o meio ambiente, caso ocorra o acúmulo do íon cobre ao longo da cadeia trófica e no sedimento (Zagato et al, 1998). A Organização Mundial da Saúde, nos seus Guias para Qualidade da Água Potável, mostra que a aplicação de sulfato de cobre para controlar a proliferação das algas promove a liberação, no meio, de toxinas (neurotoxinas ou hepatoxinas) e que os tratamentos convencionais (carvão ativado) são de êxito duvidoso ou mesmo insuficientes para removê-las. Portanto, no Reservatório do Guarapiranga, a rotina de aplicação do sulfato de cobre, conseqüentemente, potencializa a liberação de toxinas no manancial. Ressaltando ainda que o Water Quality Criteria indica a concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobre como máxima permissível para águas reservadas para o abastecimento público.

O cobre pode trazer benefícios ao organismo humano, quando aplicado em pequenas quantidades, catalisando a assimilação do ferro e seu aproveitamento na síntese da hemoglobina do sangue, facilitando a cura de anemias. Porém, o aumento de cobre no ambiente representa um grande problema, pois é um metal

extremamente tóxico, constituindo um grande potencial de danos aos organismos vivos e quando em concentrações elevadas, é prejudicial à saúde e confere sabor desagradável às águas. Segundo pesquisas efetuadas, é necessária uma concentração de 20 mg.L^{-1} de cobre ou um teor total de 100 mg.L^{-1} por dia na água para produzirem intoxicações humanas com lesões no fígado. No entanto, concentrações de 5 mg.L^{-1} tornam a água absolutamente impalatável, devido ao gosto produzido. Para os peixes, muito mais que para o homem, as doses elevadas de cobre são extremamente nocivas, pois é facilmente bioconcentrado nas brânquias, fígado, rins, nos tecidos adiposos e na musculatura dos organismos aquáticos, comprometendo-os para o consumo humano.

A contaminação aquática é citada como um dos principais responsáveis pelo estresse oxidativo, devido ao aumento da produção de espécies reativas de O_2 (ERO) nos organismos expostos (Ahmad et al., 2000; Silva et al., 1999).

Deficiências de cobre podem reduzir a atividade de enzimas do sistema antioxidante como: superóxido dismutase (CuZn SOD) e ceruloplasmina. A carência de cobre também resulta na redução da atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) e da catalase (CAT) (McDermott et al., 1994). O excesso de cobre em células é incomum, pois elas podem estocar quantidades significantes de íon metálico sem danificar-se. Entretanto, quando a habilidade de estocar o cobre é excedida, a concentração liberada (não estocada) pode gerar ERO. Assim, o cobre, pode contribuir para a formação de radicais livres (pró-oxidante), ou

ainda para a resistência contra a formação do estresse oxidativo (antioxidante) (Linder, 2001).

O cobre e o ferro desempenham papel vital na respiração celular. Assim, o cobre é um elemento essencial e requerido diariamente na dieta de peixes (1 - 4 mg Cu kg⁻¹ de peso seco). Excesso deste metal na dieta desencadeia a primeira ação tóxica que é a formação de radicais livres no tecido onde o cobre se acumulou. Altas concentrações de cobre também afetam a função branquial através da perturbação da homeostase do sódio (Laurén & McDonald, 1985).

O fígado é o principal órgão envolvido na homeostase do cobre (Grosell et al., 2000; Kamunde et al., 2002) e acumula uma grande proporção de cobre absorvido dos alimentos ou água, e é o local de síntese da proteína ceruloplasmina. A ceruloplasmina é secretada no sangue e age como fonte de cobre para órgãos extra-hepáticos. O principal local de excreção do excesso de cobre em peixes teleósteos é a bile (Grosell & Jensen, 2000). As brânquias de peixes também estão implicadas na excreção de cobre (Handy, 1996), mas esse processo ainda não está bem definido.

Também é sabido que em águas altamente alcalinas ou excessivamente duras (acima de 100 – 150 mg CaCO₃.L⁻¹), o sulfato de cobre se combina com o carbonato de cálcio e forma compostos insolúveis, que precipitam como carbonato básico e hidrato de cobre. Esses novos componentes são ineficientes como algicida, porém podem ser tóxicos e letais aos peixes quando a concentração de cobre exceder a 0,25 mg Cu.L⁻¹.

1.3. Oxidação

O elemento oxigênio encontra-se em 53,8% da crosta terrestre e o oxigênio gasoso (O₂) constitui cerca de 21% da composição do ar atmosférico. Este gás também é fundamental para a existência dos seres aeróbicos (Halliwell & Gutteridge, 1989) sendo indispensável para a produção eficiente de energia tanto nos animais como nas plantas. Existe, porém um paradoxo, pois o oxigênio, assim como é indispensável para a vida, pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis quando seres vivos são expostos a ele em concentrações superiores às encontradas na atmosfera, podendo inclusive levar a morte celular. Por isso, com a evolução dos seres vivos no planeta, surgiram mecanismos para combater estes efeitos deletérios. São os mecanismos antioxidantes, compostos de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Esses efeitos deletérios sobre os seres vivos podem variar consideravelmente conforme o tipo de organismo, seu estado fisiológico, suas defesas antioxidantes e sua dieta, assim como diferentes tecidos de um mesmo ser vivo reagem e são afetados diferentemente por estes efeitos (Crouch, 1981).

Desde o final do século XIX já se estudavam os efeitos tóxicos relacionados ao oxigênio, porém a identificação dos radicais livres causadores desta toxidade somente foi possível há cerca de 50 anos, quando Denham Harman lançou sua

teoria sobre o envolvimento destes radicais livres em processos de mutagênese, câncer e envelhecimento (Bray, 2000).

Estas pesquisas foram aprimoradas com a descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD), em 1969. A partir de então, diversas foram as pesquisas visando elucidar os efeitos dos radicais livres nas células biológicas (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) compreende duas formas: citoplasmática (SOD1) - Cu/Zn e a mitocondrial (SOD2) - Mn. A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, que pode ser posteriormente degradado pela catalase ou peroxidases (Halliwell & Gutteridge, 1989)..

Segundo Halliwell & Gutteridge (1989), radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados sendo, assim, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula, e de meia vida curta (Belló, 2002). Esses elétrons livres, ou não pareados, têm grande instabilidade química, o que os torna extremamente reativos (Halliwell & Gutteridge, 1999). Por serem altamente reativos, os radicais livres estão implicados na etiologia de grande número de alterações degenerativas, lesões teciduais e toxicidade decorrentes da exposição a xenobióticos (Bray, 2000).

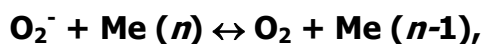
As espécies reativas do oxigênio (ERO), genericamente chamados de radicais livres ou radicais livres de oxigênio, estão envolvidas numa série de processos degenerativos.

A formação destes compostos é determinada pela perda ou ganho de um elétron, ficando com um elétron desemparelhado. A formação de ERO, comumente referidos como pró-oxidantes, ocorrem durante os processos oxidativos biológicos, sendo assim formados fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos (Sies, 1991; Storey, 1996). Da mesma forma, podem ser oriundos do metabolismo de alguns compostos exógenos ao organismo, gerando assim diferentes radicais livres. Dentre estes processos podemos destacar a fosforilação oxidativa, reação responsável pela geração de energia ao organismo através do ATP na mitocôndria (Sies, 1991; Storey, 1996).

Segundo Turrens (1982) e Konstantinov (1987), a taxa de geração de ERO está intimamente correlacionada ao consumo de oxigênio e proporcionalmente relacionada à quantidade de mitocôndrias nos tecidos.

Aproximadamente, 98% de todo o O_2 consumido nas células entra nas mitocôndrias, onde é reduzido pela citocromo oxidase. Entretanto, o O_2 pode receber menos de quatro elétrons e formar espécies reativas de O_2 , ou radicais livres. A formação de radicais livres é responsável pelo consumo de aproximadamente 2% do oxigênio usado na respiração (Floyd, 1984).

Embora a maior parte do O₂ consumido pelos organismos aeróbios possa sofrer redução completa pela citocromo oxidase, várias reações enzimáticas e não enzimáticas resultam na redução parcial do O₂, gerando espécies radicais como o superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH) (Boveris, 1977; Chance, 1979; Boveris & Cadenas 1982). O superóxido e o peróxido de hidrogênio são menos reativos, mas a transformação destes radicais (via reações espontâneas ou catalisadas) em radicais hidroxila torna-os altamente danosos para os sistemas biológicos (Halliwell, 1996). A via de produção de radical hidroxila é iniciada pela redução de O₂ em diferentes processos celulares. O superóxido (O₂⁻) é convertido em H₂O₂ e radicais OH são gerados pela redução do H₂O₂ por um metal, como ferro ou cobre (Fridovich, 1998). A reação catalisada por metais pode ser expressa da seguinte forma:



Me = metal, n = número de valências.

Em condições fisiológicas normais os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio são efetivamente neutralizados por sistemas de defesas antioxidantes do organismo. Assim, há um equilíbrio entre a taxa de produção e a taxa de eliminação de espécies reativas. Na diminuição desses sistemas, ou no excesso da produção de radicais livres, ou na conjugação das duas situações, o meio celular

fica sujeito ao estresse oxidativo que conduzirá ao dano de macromoléculas celulares (Biesalski, 2000).

A intensidade dos danos oxidativos promovidos pelas espécies reativas do oxigênio (ERO), depende tanto da natureza como da quantidade das mesmas a que as células estão expostas, bem como de suas proteções antioxidantes (Marcon 1997).

É considerável também que a geração das ERO ocorre mesmo em condições normais e, nesse sentido, a participação das proteções antioxidantes é fundamental. Qualquer distúrbio na relação entre as concentrações basais de Eros e os níveis das proteções antioxidantes pode resultar em situação de estresse oxidativo.

Sob condições fisiológicas normais os efeitos nocivos dos ERO são efetivamente neutralizados pelo sistema antioxidante de defesa dos organismos, que geralmente consiste de enzimas e pequenas moléculas antioxidantes (Dandapat, 2000).

Uma alteração do equilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes em favor do primeiro, resulta em estresse oxidativo. O aumento da peroxidação lipídica (LPX), uma consequência da deterioração oxidativa dos lipídios de membrana, é geralmente utilizado como referencia ao índice de estresse oxidativo (Kappus & Sies, 1981).

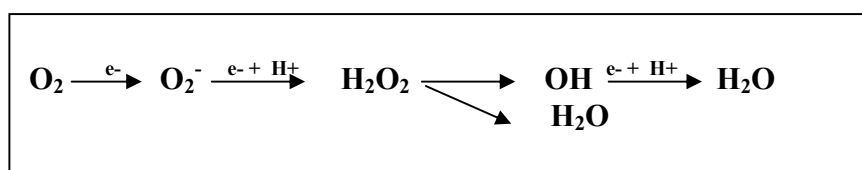
A peroxidação lipídica é definida como a deteriorização oxidativa dos lipídios poliinsaturados. Ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que contêm ligações

duplas entre carbonos. Tanto as membranas celulares como as organelas (mitocôndrias, peroxissomos) contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados que poderiam ser peróxidos (Lehninger, 1995; Champe & Harvey, 1997).

O estresse oxidativo é definido como um acúmulo de espécies reativas de oxigênio que causam danos à estrutura das biomoléculas DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares. Estudos comprovam que o estresse oxidativo está relacionado com o envelhecimento, apoptose, câncer, diabetes mellitus e arteriosclerose. As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas de forma endógena durante o metabolismo celular, ou de forma exógena, como por exposição à drogas. Para se defender destas espécies reativas de oxigênio, as células aeróbicas desenvolveram vários mecanismos de defesa.

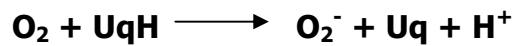
1.4. Formação de ERO

Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-).



O esquema acima representa que o ânion radical superóxido é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, sendo formado a partir dele os demais ERO. Algumas outras reações de formação de ERO nas mitocôndrias podem ser acompanhadas nas equações a seguir:

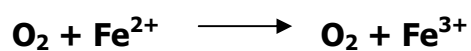
- Oxidação da semiquinona a partir da ubiquinona:



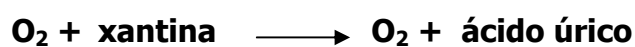
- Oxidação da semiquinona a partir da flavina da NADH desidrogenase:



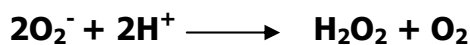
- Reações de formação de ERO no retículo endoplasmático a partir da citocromo P₄₅₀ e a partir da flavoproteína NADPH-citocromo P₄₅₀ redutase:



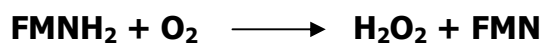
- Reações de formação de ERO no citosol pela enzima xantina oxidase:



- Reações de peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, nos peroxissomos e no citosol, sendo que nas mitocôndrias esta reação é catalisada pela superóxido dismutase (SOD).



- No retículo endoplasmático o H_2O_2 é gerado quimicamente pela auto-oxidação do citocromo P_{450} (FMNH₃) da citocromo e NADPH redutase:



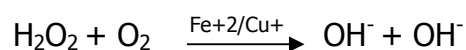
Os ERO podem ainda ser formados pelas reações enzimáticas da ciclooxigenase, lipooxigenase, aldeído oxidase, além da auto-oxidação das catecolaminas, flavinas e ferridoxinas e pelas reações catalisadas por metais de transição como o ferro e cobre, entre outras.

A partir destas O_2 e H_2O_2 podem surgir outras ERO, como o radical OH.

O radical hidroxila é um dos mais potentes oxidantes, tendo a capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas tais como lipídios insaturados e DNA.

Ele pode ser formado de outras formas, conforme pode ser visto abaixo:





1.5. Antioxidantes

Sendo que as ERO e outras formas de radicais livres se originam constantemente durante os processos metabólicos, a célula desenvolve um sistema de defesa para limitar a exposição a estes agentes que recebem o nome genérico de antioxidantes (AO) (Yu,1994), e podem ser definidas como moléculas que previnem a formação descontrolada de RL inibindo suas reações com estruturas biológicas (Chaudière & Ferrari-Iliou, 1999).

Os antioxidantes que representam a defesa dos organismos contra as espécies reativas de oxigênio são divididos em dois tipos principais, os não enzimáticos e os enzimáticos.

1.5.1. Antioxidantes não-enzimáticos

Alguns nutrientes essenciais podem atacar diretamente os radicais de oxigênio. A vitamina E (alfa-tocoferol) é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, atua na proteção contra a lipoperoxidação (Kay et al., 1986). Ela pode reagir diretamente com uma variedade de oxiradicais, como o superóxido, a hidroxila, etc., e também com o oxigênio singlet (Machlin & Bendich, 1987). A vitamina E, lipossolúvel, foi primeiramente relatada em 1922, nos Estados Unidos; demonstra ser fator essencial para

reprodução normal em ratos. A purificação deste fator revelou que ele é composto da família dos tocoferóis. Quatro tocoferóis são conhecidos, porém o alfa-tocoferol é o mais importante biologicamente e os termos alfa-tocoferol e vitamina E são quase intercambiáveis na literatura (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Primeiramente, o alfa-tocoferol inativo reage com o oxigênio singlet e poderia, portanto, proteger a membrana contra essa espécie. Durante a sua ação antioxidante (destruindo a cadeia de lipoperoxidação) nas membranas, o alfa-tocoferol é consumido e convertido em forma de radical. A vitamina E pode também proteger contra a peroxidação modificando a estrutura da membrana (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A vitamina E, localizada perto do citocromo P-450 no fosfolípido da membrana, varre os radicais livres formados no citocromo P-450. A seguir, a vitamina C reduz o radical tocoferil.

Os carotenóides, principalmente o beta-caroteno, podem funcionar como precursores da vitamina A. São absorvidos pelos intestinos, e devem também atuar como antioxidantes. Têm, portanto, duplo papel: diminuem a formação do oxigênio singlet *in vivo*, e ajudam a remover aqueles já formados (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A vitamina A tem pouca ação antioxidante e é incapaz de agir sobre o oxigênio singlet, mas seu precursor, o beta-caroteno, é o mais eficiente ligante desta forma reativa de oxigênio encontrada na natureza e pode agir como antioxidante. O beta-caroteno, um pigmento presente em todas as plantas, pode

ser encontrado em membranas celulares, inclusive nos lipossomos (Machlin & Bendich, 1987).

A vitamina C (ácido ascórbico), é hidrossolúvel e também age contra os radicais livres e o oxigênio singlet. O ácido ascórbico participa ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E (Halliwell & Gutteridge, 1989). O ácido ascórbico puro é sólido, branco, cristalino e muito solúvel em água. Plantas e animais podem sintetizá-lo, com exceção de humanos, primatas e cobaias, que não conseguem e necessitam obtê-lo na dieta (Halliwell & Gutteridge, 1989). O ácido ascórbico é necessário *in vivo*, como cofator de várias enzimas, sendo as mais conhecidas a prolina-hidroxilase e a lisina-hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno. A deficiência do ascorbato na dieta humana causa o escorbuto. A mais impressionante propriedade química do ascorbato é a sua habilidade para agir como agente redutor (doador de elétrons).

Existe, ainda, uma série de outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra as espécies reativas do oxigênio nos sistemas biológicos como, por exemplo, a ubiquinona, a ceruloplasmina, o ácido úrico, a taurina, os flavonóides e outros compostos fenólicos de origem vegetal (Sies, 1991).

A glutathiona (GSH) é um marcador da saúde celular e sua queda é indicativa de lesão oxidante. Seu déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e radiações, da capacidade de reversão de tumores e da síntese do ascorbato em

animais. A glutathione é um tripeptídeo composto de aminoácidos não essenciais, descrita como um importante agente antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A melatonina é um antioxidante conhecido, produzido pela glândula pineal e seu principal hormônio foi descoberto por Lerner em 1958. Também é produzido em outros tecidos, tais como retina e intestino grosso (Guyton, 1973).

Recentemente, a melatonina foi descrita como participante da função imune dos organismos e como um potente antioxidante. Exercendo a função de antioxidante, a melatonina parece desencadear uma proteção substancial contra os radicais livres que são gerados em uma variedade de situações experimentais, incluindo a injúria por isquemia/reperfusão. Por essa razão, ela vem sendo utilizada terapêuticamente em cirurgias e transplantes (Reiter & Maestroni, 1999). Além destes, há vários nutrientes essenciais de origem mineral, que participam do processo antioxidante em associação com enzimas. São eles, zinco, cobre, manganês, selênio e ferro (Halliwell & Gutteridge, 1989).

1.5.2. Antioxidantes Enzimáticos

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, comparadas com aqueles substratos oxidáveis, significativamente retardam ou inibem a oxidação deste substrato e podem agir em diferentes níveis da seqüência oxidativa. Gershman & Gilbert (1954) propuseram que a maioria dos efeitos danosos causados pelas concentrações elevadas de oxigênio nos

organismos vivos podia ser atribuída à formação de radicais livres. Entretanto, essa idéia não despertou interesse de muitos pesquisadores até a descoberta, em 1968, de uma enzima que é específica para a remoção catalítica de um radical de oxigênio (McCord & Fridovich, 1969). Essa enzima denominada superóxido dismutase (SOD), juntamente com outras duas – catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px) – são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (Halliwell & Gutteridge, 1989).

É possível que a superóxido dismutase (SOD) seja uma substância com efeitos anti-envelhecimento reais, podendo atuar positivamente sobre todos os processos degenerativos (Hendler, 1990). A superóxido dismutase (SOD) tem papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na remoção do radical superóxido. Antes da sua descoberta, a SOD já havia sido descrita por alguns autores como uma proteína que contém cobre, mas nenhuma atividade catalítica lhe havia sido atribuída (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Após o trabalho de McCord & Fridovich (1969), entretanto, com a determinação de sua função na dismutação do radical superóxido ($O_2\bullet$), seu papel foi estabelecido e, até hoje, apesar de inúmeras pesquisas realizadas com esta enzima, nenhum outro substrato foi descrito, mostrando a sua especificidade para o superóxido (Halliwell & Gutteridge, 1989). A forma que contém cobre e zinco, denominada de superóxido dismutase cobre-zinco dependente (CuZnSOD), é muito estável e parece estar presente em praticamente todas as células

eucarióticas (plantas ou animais). A CuZnSOD tem um peso molecular de 32.000 e é constituída de duas subunidades protéicas idênticas, com um átomo de cobre e um de zinco em cada uma delas. O Zn não funciona no sítio catalítico, mas aparece para estabilizar a enzima. Essa conclusão foi extraída de experiências nas quais os metais foram removidos dos sítios ativos e recolocados em outros, sozinhos ou em conjunto (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A superóxido dismutase dependente do manganês (MnSOD) é uma proteína de cor rosa, cujo peso molecular é de 40.000 e que contém manganês nos sítios ativos. A sua atividade diminui em pH alcalino. Não é inibida pelo cianeto, nem pelo di-etil-di-hidrocarbonato. É destruída pelo clorofórmio + etanol (não sobrevive ao métodos típicos da purificação para a CuZnSOD). A atividade da MnSOD em relação a CuZnSOD depende do tecido e das espécies onde atuam. A remoção do Mn dos sítios ativos causa perda da atividade catalítica, não podendo ser repostado por nenhum íon de transição, pois perde a sua atividade funcional. As seqüências de aminoácidos de todas as MnSOD, em todas as espécies, são parecidas e não estão relacionadas com a CuZnSOD (Halliwell & Gutteridge, 1989). A forma CuZnSOD apresenta-se mais resistente à variações de temperatura e à desnaturação por substâncias como cloreto de guanidina, duodecil sulfato de sódio, ou uréia (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Quanto a enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px), esta foi descoberta por Mills em 1959, em tecidos de mamíferos. Não se observa sua presença em plantas ou bactérias, embora possa ser encontrada em algumas algas e fungos (Halliwell &

Gutteridge, 1989). As células animais contêm dois tipos de glutathione peroxidase, sendo que um deles é selênio dependente, enquanto o outro não.

O primeiro tipo é capaz de reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, além do H_2O_2 . Essa forma possui peso molecular de 81.000, é uma proteína tetramérica e possui um átomo de selênio em cada sub-unidade. O segundo tipo, que não depende do selênio, tem peso molecular de 35.000, é dimérico e está apto a reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, menos o H_2O_2 .

A GSH-Px encontra alta atividade no fígado, moderada atividade no coração, pulmão e cérebro, e baixa atividade nos músculos (Halliwell & Gutteridge, 1989). Na maioria dos animais, a enzima dependente de selênio é responsável pela maior parte da atividade da GSH-Px, mas a proporção entre as duas formas varia muito entre as diferentes espécies, bem como de tecido para tecido em uma mesma espécie.

A enzima catalase esta presente na maioria das células aeróbicas, sendo que em animais se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético contêm, no entanto, pequenas quantidades da enzima (Halliwell & Gutteridge, 1989). Os nutrientes mais importantes coadjuvantes da catalase são o ferro e os tocoferóis (vitamina E), que se acham distribuídos na membrana celular, na fase hidrofóbica. A catalase evita o acúmulo de metahemoglobina e decompõe o peróxido de hidrogênio, um produto tóxico do metabolismo, em água e oxigênio molecular (Gaetani et al., 1989). Além de seu papel como espécie reativa de oxigênio, e, portanto, causador de estresse

oxidativo, o H_2O_2 em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio, o que pode acarretar infecções, formação de úlceras e até necrose (Wieacker et al., 1980).

A enzima catalase tem peso molecular de 240.000 e, quando purificada, apresenta quatro subunidades, cada uma contendo um grupamento (Fe III – protoporfirina), ligado ao seu sítio ativo (Wieacker et al., 1980). Com relação ao pH, pode-se observar uma diminuição da atividade da enzima abaixo de pH 4,0. Na faixa de 4,0 a 8,5, a atividade da catalase permanece constante, sendo que acima desse valor volta a decair (Chance, 1979). Experimentos têm sido realizados para avaliar a competição entre as enzimas catalase e glutathiona peroxidase em eritrócitos. Segundo alguns autores, a catalase é a enzima que se encarrega de fazer a conversão de altas concentrações de H_2O_2 em água e oxigênio. Quando o peróxido de hidrogênio está presente em baixas concentrações (condições fisiológicas normais), entretanto, a glutathiona peroxidase é que se encarrega de transformá-la em água (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Os peixes apresentam diversas maneiras de manter a homeostase do organismo na presença de cobre na água. Porém esta capacidade está dentro de certos limites, após os quais o metal pode se acumular em órgãos-alvo. Alterações fisiológicas e bioquímicas causadas pelo cobre induzem alterações morfológicas com danos estruturais em brânquias e fígado, além de alterações no hematócrito (Baker, 1969; Jobling, 1994).

O cobre e o ferro desempenham papel vital na respiração celular. Assim, o cobre é um elemento essencial e requerido diariamente na dieta de peixes (1 – 4 mg Cu kg⁻¹; peso seco). O excesso deste metal na dieta desencadeia a primeira ação tóxica: a formação de radicais livres no tecido onde o cobre se acumulou. Altas concentrações de cobre também afetam a função branquial através da perturbação da homeostase do sódio (Laurén & McDonald, 1985).

O principal local de excreção do excesso de cobre em peixes teleósteos é a bile (Grosell & Jensen, 2000). As brânquias de peixes também estão implicadas na excreção de cobre (Handy, 1996), mas esse processo ainda não está bem definido.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi verificar os resultados da utilização do sulfato de cobre CuSO_4 na aquicultura e os efeitos do Cu^{2+} no estresse oxidativo, obedecendo aos procedimentos abaixo:

1. Determinar a concentração sub-letal pró-oxidante do cobre (CuSO_4) para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*);
2. Determinar a concentração de cobre (CuSO_4) que apresenta efeitos antioxidantes;
3. Testar os efeitos de doses pró-oxidante e antioxidante de cobre (CuSO_4) nos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado, nas brânquias e no plasma dos animais testes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico



Figura 1. Exemplar de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*.
(<http://www.fishbase.org/Photos/ThumbnailsSummary.cfm?ID=2>)

Segundo Nelson (1984) a espécie enquadra-se nas seguintes categorias taxonômicas:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Superclasse: Gnathostomata

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus*

3.2. Descrição morfofisiológica

A forma do corpo do *Oreochromis niloticus* é bem compressa e delgada. Apresenta uma linha lateral dividida em duas partes: a porção anterior mais alta em relação a porção posterior, uma nadadeira dorsal longa e sem cortes, e a nadadeira anal afilando em uma ponta. O comprimento e o peso máximo publicado foi de 60 cm e 4,3 kg, respectivamente. A principal característica que distingue o *Oreochromis niloticus* é a presença de listras por todo comprimento da nadadeira caudal. São animais de hábitos diurnos e fitoplanctófago, alimentando-se principalmente de algas clorofíceas.

3.3. Uso econômico

As tilápias são fáceis de serem mantidas em cativeiro, pois necessitam de pouco espaço. Elas se reproduzem facilmente e crescem rápido, mas são perigosas para qualquer outro peixe pequeno.

As tilápias podem ser utilizadas como controle biológico de determinadas plantas aquáticas, preferindo as que flutuam, mas também consomem algumas algas fibrosas.

As tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) é hoje a espécie mais popular no Brasil. A tilápia é cultivada em 22 estados brasileiros e a sua produção anual está entre 30 e 40 mil toneladas. A tilápia foi uma das primeiras espécies oriundas da

aqüicultura a ser beneficiada, sendo atualmente comercializada na forma de filés congelados, tecnologia emergente.

3.4. Área de distribuição onde a espécie é nativa

A tilápia-do-nilo foi um dos primeiros peixes a ser criado em aqüicultura pelo antigos Egípcios (4000 anos).

África: rios litorâneos de Israel. Rio Nilo desde o baixo Albert Nile até o delta; bacia do lago.

3.5. Ambiente natural

Bentopelágico, de água doce à ligeiramente salgada; profundidade média de 5 m.

3.6. Ambientes preferenciais para invasão

As tilápias são espécies oportunistas que adaptam-se facilmente em ambientes lênticos. Toleram grandes variações de temperatura e baixo nível de oxigênio dissolvido na água.

3.7. Coleta e manutenção em laboratório

Exemplares de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, foram obtidas no Centro de Estudos de Peixes Tropicais (CEPTA/IBAMA, Pirassununga, SP), onde foram mantidos para crescimento em reservatórios artificiais, abertos e livres de poluição aquática, sob monitoramento. Os animais ($n = 150$; $Wt = 41,5 \pm 1,5$ g e $Lt = 12,5 \pm 0,2$ cm), foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos em sacos plásticos contendo água aerada. Em laboratório foram aclimatadas à temperatura de 25 °C por um período de 40 dias. Durante esse período os animais foram mantidos em tanques com recirculação de água e aeração constante. Os parâmetros físicos-químicos da água (Tabela 1) foram mantidos nos níveis recomendados para a espécie, ao longo do período experimental (Proença & Bittencourt, 1994).

Tabela 1. Parâmetros físicos-químicos da água nos tanques usados nos testes de resistência para determinação da CL_{50} - 96 h de sulfato de cobre na espécie estudada.

	pH	Alcalinidade $CaCO_3$ ($mg.L^{-1}$)	Dureza $CaCO_3$ ($mg.L^{-1}$)	Na^+ ($mEq.L^{-1}$)	K^+ ($mEq.L^{-1}$)	Amônia ($mg.L^{-1}$)
Sem sulfato de cobre	7,4	11,6 -12,1	22-23	1,6-2,0	3,4-3,7	0,22-2,02
Com sulfato de cobre	7,5	11,8 – 13,7	23-24	1,5-2,0	3,3-3,8	0,53-2,9

3.8. Toxicidade do cobre

Animais jovens e de peso aproximado ($Wt = 54,25 \pm 0,10g$) (Tabela 2) foram submetidos a diferentes concentrações de sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Concentrações terapêuticas deste sal variam de 0,125 a 0,750 $mg.L^{-1}$ (Shelenk et al., 1999). A partir desses valores foram testadas as concentrações crescentes em experimentos curtos (96 h) para a determinação da concentração sub-letal ($CL_{50-96 h}$) para esta espécie. O delineamento básico para a determinação da $CL_{50-96 h}$ consistiu em submeter os animais a diferentes concentrações de $CuSO_4$ (0,35; 0,70; 1,50; 3,00; 4,00; 6,00 e 9,00 $mg.L^{-1}$) e observar a ocorrência de mortalidade no período de 96 h. Os peixes foram distribuídos em grupos (8 animais/tanque de 180 L) com realização de duas réplicas, e submetidos ao $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, até a obtenção da dose letal para 50% dos indivíduos expostos. Nos grupos com sobrevivência maior que 50% os animais foram amostrados para determinação de parâmetros de estresse oxidativo. Durante os testes de toxicidade para determinação da $CL_{50-96 h}$ os animais não foram alimentados.

3.9. Amostragens

Os animais sobreviventes foram anestesiados com benzocaína ($10 mg.L^{-1}$), pesados e, depois de coletada alíquota de sangue, foram sacrificados por secção medular. Imediatamente após o sacrifício, brânquias e fígados foram retirados e

lavados em solução salina gelada (NaCl 0.9%). As alíquotas de sangue (0,5 ml) foram imediatamente centrifugadas e preparadas para a determinação dos parâmetros bioquímicos descritos a seguir.

Os tecidos coletados (200 mg) foram congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer (-80 °C) e oportunamente foram homogeneizados em Potter Elvehjem, com pistilo de teflon, com até 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 min a -4 °C. O sobrenadante foi utilizado para as análises bioquímicas.

A análise do estresse oxidativo no plasma foi realizada pela determinação das concentrações do hidroperóxido de lipídio (HP) e a atividade da enzima GSH-Px. Nos fígados e nas brânquias foram determinadas as concentrações do hidroperóxido de lipídio (HP), a superóxido dismutase total (SOD – E.C. 1.15.1.1.), a catalase (CAT - E.C. 1.11.1.6.) e a glutathione peroxidase (GSH-Px – E.C. 1.11.1.9.). Leituras espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Spectronic Genesys 5. Foram utilizados reagentes Sigma® (St. Louis, MO, USA) ou CELM® (São Paulo, Brasil).

3.10. Análises bioquímicas

3.10.1. Determinação de proteínas totais

Proteínas totais foram determinadas no plasma e no homogeneizado de tecido utilizado para os ensaios das enzimas antioxidantes. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método do biureto (Moura, 1982).

3.10.2. Determinação do TBARS

Substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas no plasma dos animais experimentais segundo método colorimétrico descrito por Almeida et al., 2002.

3.10.3. Determinações da concentração do hidroperóxido de lipídio (HP)

O hidroperóxido de lipídio (HP) foi determinado através da oxidação do Fe^{2+} (Jiang et al. 1991). Adicionou-se 100 μL de amostra ao meio contendo 100 μM de alaranjado de xilenol, 250 μM de Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal), 25 mM de H_2SO_4 e 4 mM de butilato hidroxitolueno (BHT-Sigma[®]) em metanol 90% e incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente. O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol formando um composto colorido. As leituras foram realizadas a 560 nm.

O coeficiente de extinção do complexo Fe^{3+} alaranjado de xilenol a 560 nm, é $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em nmol de butilato hidroxitolueno por g de tecido (nmol BHT/g tecido).

3.10.4. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD – E.C.1.15.1.1.)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela técnica de Crouch et al., 1981, tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução do NBT (nitroblue-tetrazólio) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino. O experimento foi realizado em temperatura ambiente, utilizando-se 0,5mL da amostra adicionada a 0,5mL de mistura reativa (NBT 6 mL + EDTA 4 mL), 2 mL de hidroxilamina e de tampão carbonato de sódio 0,5 M pH 10,2.

A atividade da enzima foi expressa em unidade (U) da enzima por mg de proteína que corresponde a 50% de inibição da MPI.

3.10.5. Determinação da catalase (CAT - E.C. 1.11.1.6.)

A atividade da CAT foi determinada utilizando-se, em temperatura ambiente, 0,5 mL de amostra diluída na proporção 1:10 e peróxido de hidrogênio (30%).

A reação controle foi realizada utilizando-se tampão fosfato 50 mM, pH 7,0.

O experimento se iniciou com a adição de 30 mM peróxido de hidrogênio.

As leituras espectrofotométricas a 240 nm foram observadas em intervalos de 15 s. Os resultados foram expressos em unidades de Bergermayer (Aebi, 1974).

3.10.6. Determinação da glutatona peroxidase (GSH-Px – E.C.1.11.1.9.)

A atividade da glutatona peroxidase foi determinada segundo Hafeman et al., (1974). Adicionou-se 10 µL de amostra a 147µL água destilada, 100 µL de GSH 2 mM, 100 µL tampão fosfato de sódio 0,4 mM, 50 µL de azida sódica 0,01 M. A mistura foi mantida em tubo de ensaio com capacidade para 2 mL previamente aquecido (37 °C) e deixada em repouso por 5 min em banho-maria a 37 °C. Imediatamente após, foi adicionado à mistura anterior 100 µL de H₂O₂ 1,25 mM. Esperou-se 3 min e no banho e transferiu-se uma alíquota de 100 µL desta mistura com 400 µL do Reagente de Precipitação (ácido metafosfórico glacial, EDTA, NaCl). Centrifugou-se a 3000 rpm por 10 min. Adicionou-se 200 µL do sobrenadante a 200 µL de Na₂HPO₄ 0,4 M e 100 µL de DTNB 40 mg/mL, preparado em citrato trissódico 1%. Tanto a amostra como o branco foram lidos a 412 nm antes de 5 min após a adição do DTNB. Cálculo estabelecido em 1U = (Maior Absorbância – Menor Absorbância) 1000. (U = nmol.mg proteína⁻¹).

3.11. Análises estatísticas

Os parâmetros quantificados foram analisados por ANOVA ou correspondente não paramétrico (Kruskal-Wallis), após teste de normalidade Komogorov-Smirnov e teste Bartlet para homogeneidade de variância. O pós-teste de Tukey foi usado para comparações das médias dos diferentes grupos. Para a determinação da CL₅₀-96 h de sulfato de cobre, foi utilizada a análise de regressão não ponderada (PROBIT) utilizando-se o software XLSTAT Pro version 6.1.9 for Windows. As demais análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Graphpad InsTat for Windows. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (Zar, 1996).

4. RESULTADOS

Ocorreu mortalidade de mais de 50% dos animais nos grupos tratados com 4,00; 6,00 e 9,00 mg.L⁻¹ de CuSO₄ (Fig. 2).

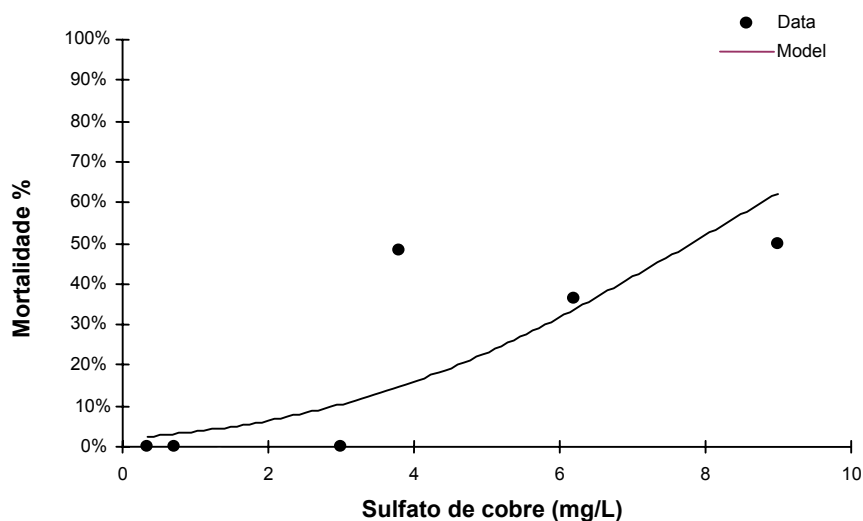


Figura 2. Análise de regressão não linear e determinação da CL₅₀-96 h de sulfato de cobre para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

A CL₅₀-96 h determinada para a espécie foi de 7,81 mg.L⁻¹ (equivalente a 2,09 mg.L⁻¹ de íon cobre). O peso médio dos animais não diferiu antes e após as 96 h de exposição ao CuSO₄, exceto para os grupos controle e ao exposto à concentração de 4,00 mg.L⁻¹ (Tabela 2) que apresentaram respectivamente um aumento e uma diminuição significativa de peso após 96 h de exposição.

Tabela 2. Médias \pm desvios padrão do peso (g) inicial e peso final de *Oreochromis niloticus* submetidas à exposição ao CuSO₄ aquático por 96 h.

CuSO ₄ (mg.L ⁻¹)	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
Controle	59,80 \pm 9,60 ^A	68,50 \pm 17,40 ^{Bb}
0,35	54,25 \pm 0,10	53,60 \pm 13,80 ^{ab}
0,70	49,56 \pm 14,5	61,10 \pm 11, 90 ^b
1,50	46,10 \pm 8,90	48,40 \pm 8,01 ^b
3,00	41,50 \pm 8,50	38,80 \pm 8,50 ^a
4,00	61,61 \pm 1,60 ^B	57,80 \pm 0,60 ^{Ab}
6,00	55,60 \pm 16,70	53,80 \pm 15,60 ^{ab}

Obs: Letras maiúsculas comparam peso no início e final do período de exposição.

Letras minúsculas comparam médias dentro de um mesmo grupo.

Durante este mesmo período, o comprimento dos peixes não diferiu entre os diferentes grupos (Tabela 3). Entretanto a relação peso do fígado/peso corpóreo (índice hepato somático – IHS) apresentaram tendência à redução, nas maiores concentrações de exposição ao metal.

Tabela 3. Médias \pm desvios padrão do comprimento total (CT), comprimento padrão (CP) e índice hepático somático (HSI) de *Oreochromis niloticus* após 96 h de exposição a diferentes concentrações de CuSO₄ aquático.

CuSO ₄ (mg.L ⁻¹)	CT (cm)	CP (cm)	HSI
0,00	15,3 \pm 0,8	12,3 \pm 0,7	1,5 \pm 0,6
0,35	14,5 \pm 0,6	11,7 \pm 0,7	1,7 \pm 0,5
0,70	15,1 \pm 1,9	12,2 \pm 1,5	1,5 \pm 0,5
1,50	14,0 \pm 0,8	11,2 \pm 0,7	1,7 \pm 0,7
3,00	13,6 \pm 1,0	10,8 \pm 0,8	1,1 \pm 0,3
4,00	15,4 \pm 0,8	12,4 \pm 0,8	1,0 \pm 0,3
6,00	14,8 \pm 1,6	11,9 \pm 1,2	1,0 \pm 0,3

Obs: não houve diferenças estatísticas entre as médias.

A peroxidação lipídica no plasma dos animais experimentais, determinada pela produção de reagentes do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela reação do FOX, não se alterou com a exposição ao cobre (Tabela 4). Entretanto a defesa conferida pela glutathione peroxidase aumentou nos grupos submetidos a 0,70; 1,50 e 3,00 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre.

Tabela 4. Médias \pm desvios padrão de hidroperóxido de lipídeos (TBARS e FOX) e da glutatona peroxidase (GSH-Px) do plasma de *Oreochromis niloticus* submetidas ao CuSO_4 (mg.L^{-1}) por 96 h.

CuSO_4 (mg/L)	TBARS ($\text{nmol MDA.g proteína}^{-1}$)	FOX ($\text{nmol.g proteína}^{-1}$)	GSH-Px ($\text{nmol.mg de proteína}^{-1}$)
Controle	435,1 \pm 64,2	262,5 \pm 65,6	1,3 \pm 0,3 ^a
0,35	436,0 \pm 63,4	274,9 \pm 55,5	1,3 \pm 0,2 ^a
0,70	419,0 \pm 46,9	292,2 \pm 71,9	1,7 \pm 0,5 ^{ab}
1,50	391,3 \pm 45,7	301,5 \pm 26,7	2,3 \pm 0,2 ^b
3,00	521,4 \pm 87,0	270,4 \pm 64,5	2,6 \pm 0,3 ^b
4,00	377,0 \pm 89,0	235,6 \pm 48,5	1,6 \pm 0,2 ^a
6,00	341,0 \pm 26,0	200,4 \pm 36,2	1,7 \pm 0,3 ^b

Obs: médias ausentes de letras não diferem entre si estatisticamente. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

No tecido hepático, não houve diferença significativa na produção de HP entre grupos submetidos ao sulfato de cobre e animais controle (Tabela 5). A atividade da GSH-Px aumentou significativamente com a exposição ao CuSO_4 na concentração $0,35\text{mg.L}^{-1}$ e diminuiu significativamente nas concentrações $0,70$ e $4,00\text{ mg.L}^{-1}$.

Tabela 5. Médias \pm desvios padrão de hidroperóxido de lipídio, da superóxido dismutase, da glutaciona peroxidase e da catalase no fígado de *Oreochromis niloticus* submetida ao CuSO_4 por 96 h.

CuSO_4 (mg/L^{-1})	HP ($\text{nmol.g proteina}^{-1}$)	SOD ($\text{U.mg proteina}^{-1}$)	GSH-Px ($\text{Umol.mg protein}^{-1}$)	CAT ($\text{U Bergermayer.mg proteina}^{-1}$)
Controle	79,6 \pm 28,2	36,6 \pm 6,5	6,6 \pm 2,3 ^b	5,2 \pm 1,3
0,35	97,5 \pm 32,6	31,5 \pm 12,0	7,3 \pm 1,8 ^b	4,9 \pm 1,2
0,70	73,8 \pm 35,9	28,6 \pm 11,5	3,6 \pm 3,0 ^a	4,4 \pm 1,2
1,50	77,9 \pm 36,6	26,5 \pm 18,3	5,6 \pm 1,9 ^{ab}	4,7 \pm 1,6
3,00	50,8 \pm 15,3	21,2 \pm 10,8	4,1 \pm 1,3 ^{ab}	3,6 \pm 1,6
4,00	60,4 \pm 17,3	20,5 \pm 12,2	3,5 \pm 1,2 ^a	5,2 \pm 0,9
6,00	79,2 \pm 30,0	30,6 \pm 16,3	5,5 \pm 2,0 ^b	3,5 \pm 0,9

Obs: médias ausentes de letras não diferem entre si estatisticamente. Médias seguidas de letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0,05$).

A atividade das enzimas SOD e CAT mantiveram-se nos níveis observados nos animais controle, independentemente da concentração teste. Entretanto, nas brânquias ocorreu um aumento significativo dos níveis de HP e na atividade da SOD nas concentrações 0,70 e 1,50 mg.L^{-1} . A atividade GSH-Px não foi alterada e a CAT diminuiu nos grupos com a exposição 0,70 e 1,50 mg.L^{-1} de CuSO_4 (Tabela 6).

Tabela 6. Médias \pm desvios padrão de hidroperóxido de lipídeos, da superóxido desmutase, da glutatona peroxidase e da catalase nas brânquias de *Oreochromis niloticus* submetidas ao CuSO_4 (mg.L^{-1}) por 96 h.

Tratamento	HP (nmol.g proteína^{-1})	SOD ($\text{U mg.proteína}^{-1}$)	GSH-Px (mmol.mg proteína^{-1})	CAT (U Bergermayer.mg proteína^{-1})
Controle	$24,8 \pm 7,4^a$	$73,8 \pm 38,7^a$	$3,29 \pm 1,30$	$1,39 \pm 0,32^a$
0,35	$36,4 \pm 9,1^{ab}$	$58,26 \pm 33,4^a$	$5,07 \pm 1,50$	$2,33 \pm 0,39^{bc}$
0,70	$35,1 \pm 7,8^a$	$144,0 \pm 49,4^{ab}$	$3,74 \pm 1,6$	$1,29 \pm 0,31^a$
1,50	$41,8 \pm 8,9^b$	$105,7 \pm 43,5^b$	$3,73 \pm 1,2$	$1,91 \pm 0,74^{ac}$

Obs: médias ausentes de letras não diferem entre si estatisticamente. Médias seguidas de letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O cobre é encontrado numa grande variedade de depósitos minerais e ocorre naturalmente numa faixa de 0,005 a 29,20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para águas marinhas e até 20,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em rios do Estado de São Paulo, SP, Brasil (CETESB, 1994-2000). Este metal é geralmente introduzido no ambiente aquático por processos industriais, sendo considerado um dos poluentes mais comuns (Nriagu, 1989). Por outro lado, o cobre é um elemento traço requerido em pequenas concentrações pelos organismos para realização de funções metabólicas, mas é potencialmente tóxico quando a concentração interna disponível excede a capacidade dos processos bioquímicos e/ou fisiológicos responsáveis pela desintoxicação do organismo. O uso do CuSO_4 para prevenir a presença de parasitas e a proliferação de algas filamentosas em sistemas de cultivo de peixes pode gerar efeitos nocivos aos organismos, principalmente levando-se em conta as diferenças para a resistência a metais apresentadas por espécies expostas em sistemas de cultivo.

Neste trabalho, os resultados referentes a $\text{CL}_{50-96\text{ h}}$ (Fig. 2) para tilápia do nilo, indicam a resistência da espécie à exposição ao cobre, que está próxima à concentração máxima de cobre utilizada em sistemas de aquicultura (Boyd,1990).

A diminuição do peso dos animais submetidos ao cobre comparativamente aos animais controle (Tabela 2) indica, provavelmente, que os animais estão deslocando energia para suportar os efeitos tóxicos do cobre. Durante o período de exposição ao metal, os animais não foram alimentados, como recomendado na

literatura para testes de toxicidade. A exposição a diferentes poluentes pode resultar no aumento do IHS, mas a exposição a metais pesados pode reduzir o IHS quando comparado a animais controle (Ricardo et al., 1998).

Peixes que vivem em águas contaminadas por metais apresentam o IHS menor do que o de peixes de ambientes não contaminados (Norris et al., 2000). Esses efeitos parecem estar relacionados a metais específicos, tais como o Cu e Zn, bem como ao tempo de exposição considerado. Peixes tratados com dietas suplementadas com Cu e Zn tiveram redução do IHS após 20 semanas de exposição. Os resultados aqui apresentados para tilápia do nilo indicam diminuição do IHS após 96 h de exposição.

A peroxidação lipídica excessiva seguida à exposição a metais pode resultar em danos de membranas e morte celular no fígado, o que pode ter contribuído para o reduzido tamanho de fígado nos animais tratados (Farag et al., 1995) e subsequente alteração no IHS após o período teste.

De fato, a peroxidação lipídica tem sido proposta como um dos principais agentes na formação de diversas anormalidades fisiopatológicas e danos celulares em resposta ao aumento das espécies reativas do oxigênio (ERO) (Gutteridge & Halliwell, 1990). Entretanto, os resultados referentes à peroxidação lipídica no plasma e fígado (Tabelas 4 e 5) sugerem a manutenção da produção de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos animais submetidos ao cobre. Esses dados são confirmados quando confrontados com a produção de HP, que é uma medida mais direta de produtos da peroxidação lipídica

(Jiang et al.,1991). Segundo esses dados, o cobre, nas concentrações testadas, não foi suficiente para produzir aumento da peroxidação lipídica, ou houve aumento das defesas antioxidantes conferindo aos animais capacidade para se adaptar às condições ambientais impostas.

As respostas observadas podem também estar relacionadas ao desenvolvimento de adaptações específicas para a toxicidade do cobre na espécie estudada. O cobre induziu o aumento de hemoglobina, eritrócitos e hematócrito em *Salvelinus alpinus* após 21 dias de exposição (McKim et al., 1970). Concentrações sub-letais de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ aumentaram o consumo de oxigênio em truta, *Salmo trutta* e *Lepomis macrochirus* (O'Hara, 1971), mas reduziram o consumo de O_2 em carpa, *Cyprinus carpio* (De Boeck et al., 1995). Estes dados reforçam a premissa de que a produção de ERO em animais expostos ao cobre depende da espécie e do tempo de exposição considerado, uma vez que sua produção está ligada a processos metabólicos intrinsecamente dependentes de oxigênio.

Por outro lado, o aumento da atividade da GSH-Px no plasma dos animais submetidos a 0,70; 3,00 e 4,00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Tabelas 5 e 6), sugere que a capacidade antioxidante do animal responde positivamente às condições experimentais. De qualquer forma, os dados obtidos demonstram que a exposição ao cobre parece favorecer o estabelecimento de estresse oxidativo, definido aqui como o desequilíbrio entre a peroxidação lipídica e as defesas antioxidantes (Droge, 2002). O aumento da GSH-Px no plasma de *Oreochromis niloticus* está de

acordo com os resultados descritos para tecidos de animais com nível elevado de estresse oxidativo (Tüzün et al., 2002), podendo ser considerado como uma resposta à produção de espécies radicais induzidas pelo cobre. Neste contexto, a GSH-Px plasmática pode ser considerada como um indicador indireto do estresse oxidativo nas condições estudadas. Altos níveis da GSH-Px plasmático estão relacionados ao aumento da produção de estresse oxidativo nos rins de ratos (Tüzün et al., 2002). O não estabelecimento de diferença significativa na concentração de produtos de peroxidação lipídica no plasma ou fígado indica que, nas concentrações testes, espécies radicais foram eficientemente seqüestrados antes de causar uma peroxidação lipídica significativa. Além disso, a manutenção da atividade da SOD nos níveis controles sugere que a capacidade para a dismutação do radical superóxido é mantida nas diferentes concentrações de cobre, podendo estar associada a possível propriedade antioxidante desse metal.

A SOD tem papel fundamental no sistema de proteção antioxidante. Sua ação catalítica sobre o superóxido (O_2^-), constitui o primeiro passo do processo de desintoxicação das ERO produzidas durante o metabolismo celular (McCord and Fridovich, 1969). Além disso, o cobre é um importante constituinte da co-enzima Cu-Zn SOD, sendo este um parâmetro importante para avaliar a propriedade antioxidante do cobre. A deficiência alimentar de cobre pode reduzir a Cu-Zn SOD, ceroloplasmina e catalase (Sukalsky et al., 1997). Danos oxidativos podem ocorrer durante a deficiência do cobre, como exemplificado pelo aumento do conteúdo de hidroperóxido de lipídios em fígado e microsomas de ratos (Balevska et al., 1981).

Embora vários mecanismos para a toxicidade do cobre celular tenham sido descritos, a toxicidade deste metal está inicialmente relacionada à capacidade deste para a catálise da formação de intermediários de oxigênio tóxicos ou ERO, através de uma série de reações redox. O superóxido (O_2^-) é formado durante o metabolismo celular normal, ou pode ser gerado pela oxidação do complexo glutationa-cobre (GS-Cu) ou cobre-metalotioneína (Cu-MT) (Freedman et al., 1989). Esta espécie radical pode reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tanto pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), como pela dismutação espontânea. O peróxido de hidrogênio reage com o cobre para formar radicais hidroxil (OH), que são altamente tóxicos. O aumento da metabolização do peróxido de hidrogênio pela glutationa peroxidase é um indicador do aumento do fluxo de H_2O_2 , cujos níveis aumentam devido aos altos níveis de GS-Cu, Cu-MT ou pela presença de glutationa nas células expostas ao cobre (Freedman et al., 1989).

Os resultados referentes ao HP nas brânquias indicam aumento da peroxidação lipídica nesse tecido com a exposição ao cobre (Tabela 6). As modificações enzimáticas significativas observadas nos grupos mantidos em 0,35; 0,70 e 1,50 $mg.L^{-1}$ indicam que pelo menos uma das frentes de defesas enzimáticas está buscando combater os efeitos do cobre, mas não é suficiente para evitar a peroxidação lipídica e o conseqüente estabelecimento de estresse oxidativo no tecido estudado. Provavelmente os efeitos do cobre são mais pronunciados nas brânquias por ser esta a rota de entrada do cobre na corrente sanguínea dos peixes.

6. CONCLUSÃO

O cobre, nas concentrações testadas, não foi suficiente para produzir aumento da peroxidação lipídica, ou houve aumento das defesas antioxidantes conferindo aos animais. O não estabelecimento de diferença significativa na concentração de produtos de peroxidação lipídica no plasma ou fígado indica que, nas concentrações testes, espécies radicais foram eficientemente seqüestrados antes de causar uma peroxidação lipídica significativa.

O aumento da atividade da GSH-Px no plasma dos animais submetidos a 0,70; 3,00 e 4,00 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O, sugere que a capacidade antioxidante do animal responde positivamente às condições experimentais, podendo ser considerado como uma resposta à produção de espécies radicais induzidas pelo cobre, podendo ser considerada como um indicador indireto do estresse oxidativo nas condições estudadas.

A manutenção da atividade da SOD nos níveis controles sugere que a capacidade para a dismutação do radical superóxido é mantida nas diferentes concentrações de cobre, podendo estar associada a possível propriedade antioxidante desse metal.

Os resultados referentes ao HP nas brânquias indicam aumento da peroxidação lipídica nesse tecido com a exposição ao cobre. As modificações enzimáticas significativas observadas nos grupos mantidos em 0,35; 0,70 e 1,50 mg.L⁻¹ indicam que pelo menos uma das frentes de defesas enzimáticas está buscando combater os efeitos do cobre, mas não é suficiente para evitar a

peroxidação lipídica e o conseqüente estabelecimento de estresse oxidativo no tecido estudado.

Através dos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que a utilização do sulfato de cobre como agente profilático em sistemas de aqüicultura expõe os animais a concentrações superiores à capacidade de desintoxicação dos organismos expostos, podendo comprometer o bem estar animal. Neste trabalho a manutenção dos níveis de GSH-Px nos tecidos estudados está relacionada ao maior nível desta enzima no plasma, conferindo uma adaptação importante para a manutenção dos níveis de HP na espécie estudada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2ª. ed. Bergmeyer H.V. eds., New York: **Verlog Chemic Weinheim**, v. 1, 2, 3, 4, 1974.

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H.S.; JAIN, S.K.; ATHAR, M.; RSISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochem. Bioph. Acta**, v. 1523, p. 37-48, 2000.

ALMEIDA, J.A.; DINIZ, Y.S.; MARQUES, S.F.G.; FAINE, L.A.; RIBAS, B.O.; BURNEIKO, R.C.; NOVELLI, E.L.B.. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environ. Intern.** v. 27, p. 673-679, 2002.

AZEVEDO NETTO, J.M. e HESS, M.L. Tratamento de águas residuárias. Separata da **Revista DAE**. p. 218, 1970.

BALEVSKA P. S., RUSSANOV E. M., KASSABOVA T. A. Studies on lipid peroxidation in rat liver by copper deficiency. **Int. J. Biochem.**, v. 13, p. 489-493, 1981.

BAKER, J. T. P. Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). **J. Fish. Res. Bd. Can.**, v. 26, p. 2785-2793, 1969.

BELLÓ, A. Estresse oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres, In: MARRONI, N.P. et al. Estresse Oxidativo e Antioxidante. Editora Ulbra, p. 15-19, 2002.

BIESALSKI, H.K. The role of antioxidants in nutritional support. **Nutrition**, v.16, p. 593-596, 2000.

BOYD, C.E. Water quality in ponds for aquaculture. Bermington Publishing, Birmingham, AL, p. 482, 1990.

BOVERIS, A. & CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEV, L. W. (Ed.) Superoxide desmutase, Boca Raton: CRC Press, v. 2, p. 159-168, 1982.

BOVERIS, A. Mitochondrial; Production of superoxide radical hydrogen peroxide. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.78, p.67-82, 1977.

BRAY, T. M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. **Nutrition**, v. 16, p. 578-581, 2000.

BROWN, R.E. Significance of trace metals and nitrates in sludge soils. In **Journal WPCF**. v. 47, n. 12, p. 2863-2875, 1975.

CETESB, Relatório de qualidade das águas no interior do Estado de São Paulo, p. 238, (1994-2000).

CHAMPE, P.C. & HARVEY, R.A. Bioquímica Ilustrada. 2ª ed. Porto Alegre, Artes Médicas, p. 446, 1997.

CHANCE, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 527-602, 1979.

CHAUDIÈRE, J. & FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, p. 949-962, 1999.

CHEN, J.C. & LIN, C.H. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 49, p. 55-65, 2001.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R.A.; BUSE, M.G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Physiol. Rev.**, v. 30, p. 235-241, 1981.

DANDAPAT, J. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defense system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 127(C), p. 101-115, 2000.

DE-BOECK, G.; DE-SMET, H.; BLUST, R. The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp (*Cyprinus carpio*, L.). **Aquat. Toxicol.**, v. 32, p. 124-141, 1995.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

FARAG, A.M.; STANSBURY, M.A.; HOGSTRAND, C.; MACCONNELL, E.; BERGMAN, H.L. The physiological impairment of free ranging brown trout exposed to metals in the Clark Fork River, Montana. **Can. J. of Fisheries and Aquatic Sciences.**, v. 52, p. 2038-2050, 1995.

FLOYD R. A. Free radicals in molecular biology. Aging and disease. New York: Raven, 1984.

FREEDMAN, J.H.; CIRIOLO, M.R.; PEISACH, J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 5598-5605, 1989.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. exp. Biol.**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

GAETANI, G.F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A.M.; KIRKMAN, H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v. 73, p. 334-339, 1989.

GERSCHMAN, R. & GILBERT, A. Oxygen poisoning and ex-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, p. 623-626, 1954.

GROSELL, M. & JENSEN, F. Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish (*Platichthys flesus*). **Aquat. Toxicol.** v. 50, p. 97-107, 2000.

GUTTERIDGE, J.M.C. & HALLIWELL B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends Biochem Sci.**, v.15, p.129-135, 1990.

GUYTON, A. C. Tratado de Fisiologia Médica. 4.^a edição. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Hoogan S/A, p. 974, 1973.

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

HALLIWEL, B. Oxidative stress nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutrition antioxidant intake in humans. **Free Rad. Res.**, v. 25, p. 25-57, 1996.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, p. 543, 1989.

HANDY, R. D. Dietary exposure to toxic metals in fish. In Toxicology of Aquatic Pollution. Cambridge University Press. Cambridge. ed E.W. Taylor, p. 29-60, 1996.

HEMPHILL, B. Rules and options for sludge disposal. In **Water engineering and management** v. 139, n. 2, p. 24-26, 1992.

HENDLER, S.S. Vitamin and mineral encyclopedia. San Diego, Simon e Schuski, p. 576, 1990.

JIANG Z.Y.; WOLLARD, A.C.S.; WOLF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method *Lipids*. **Physiol. Rev.**, v. 26, p. 853-856, 1991.

JOBLING, M. Fish bionergetics. Chapman & Hall, London, p. 309, 1994.

KAMUNDE, C.; GROSELL, M.; HIGGS, D.; WOOD, C.M. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake **J. exp. Biol.** v. 205, p.279-290, 2002.

KAPPUS, H. & SIES, H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. **Experientia**, v. 37, p. 1223-1241, 1981.

KAY, M.M.B.; BOSMAN, G.J.C.G.M.; SHAPIRO, S.S.; BENDICH, A.; BASSEL, P.S. Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 2463-2467, 1986.

KONSTANTINOV, A.A. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 894, p. 1-10, 1987.

LAMY, I., BOURGEOIS, S., BERMOND, A. Soil cadmium mobility as a consequence of sewage sludge disposal. In **Journal of Environmental Quality**, v. 22, n. 4, p. 731-737, 1993.

LAURÉN, D.J. & McDONALD, D.G. Effects of copper on branchial ionregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **J. Comp. Physiol.**, vol. 155(B), p. 636-644, 1985.

LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica 2ª ed. São Paulo, Savier p. 839, 1995.

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

LINDER, M.C. Copper and genomic stability in mammals. **Mut. Res.**, p. 141-152, 2001.

MACHLIN, L.J. & BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J.** 1 ed., p. 441-445, 1987.

MARCON, J. L. Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa. Tese (Doutorado), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, p. 114, 1997.

McCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

McDERMOTT, B. M.; FLATT, P. R.; STRAIN, J. J. Effects of copper deficiency and experimental diabetes on tissue antioxidant enzyme levels in rat. **Ann. Nutr. Metab**, v. 38, n. 5, p. 263-269, 1994.

McKIM, J. M.; CHRISTENSEN, G. M.; HUNT, E. P. Changes in the blood of the brook trout *Salvelinus fontinalis* after short-term and long-term exposure to copper. **J. Fish. Res. B. Can.**, v. 27, p. 1883-1889, 1970.

MOURA, R. A. Técnicas de laboratório. 2.ed. São Paulo: Atheneu, p. 822, 1982.

NELSON, J.S. Fishes of the world. 2 ed. John Wiley & Sons, Inc. 1984.

NORRIS, D.O.; CAMP, J.M.; MALDONADO, T.A.; WOODLING, J.D. Some aspects of hepatic function in feral broen trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127, p. 71-80, 2000.

NRIAGU, J. O. Geochim. Cosmochim. **Acta**, vol. 37, p. 367-377, 1973.

NRIAGU, J.O. A Global Assessment of Natural Sources of Atmospheric Trace Metal. **Nature**, v. 338, p. 47-49, 1989.

O'HARA, J. Alterations in Oxygen Consumption by Bluegills Exposed to Sublethal Treatment with copper. **Water Res.**, vol. 15, p. 321, 1971.

PROENÇA, C.E.M., BITTENCOURT, P.R.L. Manual de Psicultura Tropical. Ibama, Brasília, 1994.

REITER, J. R. & MAESTRONI, G. J. M. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. **J. Mol. Med.**, v. 77, p. 36-39, 1999.

RICARDO, A.C., DANIEL, C., ANDERSON, P., HONTELA, A. Effects of sub chronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 34, p. 377-381. 1998.

SHELENK, D., KENNETH, B.D., GRIFFIN, B.R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. **Aquaculture**, v. 177, p. 367-397, 1999.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical applications. **Am. J. Med.** v. 91, p. 315-38, 1991.

SILVA, A.M.M.; NOVELLI, E.L.B.; FASCINELI, M.L.; ALMEIDA, J.A. Impact of an environmentally realistic intake of water contaminants and superoxid formation on tissues of rats. **Environ. Poll.** v. 105(C), p. 243-249, 1999.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Braz. J. Med. Res.** v. 29, p. 1715-1733, 1996.

SUKALSKI, K.A.; LABERGE, T.P.; JOHNSON, W.T. In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency, **Free Rad. Biol. Med.**, v. 22, p. 835-842, 1997.

TURRENS, J. F. The effect of hiperoxia on superoxide desmutase production by lung submitochondrial particles. **Arch Biochem. Biophys.**, Orlando, 217, p. 401-410, 1982.

TÜZÜN, A.; ERDIL, A.; İNAL, V.; AYDIN, A.; BAGCI, S.; YESILOVA, Z.; SAYAL, A.; KARAENREN, N.; DAGALP, K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. **Clin. Chem.**, v. 35, p. 569-572, 2002.

YU BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 139-162, 1994.

WIEACKER, P.; MUELLER, C.R.; MAYEROVA, A.; GRZESCHIK, K.H.; ROPERS, H.H. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. **Ann. Génét.**, v. 23, p. 73-77, 1980.

WILLIAMS, S.E. e WOLLUN, A.G. Effect of cadmium on soil bacteria and actinomycetes. In: **Journal of Environmental Quality**. v. 10, n. 2, p. 142-144, 1981.

ZAGATO, P.A.; ARAGÃO, M.A.; BURITINI, S.V.; ARAÚJO, R.P.A. Avaliação ecotoxicológica do reservatório do Guarapiranga, SP, com ênfase a problemática das algas tóxicas e algicidas. **IV Congresso Latino Americano de Ficologia**, p. 63-81, 1998.

ZAR, J.H. Bioestatistical analysis. Prentice-hall. New Jersey, p. 718, 1996.