

MARISTELA AZEVEDO

**O NITRITO, TÍPICO POLUENTE ORGÂNICO DE  
TANQUES DE PISCICULTURA, AFETA A  
OSMORREGULAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*)?**

Monografia apresentada para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas ao Departamento de Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Arruda de O. Freire

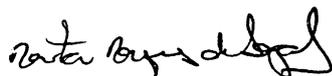
CURITIBA  
2003

**PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA  
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR**

Aos 21 dias do mês de fevereiro de 2003, a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da UFPR, composta pelas Dras Marta Marques de Souza da Universidade Estadual de Londrina, e Marisa Fernandes de Castilho, do Departamento de Fisiologia da UFPR, reuniu-se para proceder à avaliação da monografia "O nitrito, típico poluente orgânico de tanques de piscicultura, afeta a osmorregulação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)?" de autoria da acadêmica do Curso de Ciências Biológicas Maristela Azevedo. A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota 10 (conceito A).



Prof. Dra Carolina Arruda de Oliveira Freire  
(Orientadora)



Dra Marta Marques de Souza  
(Membro da Comissão)



Dra Marisa Fernandes de Castilho  
(Membro da Comissão)

Curitiba, 21 de fevereiro de 2003

## FICHA DE AVALIAÇÃO

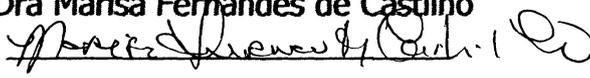
Aluna: Maristela Azevedo

Profa Orientadora : Carolina Arruda de Oliveira Freire

Disciplina: Estágio II (Departamento de Fisiologia)

Título da Monografia: O nitrito, típico poluente orgânico de tanques de piscicultura, afeta a osmorregulação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)?

Avaliador: Dra Marisa Fernandes de Castilho

Assinatura: 

Data: 21 de fevereiro de 2003

Nota da Avaliação: 10 (Dez)

Considero a monografia apresentada pela aluna de ótima qualidade. Portanto sou de parecer favorável à aprovação da aluna com nota 10 (dez).

## FICHA DE AVALIAÇÃO

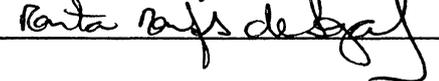
Aluna: Maristela Azevedo

Profa Orientadora : Carolina Arruda de Oliveira Freire

Disciplina: Estágio II

Título da Monografia: O nitrito, típico poluente orgânico de tanques de piscicultura, afeta a osmorregulação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)?

Avaliador: Dra Marta Marques de Souza

Assinatura: 

Data: 21 de fevereiro de 2003

Nota da Avaliação: 10,0 (dez)

A monografia da aluna apresenta redação clara e objetiva; os resultados estão bem apresentados e discutidos com base em literatura atual e específica. O trabalho é de grande relevância, trazendo considerável contribuição ao conhecimento da fisiologia de peixe em condições de estresse químico. Assim, atribuo nota 10,0 (dez).

À Deus  
À minha mãe, pelo exemplo de coragem e por sua luta  
**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

À todos os amigos que me apoiaram e incentivaram para a realização deste:

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina, minha orientadora, que sempre soube dar conselhos e orientar de forma compreensiva, branda e amiga.

Aos amigos e colegas de laboratório, Viviane, Valéria, Denilton, Ivonete, Clarice, Alessandra e Vitor pela ajuda, pela convivência e pelos momentos divertidos.

À Viviane pelas contribuições e ajuda no tratamento dos animais.

À Valéria, pela ajuda no tratamento dos animais.

Ao Denilton, por suas contribuições, ajuda na coleta e por suas palhaçadas.

À Ivonete, pelo seu otimismo e ao Vitor, por suas idéias e ajuda na coleta.

À professora Dr<sup>a</sup> Marta Marques de Souza (UEL), pelas várias contribuições e incentivo na realização deste trabalho e por participar da banca de avaliação.

À professora Dr<sup>a</sup> Marisa Fernandes, pela ajuda na obtenção dos animais, pelas contribuições e pela participação na banca.

Ao professor Ostrenski que cedeu os animais e ao Éder, que tornou possível a coleta.

Ao amigo Carlos (Tuta) que gentilmente me ajudou nos cálculos no computador.

À amiga Maria Elisa (Juju) pela breve e alegre companhia nos finais de semana e feriados de trabalho, pela convivência e por sua amizade sincera;

À amiga Katherinne (Kethy) minha irmãzinha do coração, sempre pronta a ajudar, apesar da distância.

À minha mãe (Matilde) e meus irmãos (Éder e Francielle), pela compreensão, apoio e incentivo.

E à todas as demais pessoas que amo... e aos animais, que foram sacrificados.

### **MÃOS DADAS**

Não serei o poeta de um mundo  
caduco.

Também não cantarei um mundo futuro.

Estou preso à vida e olho meus  
companheiros.

Estão tarcitumos mas nutrem grandes  
esperanças.

Entre eles, considero a enorme  
realidade.

O presente é tão grande, não nos  
Afastemos.

Não nos afastemos muito, vamos de  
mãos dadas.

(Carlos Drummond de Andrade)

## SUMÁRIO

	página
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	5
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	6
Retirada de Amostras de Sangue .....	8
Análise do Hematócrito .....	9
Dosagens de Metahemoglobina, Hemoglobina total, Desoxi-hemoglobina e Oxi-hemoglobina.....	9
Osmolalidade e Íons Plasmáticos .....	10
Análise Estatística .....	10
<b>4 RESULTADOS</b> .....	11
Concentração de Hemoglobina total .....	12
Porcentagem de Desoxi-hemoglobina .....	12
Porcentagem de Oxi-hemoglobina .....	13
Porcentagem de Metahemoglobina .....	13
Hematócrito .....	13
Osmolalidade .....	13
Concentração de íons cloreto no plasma .....	14
Concentração de Íons Magnésio .....	14
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	17
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	22
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	23

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Oreochromis niloticus</i> em aquário-estoque .....	6
<b>Figura 2:</b> Isolamento dos animais dos estímulos ambientais do laboratório .....	6
<b>Figura 3:</b> Anestesia de <i>Oreochromis niloticus</i> em solução benzocaína .....	8
<b>Figura 4:</b> Coleta de sangue de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	9
<b>Figura 5-A:</b> Concentração de Hemoglobina total em <i>Oreochromis niloticus</i> .....	15
<b>Figura 5-B:</b> Porcentagem de desoxi-hemoglobina em <i>Oreochromis niloticus</i> .....	15
<b>Figura 5-C:</b> Porcentagem de oxi-hemoglobina em <i>Oreochromis niloticus</i> .....	15
<b>Figura 5-D:</b> Porcentagem de metahemoglobina em <i>Oreochromis niloticus</i> .....	15
<b>Figura 5-E:</b> Volume de hematócrito em <i>Oreochromis niloticus</i> .....	15
<b>Figura 6-A:</b> Osmolalidade plasmática em <i>Oreochromis niloticus</i> .....	16
<b>Figura 6-B:</b> Concentração de íons cloreto em <i>Oreochromis niloticus</i> .....	16
<b>Figura 6-C:</b> Concentração de íons magnésio em <i>Oreochromis niloticus</i> .....	16

## RESUMO

O efeito agudo (48h) do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) sobre parâmetros sanguíneos - hematócrito (Hct), hemoglobina total (Hb Total), percentuais de desoxihemoglobina (Hb%), metahemoglobina (MetHb%), oxihemoglobina (Hb- $\text{O}_2\%$ ), e na regulação osmo-iônica do plasma, osmolalidade ([Osm]), concentração de cloreto ( $[\text{Cl}^-]$ ) e de magnésio ( $[\text{Mg}^{2+}]$ ) da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A possível reversão do efeito do  $\text{NO}_2^-$  também foi avaliada. Para os testes, utilizaram-se 2 lotes de *O. niloticus*, sendo, em ambos, estabelecidos um grupo controle e outro contaminado. A contaminação deu-se por diluição de  $\text{NaNO}_2$  (0,5 mM) na água dos aquários experimentais. No 1º lote, os animais foram testados por 48h, anestesiados e foram coletadas amostras de sangue. No 2º lote, foi estudada a reversão de efeito do  $\text{NO}_2^-$ : 48h com  $\text{NO}_2^-$  seguidas de 48h sem  $\text{NO}_2^-$ , n=8 para todos. Análise estatística: teste t de Student não-pareado ( $p < 0,05$ ). Controle (ctr) x contaminado (ctm): redução no Hct de  $34,13 \pm 2,35$  (ctr) para  $19,30 \pm 2,81$  (ctm), na Hb- $\text{O}_2\%$  de  $81,40 \pm 2,31$  (ctr) para  $46,84 \pm 7,61$  (ctm), e na  $[\text{Mg}^{2+}]$  de  $1,74 \pm 0,17$  mM (ctr) para  $1,17 \pm 0,13$  mM (ctm); e aumento na MetHb% de  $10,83 \pm 2,51$  (ctr) para  $46,79 \pm 8,00$  (ctm). Ctr com reversão (ctr r) x ctm com reversão (ctm r): redução na [Hb] total de  $3,31\text{E-}05 \pm 7,46$  (ctr r) para  $1,39 \pm 8,75$  (ctm r), Hct de  $27,57 \pm 6,34$  (ctr r) para  $9,07 \pm 2,04$  (ctm r), e na  $[\text{Mg}^{2+}]$  de  $1,39 \pm 0,09$  mM (ctr r) para  $0,64 \pm 0,07$  mM (ctm r); e aumento na MetHb% de  $2,65 \pm 1,44$  (ctr r) para  $17,71 \pm 5,14$  (ctm r). A reversão da contaminação gerou recuperação parcial da MetHb% e da Hb- $\text{O}_2\%$ , além da  $[\text{Mg}^{2+}]$ . *O. niloticus* foi sensível a 48h de exposição a 0,5 mM de  $\text{NaNO}_2$ , e recuperou-se em parte dos efeitos do poluente após 48 h. A osmolalidade e a  $[\text{Cl}^-]$  não foram afetadas, sugerindo moderada metahemoglobinemia. Houve efeito sobre a regulação de  $\text{Mg}^{2+}$ , talvez por ser o rim bastante exposto ao nitrito.

## 1 INTRODUÇÃO

A alta densidade de peixes em cultivos intensivos com sistemas de recirculação de água freqüentemente resulta em um aumento das concentrações ambientais de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), um produto oriundo de resíduos nitrogenados devido à incompleta oxidação da amônia a nitrato (ATWOOD *et al.*, 2001). O processo de nitrificação segue a seguinte fórmula:  $2 \text{NH}_3 + 3 \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{HNO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{Energia}$ . O ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) na água se dissocia, liberando o  $\text{NO}_2^-$ . Já o processo de desnitrificação, tem como fórmula:  $2 \text{HNO}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{HNO}_3 + \text{Energia}$ . Ambos os processos são dependentes de bactérias, nitrificantes e desnitrificantes, respectivamente. Um desbalanço nos processos de nitrificação e desnitrificação bacteriana gera acúmulo de  $\text{NO}_2^-$  no sistema aquático (GROSELL e JENSEN, 2000) principalmente em águas eutróficas. O nitrito é altamente tóxico para muitos vertebrados e invertebrados de água doce, sendo que, dentre os vertebrados, os peixes são especialmente sensíveis (BIANCHINI *et al.*, 1995; DOBLANDER e LACKNER, 1995).

O acúmulo de  $\text{NO}_2^-$  é uma das alterações mais críticas na qualidade da água em tanques de cultivo de peixes (HILMY *et al.*, 1986). O  $\text{NO}_2^-$  é oxidado a nitrato rapidamente; contudo, sua alta toxicidade para os peixes merece consideração, pois o  $\text{NO}_2^-$  é um forte formador de metahemoglobina (MetHb) a partir da hemoglobina (Hb). Neste processo, o  $\text{NO}_2^-$  oxida o íon ferro da Hb transformando-a em MetHb, a qual é incapaz de transportar o  $\text{O}_2$ . A formação da MetHb pode ocasionar a morte do peixe como resultado da hipóxia por diminuir a quantidade de Hb funcional (oxi-hemoglobina) nos eritrócitos e diminuir o hematócrito (Hct). A redução do Hct pode ser resultado da simples diminuição de volume eritrocitário devido à perda de  $\text{K}^+$  destas células, processo este induzido pela formação de MetHb (ADRAGNA e LAUF, 1998), ou pode ser devido à eliminação de eritrócitos não funcionais em decorrência da precipitação da hemoglobina no interior dos mesmos. Esta precipitação é devida à diminuição da solubilidade da Hb quando ocorre a diminuição de volume celular dos eritrócitos (JENSEN *et al.*, 1987). O  $\text{NO}_2^-$  entra no peixe dulcícola pelo sistema de absorção de  $\text{Cl}^-$  branquial, competindo com este pelo

sítio de ligação do sistema de co-transporte  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$ , podendo se concentrar no plasma em valores muito maiores que os do meio, bem como, penetrar em compartimentos teciduais, levando à hipóxia em órgãos vitais, como o fígado (JENSEN *et al.*, 1987).

Em um estudo com carpa (*Cyprinus carpio*), foi observado um acúmulo de  $\text{NO}_2^-$  no plasma destes animais após um período de 48h de exposição ao  $\text{NO}_2^-$  na água (JENSEN *et al.*, 1987). Essa acumulação acarretou em aumento bastante evidente do conteúdo de MetHb nos eritrócitos e redução do volume celular médio dos mesmos (redução no hematócrito). A Hb mostrou uma grande redução na afinidade pelo  $\text{O}_2$  e o  $\text{O}_2$  arterial decresceu para valores extremos. Contudo, a pressão parcial de  $\text{O}_2$  ( $\text{PO}_2$ ) no sangue aumentou, pelo aumento compensatório na ventilação. Houve redução na concentração de  $\text{Cl}^-$  plasmático; a concentração de bicarbonato diminuiu levemente e a de lactato plasmático aumentou de forma considerável. Quanto ao íon  $\text{K}^+$ , este teve a sua concentração plasmática aumentada em 94% - pelo aumento de sua saída das hemácias, revelando uma hipercalemia extracelular. Contudo, o  $\text{Na}^+$  plasmático sofreu redução, mantendo assim, a soma de ânions e cátions constante. O  $\text{Ca}^{2+}$  não variou e a osmolalidade plasmática permaneceu praticamente constante.

As respostas fisiológicas de parâmetros hematológicos de duas espécies neotropicais de peixes expostas à  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_2$  por um período de 96 horas foi estudado por MARTINEZ e SOUZA (2002). Neste trabalho foi observada uma diminuição no hematócrito e na concentração de Hb total e aumento na MetHb do curimba, *Prochilodus lineatus*, enquanto o lambari, *Astyanax altiparanae* mostrou-se mais tolerante, não exibindo variações nestes parâmetros. Ambas as espécies tiveram reduções nas concentrações de  $\text{Na}^+$  no plasma e de  $\text{K}^+$  dos eritrócitos, mas somente *P. lineatus* apresentou aumento na concentração de  $\text{K}^+$  plasmático. Em análises *in vitro*, a exposição durante 2 minutos ao  $\text{NaNO}_2$  causou diminuição do volume dos eritrócitos de *P. lineatus* em 36% e, em *A. altiparanae*, redução de 10%, corroborando a idéia de que o  $\text{NO}_2^-$  que entra nas células ocasiona a formação da MetHb e efluxo de  $\text{K}^+$ .

Experimentos com reversão da contaminação são relatados por dois trabalhos, ambos realizados com a carpa, *Cyprinus carpio*. No primeiro, foi observado que a exposição a 1 mM de  $\text{NaNO}_2$  por 48h pode ser reversível pela retirada dos animais da presença do contaminante, sendo que o mesmo pode ser eliminado, porém, em menor velocidade do que a sua taxa de captação. Mesmo após 46h de reversão, a  $[\text{NO}_2^-]$  permanecia alta (JENSEN et al., 1987). No outro trabalho, é relatada uma recuperação na metahemoglobinemia de carpa após 48h de exposição ao  $\text{NaNO}_2$  (2 mM) e colocadas em água sem  $\text{NO}_2^-$  por 5 dias de reversão. Não houve diferenças significativas nas concentrações de Hb total e de  $\text{NO}_2^-$  plasmático durante as reversões, porém, ocorreu diminuição do  $\text{K}^+$  do plasma neste período (KNUDSEN e JENSEN, 1997).

O efeito do  $\text{NO}_2^-$  sobre a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) já foi estudado, porém, relacionando apenas a toxicidade (concentração letal média) deste poluente ao tamanho dos exemplares, obtendo como resultado que indivíduos maiores foram mais sensíveis ao  $\text{NO}_2^-$  (ATWOOD et al., 2001). Os autores observaram ainda que a adição de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) ou cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) à água dos aquários experimentais reduziu a mortalidade dos animais, ou seja, diminuiu a toxicidade do  $\text{NO}_2^-$ .

*Oreochromis niloticus*, nativo da África, apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil. Sua introdução ocorreu em 1971 pelo DENOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas) no Nordeste do país na tentativa de investir na produção da ictiofauna dos açudes daquela região (GONÇALVES, 1993). Esta espécie é extensamente utilizada em piscicultura no mundo todo e em cultivos para repovoamento de lagoas e represas, devido às suas altas taxas de reprodução e crescimento. Além disso, as espécies do gênero *Oreochromis* toleram uma grande variedade de condições ambientais, como acidez, salinidade, temperatura, dentre outros fatores (AVELLA et al., 1993).

A tilápia do Nilo, assim como outros peixes de ambientes dulcícolas, possui concentração mais elevada de sal e moléculas orgânicas no seu sangue em relação à água. Para manter o seu meio interno (líquido extracelular, LEC)

mais concentrado do que a água são necessários sistemas de transporte de íons através do epitélio branquial para promover absorção do sal da água para o sangue. Tais sistemas são sempre dependentes direta ou indiretamente da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (HWANG *et al.*, 1989; VENTURINI *et al.*, 1992; AVELLA *et al.*, 1993). Para a homeostase, tanto estes sistemas presentes nas brânquias realizando absorção ativa, quanto os sistemas presentes no epitélio do túbulo renal, realizando reabsorção ativa de sais e osmólitos orgânicos presentes no filtrado glomerular, necessitam funcionar de forma eficiente para compensar a perda difusional (passiva) de íons que ocorre através do epitélio branquial, parede do corpo e urina, mesmo sendo a urina de teleósteos dulcícolas bastante diluída em relação ao sangue (HENTSCHEL e ELGER, 1989; JOBLING, 1995; EVANS, 1993; McCORMICK, 1995).

Para a manutenção das funções orgânicas em seus níveis normais, a homeostase do LEC é de fundamental importância, sendo que interferências na capacidade de regulação osmo-iônica do LEC afetarão o funcionamento das células do organismo. A homeostase do LEC pode ser potencialmente afetada pela adição de um contaminante na água ou ao sangue de um peixe. Assim, o efeito da contaminação por nitrito sobre a homeostase do LEC (osmolalidade e concentrações dos íons) deve ser estudado, uma vez que a tilápia do Nilo é uma das espécies mais trabalhadas na aquicultura por sua alta taxa reprodutiva, colaborando, dessa forma, por sua própria fisiologia, com o aumento da concentração de nitrito nos tanques. É importante monitorar também os parâmetros hematológicos (hematócrito e MetHb), de sensibilidade já amplamente demonstrada ao  $\text{NO}_2^-$  (HILMY *et al.*, 1986; JENSEN *et al.*, 1987; MARTINEZ e SOUZA, 2002). O nitrito, como já citado anteriormente, é um poluente limitante nos sistemas aquáticos e os peixes dulcícolas, dentre todos os animais aquáticos, estão entre os mais sensíveis (BIANCHINI *et al.*, 1995; DOBLANDER e LACKNER, 1995).

A literatura não possui nenhum dado sobre a osmorregulação da tilápia do Nilo exposta ao  $\text{NO}_2^-$ . A maioria dos trabalhos de outras espécies expostas a esse contaminante citam em termos iônico-regulatórios, principalmente, os teores plasmáticos de  $\text{K}^+$  e/ou  $\text{Cl}^-$  (KNUDSEN e JENSEN, 1997; ADRAGNA e

LAUF, 1998; MARTINEZ e SOUZA, 2002), sendo poucos os que relatam as concentrações de  $\text{Na}^+$  e/ou  $\text{Ca}^{2+}$  (JENSEN *et al.*, 1987; WILLIAMS e EDDY, 1987; MARTINEZ e SOUZA, 2002). Neste trabalho, atenção especial foi dada aos íons  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , uma vez o primeiro é captado pelas brânquias e o segundo, regulado pelos rins, permitindo assim, estudar parcialmente a funcionalidade destes órgãos osmorregulatórios após a exposição ao poluente. Pelos efeitos já relatados para outras espécies sobre os teores plasmáticos de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , podem-se esperar efeitos sobre a osmorregulação da tilápia do Nilo (JENSEN *et al.*, 1987; MARTINEZ e SOUZA, 2002). Com relação à reversibilidade, apenas duas literaturas relatam testes de reversão de efeito do  $\text{NO}_2^-$  (JENSEN *et al.*, 1987; KNUDSEN e JENSEN, 1997). Pela escassez de avaliações neste sentido e pela possibilidade de um manejo dos tanques focando o bem estar animal, torna-se interessante estudar a reversão do efeito do nitrito sobre as tilápias do Nilo.

Dada a frequência de ocorrência de contaminação pelo nitrito em tanques de piscicultura, a relevância da função da osmorregulação e a importância desta espécie no comércio de peixes cultivados, torna-se relevante trabalho. Ainda por estes mesmos motivos e pelos já relatados acima, é importante avaliar também a possível reversibilidade do efeito por contaminação por nitrito, o que poderia vir a indicar uma melhora na saúde de tilápias de tanques que chegassem a acumular níveis altos de nitrito por alguns dias.

## 2 OBJETIVOS

Através de bioensaios com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) verificar o efeito agudo (48h) do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) sobre os parâmetros sanguíneos - hemoglobina total (Hb total), percentual de metahemoglobina (MetHb), percentual de deoxihemoglobina (desoxi-Hb), percentual de oxi-hemoglobina (oxi-Hb) e hematócrito (Hct) - e sobre a regulação osmo-iônica do plasma através de leituras da osmolalidade e dosagens de cloreto e magnésio e a

possível reversibilidade do seu efeito (48h com  $\text{NO}_2^-$  seguidos de 48h sem  $\text{NO}_2^-$ ).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizados como modelos biológicos foram coletados na Fazenda Experimental do Canguiri-UFPR, no município de Pinhais, Paraná. As tilápias de aproximadamente 10 a 15 cm de comprimento total (Fig. 1) foram mantidas agrupadas em aquário-estoque de aproximadamente 70L durante a aclimação – mínimo de 5 dias antes de iniciar os experimentos.

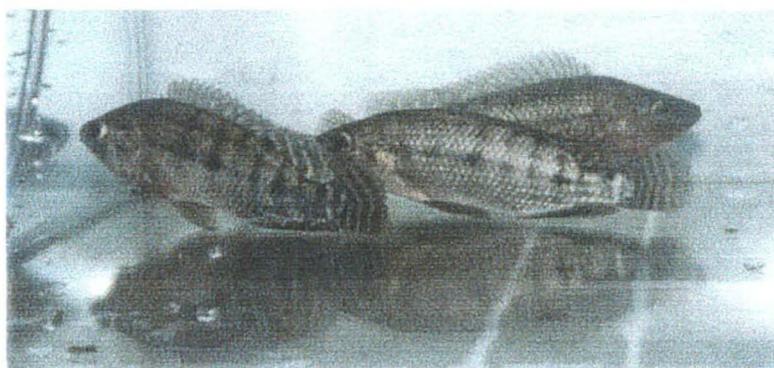


Figura 1. Exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mantidas em aquário-estoque no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.

Para os experimentos, as tilápias foram colocadas sozinhas em aquários de 20 L - para evitar que o estresse decorrente das interações sociais interferissem nas respostas (VOLPATO e FERNANDES, 1994) – e isoladas, através de cartolinas verdes, dos estímulos ambientais do laboratório (VOLPATO e BARRETO, 2001) (Fig. 2).

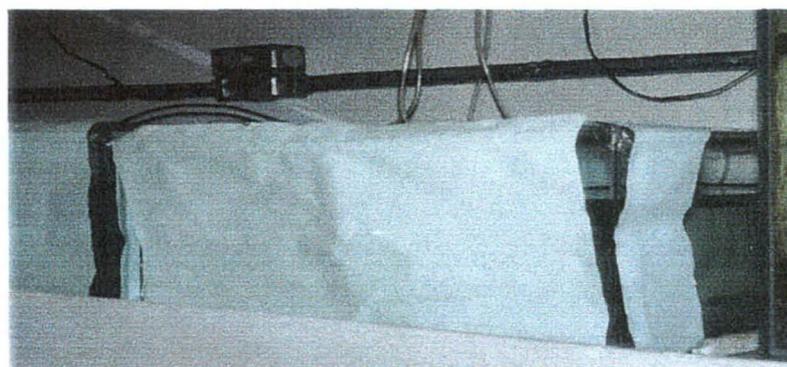


Figura 2. Cartolinas verdes ao redor dos aquários isolando os animais dos estímulos ambientais do Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.

Durante a aclimatação realizaram-se medidas diárias da temperatura e pH da água, seguidas por troca parcial (1/2) da água dos aquários. Foram mantidas também a aeração através de borbulhamento constante e a frequência alimentar, com fornecimento diário de ração em flocos para peixes tropicais (Alcon Basic®) logo após a troca da água dos aquários. Nos períodos experimentais, o mesmo procedimento foi realizado, com exceção da alimentação, a qual foi suprimida durante as 48h de exposição ao poluente. Foram realizadas 2 coletas - 2 lotes de tilápias do Nilo (*O. niloticus*), sendo o primeiro obtido em outubro e o segundo, em dezembro. Em ambos, foi estabelecido um grupo controle e outro contaminado, cada um com 8 animais testados. No 1º lote, os animais foram testados por 48h, anestesiados e foram coletadas amostras de sangue. No 2º lote foi estudada a reversão de efeito do  $\text{NO}_2^-$ : 48h com  $\text{NO}_2^-$  seguidas de 48h sem  $\text{NO}_2^-$ . A contaminação realizou-se pela diluição do sal nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) (concentração final de 0,5 mM) à água dos aquários experimentais. O tratamento dos controles do 1º lote consistiu na supressão da alimentação durante 2 dias e posterior sacrifício dos animais e, nos controles do 2º lote, após os 2 dias de jejum, as tilápias voltaram a receber alimento por mais 2 dias, para só então, serem sacrificadas. O mesmo seguiu-se para os animais contaminados, mas, para estes, foi adicionado 0,5 mM de  $\text{NaNO}_2$  (34,5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) durante dois dias de experimentação (dias de jejum), mantendo a cada dia, a concentração citada de  $\text{NaNO}_2$ . A concentração escolhida é citada na literatura ou se aproxima de valores citados pela mesma: rainbow trout (*Salmo gairdner*) foram expostas a 0,5 mM (34,5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) de  $\text{NaNO}_2$  (WILLIAMS e EDDY, 1987); *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus* foram contaminadas com 30  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_2$  (MARTINEZ e SOUZA, 2002); *Clarias lazera* foram expostas a 28  $\text{mg.L}^{-1}$  e 32  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_2$  (HILMY *et al*, 1987). Para o teste da reversibilidade do efeito do  $\text{NO}_2^-$ , toda a água dos aquários contaminados foi trocada após 48h de exposição ao  $\text{NO}_2^-$  e, assim como os seus respectivos controles, esses animais foram alimentados nas 48h seguintes. As trocas de água diárias tiveram o objetivo de evitar a acumulação de amônia e garantir que os prováveis efeitos que ocorressem no experimento fossem decorrentes da exposição ao  $\text{NaNO}_2$ .

As concentrações de  $\text{NO}_2^-$  foram analisadas em algumas amostras de água de cada experimento e foram determinadas pela reação do  $\text{NO}_2^-$  com sulfanilamida que, ao serem combinadas com N-1-naftil-etilenoamina-dihidroclorato, produzem coloração avermelhada e são lidas em espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda. Tais concentrações foram obtidas através de uma curva padrão feita a partir de soluções de concentrações conhecidas de  $\text{NaNO}_2$  (APHA, AWWA, WPC, 1981). Para a coleta, as tilápias foram anestesiadas com 10 mL de benzocaína diluída em etanol ( $80 \text{ mg.L}^{-1}$ ) acrescentada a um recipiente com 1 L de água (Fig. 3); as amostras de sangue foram retiradas e, em seguida, os peixes foram medidos quanto aos seus comprimentos padrão (CP) e total (CT). Os animais do lote 1 foram chamados de controles e contaminados sem reversão e os do 2º lote foram chamados de controle e contaminados com reversão para facilitar a compreensão à menção de cada grupo.



Figura 3. Exemplar de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sendo anestesiada em solução de benzocaína no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.

### **Retirada de Amostras de Sangue**

A amostra de sangue foi retirada da região sub-opercular, logo abaixo dos filamentos branquiais ou da veia caudal com o auxílio de seringa e agulha heparinizada (Fig.4). Uma pequena porção da amostra foi separada em capilar de vidro para determinação da porcentagem de hematócrito,  $2 \times 25 \mu\text{L}$  para as dosagens de metahemoglobina e o restante da amostra foi centrifugada por 5 min a  $2100 \text{ xg}$ , para obtenção de plasma.

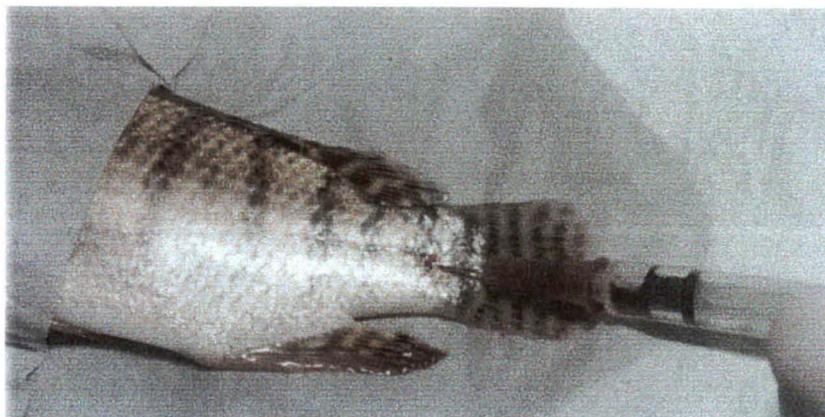


Figura 4. Exemplar de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetido à coleta de sangue no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.

### **Análise do Hematócrito**

O sangue recém retirado colocado em capilar de vidro foi centrifugado durante 5 min na micro-centrifuga de hematócrito Presvac. Após a centrifugação, o plasma foi separado das células e, através de uma escala da própria centrífuga determinou-se a porcentagem de células (hematócrito, Hct) em relação ao volume total de cada amostra.

### **Dosagens de metahemoglobina, hemoglobina total, desoxi-hemoglobina e oxi-hemoglobina**

As dosagens de MetHb foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por BENESCH *et al.*, (1973). O método consiste em leitura por espectrofotômetro de 25 µl de amostra de sangue diluída em 1,5 mL de tampão fosfato 35 mM (pH 7,3) em três comprimentos de onda diferentes (630, 576 e 560nm); as leituras foram realizadas em duplicata. Os resultados de cada comprimento de onda foram combinados em fórmulas, fornecendo assim, valores não apenas para a concentração de MetHb, mas também para as concentrações de desoxi-hemoglobina [deoxi-Hb] e oxi-hemoglobina [oxi-Hb]. Tais fórmulas, propostas por esses autores, foram obtidas através do Olivetti Underwood Programma 101e são as seguintes:

$$[\text{MetHb}] = (2,985 \times A_{630} + 0,194 \times A_{576} - 0,4023 \times A_{560}) \times 10^{-4};$$

$$[\text{deoxi-Hb}] = (1,373 \times A_{560} - 0,747 \times A_{576} - 0,737 \times A_{630}) \times 10^{-4};$$

$$[\text{oxi-Hb}] = 1,013 \times A_{576} - 0,3269 \times A_{630} - 0,7353 \times A_{560}) \times 10^{-4}.$$

Onde **A** é a absorvância obtida nos respectivos comprimentos de onda (em subscrito).

O somatório destas concentrações fornece a concentração de hemoglobina total ([Hb total]= [MetHb] + [deoxi-Hb] + [oxi-Hb]). Para as análises é usual expressar as respectivas concentrações em porcentagens.

### **Osmolalidade e íons plasmáticos**

A osmolalidade das amostras de plasma foi lida em micro-osmômetro Wescor 5520 VAPRO e, após estas leituras, foram diluídas com água deionizada, para determinação das concentrações de cloreto e magnésio. Para as dosagens de cloreto e magnésio utilizaram-se kits colorimétrico Labtest<sup>®</sup>. Os íons cloreto (diluição 1:3) reagem com o tiocianato de mercúrio na presença de nitrato férrico formando tiocianato férrico, com leitura de absorvância a 470 nm (Espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech); os íons magnésio (diluição 1:3) reagem com o magon sulfonado em meio alcalino, com leitura de absorvância a 505 nm.

### **Análise Estatística**

As médias de controles e experimentais para cada dosagem iônica foram comparadas através de testes t de Student não-pareado ( $p < 0,05$ ) utilizando-se o programa Sigma Plot<sup>®</sup> para Windows<sup>®</sup> 2.0 da Jandel Corporation.

As análises estatísticas compararam os grupos da seguinte forma:

- controle sem reversão (48h sem  $\text{NO}_2^-$  em jejum) x contaminado sem reversão (48h com  $\text{NO}_2^-$ ) (símbolo: \*);

- controle com reversão (48h com  $\text{NO}_2^-$  em jejum, seguido de 48h sem  $\text{NO}_2^-$ , com alimento) x contaminado com reversão (48h com  $\text{NO}_2^-$  e seguido de 48h sem  $\text{NO}_2^-$ , com alimento) (símbolo: \*\*);
- controle sem reversão (48h sem  $\text{NO}_2^-$  em jejum) x controle com reversão (48h com  $\text{NO}_2^-$  em jejum e seguido de 48h sem  $\text{NO}_2^-$  com alimento) (símbolo: #);
- contaminado sem reversão (48h com  $\text{NO}_2^-$ ) x contaminado com reversão (48h com  $\text{NO}_2^-$ , seguido de 48h sem  $\text{NO}_2^-$  e com alimento) (símbolo: #).

#### 4 RESULTADOS

Do total de 41 animais coletados, houve mortalidade de 4 animais antes da contaminação e 6 após a exposição ao poluente (3 após 1 dia e 3 após 2 dias). Um dos animais liberou ovos imaturos minutos antes da sua morte, após 1 dia de contaminação. As quantificações médias dos tamanhos dos animais, bem como, dos dados físico-químicos de temperatura e pH estão expressos na tabela abaixo:

	CP (cm)	CT (cm)	Temp. (°C)	pH
<b>Controle 48h s/ reversão</b>	10,76±0,51 (8)	13,33±0,65 (8)	24,76±0,47 (8)	7,36±0,05 (8)
<b>Contaminado 48h s/ reversão</b>	10,65±0,76 (8)	12,74±0,77 (8)	24,41±0,59 (8)	7,44±0,02 (8)
<b>Controle 48h c/ reversão</b>	11,43±0,59 (8)	14,39±0,75 (8)	26,79±0,23 (8) #	7,42±0,02 (8)
<b>Contaminado 48h c/ reversão</b>	11,94±0,54 (7)	14,89±0,68 (7)	26,5±0,25 (7) #	7,48±0,00 (7) **

Dados: média  $\pm$  DP; n, número de indivíduos ou medidas; significância estatística.

CP = comprimento padrão dos animais;

CT = comprimento total dos animais;

Temp. = temperatura da água dos aquários;

pH = pH da água dos aquários.

Foram encontradas diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) na temperatura entre os grupos controle (sem e com reversão) ( $p = 0,018$ ) e entre os contaminados (sem e com reversão) ( $p = 0,009$ ). Dentre as análises de pH, houve diferença significativa entre os grupos controle e contaminado com reversão ( $p = 0,024$ ). A contaminação dos aquários com 0,5 mM de  $\text{NaNO}_2$  resultou em aproximadamente 0,15 mM de  $\text{NO}_2^-$  livre na água durante a exposição ao poluente (medidas feitas antes da troca diária de água). Nos aquários expostos ao  $\text{NO}_2^-$  com reversão, após um dia da retirada do  $\text{NO}_2^-$ , as concentrações de  $\text{NO}_2^-$  caíram a zero, valores estes semelhantes aos encontrados para os controles. Abaixo seguem os resultados significantes encontrados para os demais parâmetros analisados.

#### **Concentração de hemoglobina total**

A contaminação com  $\text{NO}_2^-$  resultou em redução significativa na [Hb] total no grupo contaminado com reversão quando comparado com o seu controle ( $p = 0,037$ ), no controle com reversão em relação ao controle sem reversão ( $p = 0,021$ ), e no contaminado com reversão em comparação aos contaminado sem reversão ( $p < 0,001$ ) (Fig. 5-A).

#### **Porcentagem de desoxi-hemoglobina (em relação à [Hb] total)**

A porcentagem de desoxi-hemoglobina foi menor no grupo contaminado com reversão quando comparado ao seu controle ( $p = 0,006$ ) (Fig. 5-B).

### **Porcentagem de oxi-hemoglobina (em relação à [Hb] total)**

Redução estatística na concentração deste parâmetro foi encontrada ao se comparar o grupo contaminado sem reversão ( $p < 0,001$ ) em relação ao seu controle. Aumento foi observado ao se comparar o grupo controle com reversão em relação ao sem reversão ( $p = 0,009$ ), e contaminado com reversão em relação ao sem reversão ( $p = 0,006$ ) (Fig. 5-C).

### **Porcentagem de metahemoglobina (em relação à [Hb] total)**

A porcentagem de metahemoglobina foi maior no grupo contaminado sem reversão em comparação ao seu controle ( $p < 0,001$ ) e no contaminado com reversão em relação ao seu controle ( $p = 0,026$ ). Houve redução quando comparado o grupo controle com reversão com o grupo controle sem reversão ( $p = 0,018$ ) e o grupo contaminado com reversão com o contaminado sem reversão ( $p = 0,008$ ) (Fig. 5-D).

### **Hematócrito**

Redução no volume do Hct foi observada ao se comparar o grupo contaminado sem reversão com o seu controle ( $p = 0,002$ ), contaminado com reversão com o seu controle ( $p = 0,017$ ) e contaminado com reversão com contaminado sem reversão ( $p = 0,012$ ) (Fig. 5-E).

### **Osmolalidade do plasma**

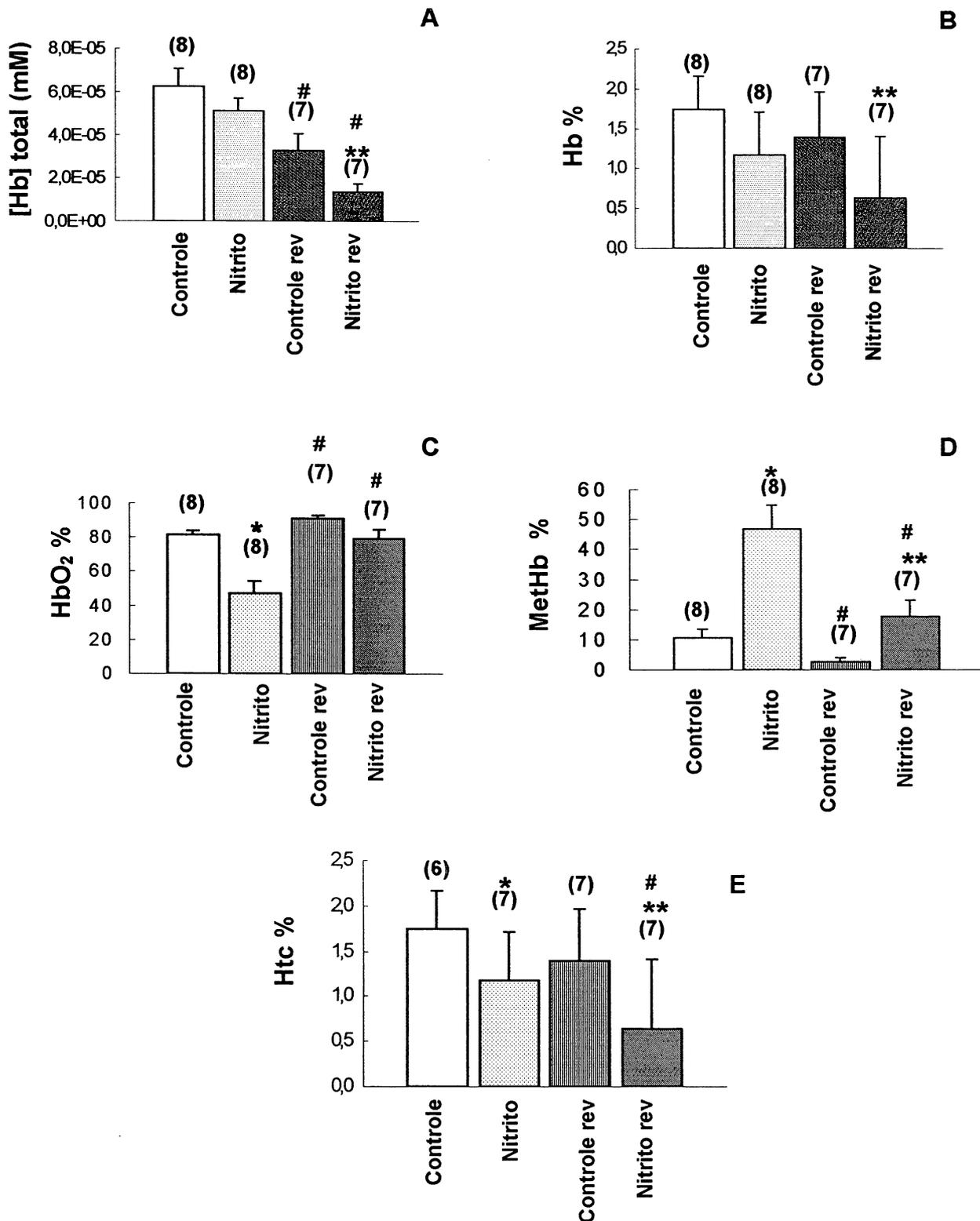
Verificou-se redução na osmolalidade no grupo controle com reversão quando comparado com o controle sem reversão ( $p = 0,010$ ) e no contaminado com reversão em relação ao contaminado sem reversão ( $p = 0,024$ ) (Fig. 6-A).

### **Concentração de íons cloreto no plasma**

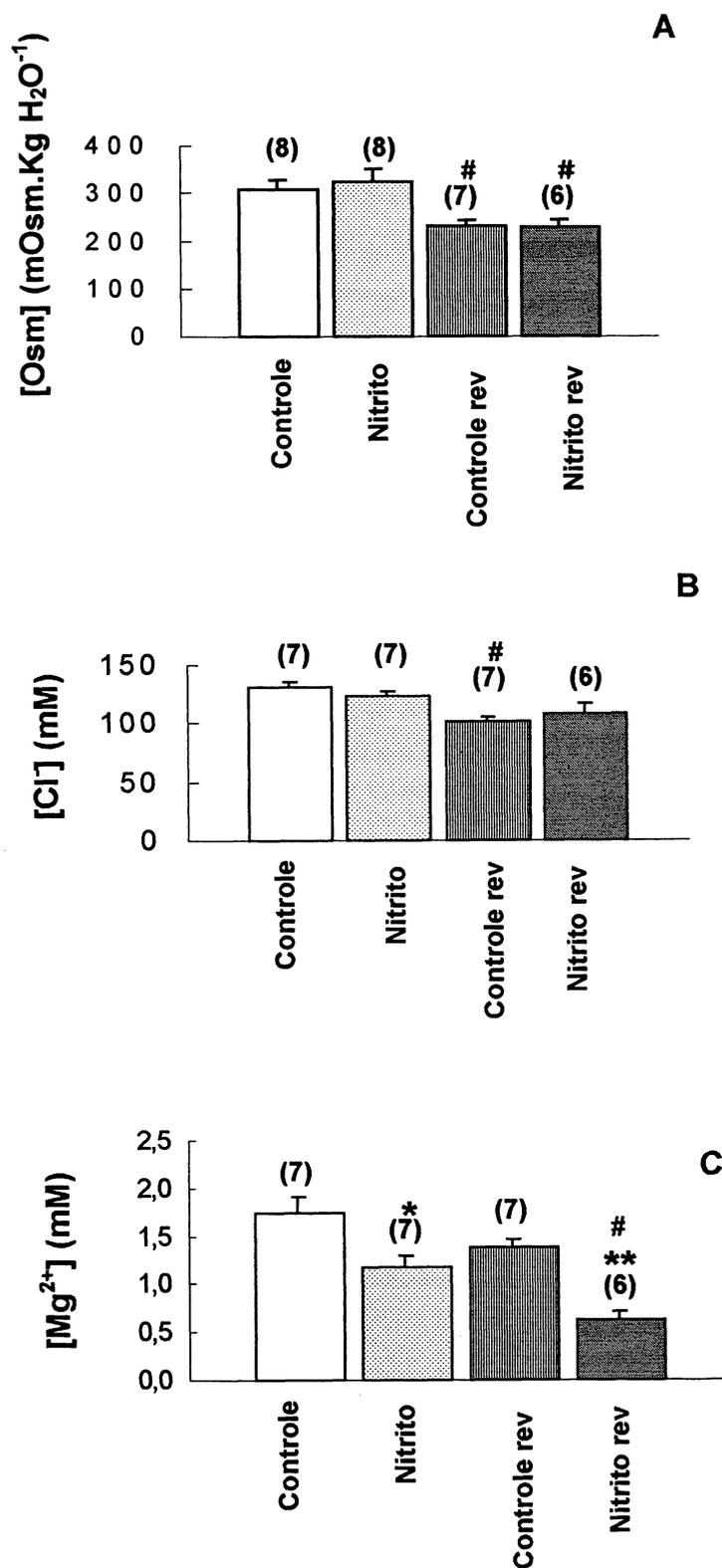
Foi observado redução estatisticamente significativa apenas no controle com reversão em relação ao controle sem reversão ( $p < 0,001$ ) (Fig. 6-B).

### **Concentração de íons magnésio no plasma**

Diminuição relevante foi observada ao se comparar o grupo contaminado sem reversão em relação ao seu controle ( $p = 0,019$ ), contaminado com reversão com o seu controle ( $p < 0,001$ ) e quando comparados o grupo contaminado com reversão em relação ao contaminado sem reversão ( $p = 0,004$ ) (Fig. 6-C).



**Figura 5:** Parâmetros sanguíneos da tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em situação controle ou contaminada com  $\text{NO}_2^-$  por 48h, sem ou com reversão (rev) da contaminação. **A:** concentração de hemoglobina total (mM), **B:** concentração de desoxi-hemoglobina %; **C:** concentração de oxi-hemoglobina %; **D:** concentração de metahemoglobina 5 e **E:** Hematócrito %. Número de animais utilizados indicado acima da barra de erro padrão. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ): \* - controle x nitrito; \*\* - controle rev x nitrito rev; # - controle x controle rev ou nitrito x nitrito rev.



**Figura 6:** Parâmetros osmorregulatórios da tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em situação controle ou contaminada com  $\text{NO}_2^-$  por 48h, sem ou com reversão (rev) da contaminação. **A:** osmolalidade plasmática,  $\text{mOsm.Kg H}_2\text{O}^{-1}$ ; **B:** concentração de cloreto plasmático, mM e **C:** concentração de magnésio plasmático. Número de animais utilizados indicado acima da barra de erro padrão. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ): \* - controle x nitrito; \*\* - controle rev x nitrito rev; # - controle x controle rev ou nitrito x nitrito rev.

## 5 DISCUSSÃO

A mortalidade inicial observada nos animais antes mesmo da contaminação pode ter sido devida ao estresse de captura, transporte e da própria aclimação dos animais. A concentração administrada de  $\text{NO}_2^-$  pode ter desencadeado a mortalidade das tilápias após 1 ou 2 dias de exposição ao poluente. Além da mortalidade foi observada uma liberação de ovos imaturos por um dos indivíduos minutos antes da sua morte, após 1 dia de contaminação, o que pode ter sido decorrente também do estresse à exposição ao contaminante. Nos animais contaminados, a exposição ao poluente (0,5 mM de  $\text{NaNO}_2$ ) ( $34,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) resultou em 0,15 mM ( $10,4 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de  $\text{NO}_2^-$  livre na água, sendo o restante provavelmente adsorvido pelos vidros dos aquários, coerente com o apresentado por MARTINEZ e SOUZA (2002). Segundo o artigo 4º da Resolução N° 020 do CONAMA, de 18 junho de 1986, os níveis máximos permitidos de  $\text{NO}_2^-$  na água são de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , cerca de 10 vezes menores do que a concentração livre na água obtida neste experimento. Contudo, em algumas regiões dentro de rios e sistemas dulcícolas podem-se encontrar grandes variações nas quantidades de nitrito e, principalmente, de nitrato, sendo possível a redução deste último a nitrito durante a passagem através do sistema digestivo (HECKMAN *et al.*, 1997). Porém, não se tem registro na literatura dos níveis médios de  $\text{NO}_2^-$  encontrado em tanques de piscicultura.

Em várias análises ([Hb] total, percentagem de oxi-Hb e de MetHb, bem como, osmolalidade e [Cl<sup>-</sup>]) encontrou-se diferença estatística ao se comparar os dois grupos controle: sem e com reversão, sendo a única diferença nos tratamentos destes grupos, o fato de que os animais do controle sem reversão estavam em jejum no dia do sacrifício, enquanto os do controle com reversão tinham passado por 2 dias de jejum seguidos de 2 dias com alimentação no momento do sacrifício. Esta diferença no tratamento pode ter sido responsável pelas diferenças nas variáveis. Deve ser considerado também que houve as diferenças de tamanho (embora insignificantes neste experimento) e temperatura (significativamente maiores nos grupos testes para a reversão) –

fatores que, dentre outros, regulam os períodos reprodutivos destes animais. De fato, ao se observarem as gônadas de alguns animais notou-se visivelmente maior maturação sexual dos indivíduos expostos à reversão do que em indivíduos sem reversão. Essa diferença deve-se à diferente época de coleta dos animais, sendo que o lote que foi submetido à reversão (2º lote) já se encontrava, mesmo no tanque, exposto à temperaturas mais altas, o que desencadeia a reprodução. Esses parâmetros (tamanho e temperatura), bem como, a época reprodutiva, poderiam incitar variabilidade responsiva nas análises realizadas com a tilápia do Nilo. A temperatura, por exemplo, pode atuar no metabolismo do peixe, influenciando, não apenas nos aspectos reprodutivos, mas também alimentares circulação e digestão. Provavelmente, o aumento da temperatura e/ou período reprodutivo ocasionou dentre os grupos controle redução nas concentrações de Hb total (hemólise), MetHb, osmolalidade e cloreto e acréscimo na percentagem de oxi-hemoglobina, porém, todos os grupos analisados mostraram-se heterogêneos para todas os testes realizados, o que pode ser decorrente da própria variabilidade intraespecífica de *O. niloticus*, uma vez que a manutenção de cada grupo ocorreu de forma idêntica.

A [Hb] total sofreu redução após 48h de exposição ao  $\text{NO}_2^-$  seguidas de 48h sem  $\text{NO}_2^-$  (com reversão), em relação ao controle. Este grupo contaminado com reversão apresentou os menores valores, levantando a hipótese que estes animais, mesmo após retirados da presença do  $\text{NO}_2^-$ , sofreram ainda uma queda em sua [Hb] total. O efeito de 48h com  $\text{NO}_2^-$  (sem reversão) não foi significativo, e percebe-se que a temperatura parece afetar este parâmetro, uma vez que mesmo para os controles houve redução (Fig. 5-A). Dois dias não foram suficientes para haver uma recuperação neste parâmetro sanguíneo. *Cyprinus carpio*, expostos a 2 mM de  $\text{NaNO}_2$  por 2 dias, após 3 dias de reversão (água sem nitrito) também não demonstraram recuperação na [Hb] total (KNUDSEN e JENSEN, 1997). A Hb possivelmente forma cristais no interior dos eritrócitos, devido à superação de sua solubilidade limite quando ocorre a diminuição de volume dos eritrócitos. Estas alterações das propriedades estruturais e funcionais dos eritrócitos podem causar um aumento

destas células na circulação e contribuir para o decréscimo da [Hb] total, verificada nos animais expostos ao nitrito (JENSEN *et al.*, 1987). O fato dos animais expostos ao  $\text{NO}_2^-$  sem reversão não apresentarem reduções significativas sugere ainda que o tempo de exposição não foi suficiente para uma redução relevante deste parâmetro. *Prochilodus lineatus* mostrou diminuição na [Hb] total após 24 h de exposição à  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_2$  ( $0,06 \text{ mM}$  de  $\text{NO}_2^-$  na água), enquanto que, para a espécie *Astyanax altiparanae* não ocorreu efeitos significantes do contaminante sobre esta variável, incitando ser esta espécie mais tolerante ao nitrito (MARTINEZ e SOUZA, 2002), o que poderia ser verdadeiro também para *O. niloticus* expostos a  $34,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_2$ .

Acompanhando a [Hb] total, houve diminuição na concentração percentual de desoxi-Hb no grupo contaminado com reversão em relação aos seus controles (Fig. 5-B). A concentração percentual de oxi-Hb foi menor no grupo exposto por 48h ao  $\text{NO}_2^-$  quando confrontado com seu controle. Este parâmetro foi sensível às 48h de reversão da contaminação, havendo retorno para os níveis dos controles (Fig. 5-C). Uma redução na afinidade da hemoglobina pelo  $\text{O}_2$  quando *Cyprinus carpio* é exposto a  $1 \text{ mM}$  de  $\text{NO}_2^-$  por 48h é citada pela literatura (JENSEN *et al.*, 1987). Além desta diminuição de afinidade, estes resultados de desoxi e oxi-hemoglobina sugerem que boa parte da hemoglobina que estaria livre foi transformada em metahemoglobina, como justificado pelo aumento de MetHb significativo nos grupos contaminados com  $\text{NO}_2^-$ , ainda presente após 48h de ausência de  $\text{NO}_2^-$  pós-contaminação (com reversão) (Fig. 5-D), porém com fortes indícios de recuperação. A metahemoglobinemia é citada por vários autores como resultado da exposição ao nitrito (HILMY *et al.*, 1986; JENSEN *et al.*, 1987; WILLIAMS e EDDY, 1987; JENSEN, 1990; DOBLANDER e LACKNER, 1995; BIANCHINI *et al.*, 1995; KNUDSEN e JENSEN, 1997; ADRAGNA e LAUF, 1998; GROSELL e JENSEN, 2000; e MARTINEZ e SOUZA, 2002). O retorno da percentagem de oxi-Hb após o período de 48h de reversibilidade significou que a MetHb foi transformada em Hb pela ação da enzima MetHb redutase e essa voltou a se ligar ao oxigênio. Quando a  $[\text{NO}_2^-]$  diminui, a atividade da MetHb redutase

aumenta e gera redução do conteúdo de MetHb para valores próximos aos do controle (KNUDSEN e JENSEN, 1997). Essa redução da quantidade de MetHb foi observada na carpa, *Cyprinus carpio* após exposição a 2 mM de  $\text{NaNO}_2$  por 2 dias e colocadas em água sem  $\text{NO}_2^-$  por 5 dias de reversão (KNUDSEN e JENSEN, 1997). Como os experimentos com a tilápia do Nilo foram realizados apenas com 2 dias de reversão não foi possível visualizar o decréscimo da MetHb até valores próximos ao controle. Seria preciso, portanto, uma repetição do experimento com um tempo maior de reversão. O hematócrito analisado mostrou decréscimo nos tratamentos contaminados com relação aos seus controles. O período de 2 dias de reversão não fez o Hct retornar aos valores controles, havendo redução adicional (Fig. 5-E). O Hct diminuiu como resultado da diminuição do tamanho das hemácias devido à perda de  $\text{K}^+$ , o que ocorre pela exposição ao nitrito (HILMY *et al.*, 1987; JENSEN *et al.*, 1987 e MARTINEZ e SOUZA, 2002).

A redução na osmolalidade verificada entre os grupos controles e entre os contaminados indica provavelmente uma relação com a temperatura ou época reprodutiva, ou mesmo retorno à alimentação, como já discutido, e ausência de efeito do  $\text{NO}_2^-$ . O mesmo ocorreu para o  $\text{Cl}^-$ , um dos dois principais osmólitos extracelulares, regulado pelas brânquias (EVANS, 1993; JOBLING, 1995). As menores concentrações de cloreto no plasma de rainbow trout (*Salmo gairdneri*) expostas ao nitrito em água doce foram relacionadas com uma estimulação da adrenalina ao efluxo de ânion pelas brânquias (WILLIAMS e EDDY, 1987). Reduções de íons cloreto balanceiam o aumento na  $[\text{NO}_2^-]$  e de lactato no plasma, como em *Cyprinus carpio* (JENSEN *et al.*, 1987). A diminuição na concentração do íon  $\text{Cl}^-$  balanceia os aumentos de outros ânions, incluindo  $\text{NO}_2^-$  e lactato (o qual aumenta quando os níveis de MetHb são maiores), tendendo assim, a manter a osmolalidade constante (JENSEN *et al.*, 1987). Contudo, o fato de não haver reduções de  $\text{Cl}^-$  neste trabalho, não é, de todo inesperada. Não foram encontradas variações também na  $[\text{Cl}^-]$  quando as concentrações plasmáticas de  $\text{NO}_2^-$  em *Platichthys flesus* foram de 0,35 mM (GROSELL e JENSEN, 2000). Estes autores sugerem que, provavelmente, houve a ocorrência de uma metahemoglobinemia moderada,

sem elevação no lactato plasmático. Apesar da [lactato], não ter sido medida no estudo aqui proposto, mas pelas semelhanças quanto ao  $\text{Cl}^-$ , sugere-se também um efeito de metahemoglobinemia moderada para as tilápias pela concentração utilizada de 0,5 mM de  $\text{NaNO}_2$  dissolvido na água.

Por fim, têm-se as variações no  $\text{Mg}^{2+}$  até agora não encontradas na literatura. A utilidade de se medir o  $\text{Mg}^{2+}$  reside no fato de íons bivalentes serem regulados pelos rins e não pelas brânquias (JOBILING, 1995). Houve decréscimo deste íon entre os grupos contaminados e seus respectivos controles e entre os contaminados entre si. Isso sugere que a exposição ao nitrito teve efeito sobre as concentrações de  $\text{Mg}^{2+}$ , não havendo recuperação de suas concentrações no período de reversão. Foram relatadas concentrações similares de  $\text{NO}_2^-$  na região anterior do intestino de *Platichthys flesus* e na água na qual o animal estava, sendo observado ainda que a  $[\text{NO}_2^-]$  vai diminuindo ao longo do trato intestinal, sendo possivelmente apreendido pelo epitélio intestinal (GROSELL e JENSEN, 2000). A eliminação do nitrito envolve vários mecanismos, incluindo efluxo através das brânquias, excreção pela urina e conversão endógena do nitrito a nitrato (KNUDSEN e JENSEN, 1997). Assim, os rins também conteriam uma quantidade de nitrito devido à filtração renal do sangue contaminado proveniente de todo o organismo, capturado pela região intestinal e pelas brânquias. O nitrito poderia afetar a função renal e inibir a reabsorção do íon magnésio no túbulo renal nas tilápias, o que justificaria os valores menores de magnésio neste animal em relação aos controles.

A conscientização do piscicultor de tilápias do Nilo sobre os possíveis danos do  $\text{NO}_2^-$  ao bem estar destes animais – muitas vezes só identificada pela mortalidade – é de extrema importância para um manejo adequado dos tanques com relação ao aproveitamento de águas recirculadas e da capacidade de suporte do mesmo, garantindo, assim, boa produtividade.

## 6 CONCLUSÕES

A tilápia do Nilo (*Oreochromis nilotus*), mostrou-se susceptível à exposição aguda a 0,5 mM de NaNO<sub>2</sub>, o que ficou evidente pela análise dos parâmetros sanguíneos. A exposição ao NO<sub>2</sub><sup>-</sup> não afetou a osmorregulação – questão principal deste estudo - e nem a [Cl<sup>-</sup>], regulado pelas brânquias, que, junto com o Na<sup>+</sup> é principal osmólito extracelular. O fato das concentrações de íons cloreto não terem sofrido mudanças indicam uma metahemoglobinemia moderada.

A reversibilidade do efeito do nitrito após 48h de retirada do contaminante foi detectada pela diminuição da metahemoglobina e aumento da oxi-hemoglobina. Um efeito sobre a hiper-regulação dos íons magnésio foi evidenciada, provavelmente por ser o rim um dos órgãos responsáveis pela eliminação do nitrito e responsável pela regulação plasmática de Mg<sup>2+</sup>, permanecendo esse órgão mais tempo exposto a este contaminante, o que resultou em não recuperação nos níveis deste cátion.

Este trabalho apresentou como novidades as avaliações do efeito do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> sobre parâmetros fisiológicos da tilápia do Nilo, espécie bastante importante na aquicultura mundial, focando a osmorregulação, a regulação iônica e a reversibilidade do efeito desse contaminante.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRAGNA, N. C., LAUF, P.K., 1998. Role of nitrite, a nitric derivate, in K-Cl cotransport activation of low-potassium sheep red blood cells. *J. Membrane Biol.* 166: 157-167.
- APHA, AWWA, WPC., 1981. Standard methods for the examination of water and waste water, 419. Nitrogen (Nitrite) 15<sup>th</sup>.ed. APHA, Washington, DC.
- ATWOOD, H. L., FONTENOT, Q. C., TOMASSO, J.R., 2001. Toxicity of nitrite to Nile tilapia: Effect of fish size and environmental chloride. *North Am. J. Aquacult.* 63 (1): 49-51.
- AVELLA, M., BERHAUT, J., BORNANCIN, M., 1993. Salinity tolerance of two tropical fishes, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. I. Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. *J. Fish Biol.* 42: 243-254.
- BENESH, R.E, BENESH, R., YUNG, S., 1973. Equations for the espectrometric analysis of hemoglobin mixtures. *Analytical Biochem.* 55: 245-248.
- BIANCHINI, A., WASIELESKY JR., W., MIRANDA FILHO, K. C., 1995. Toxicity of compounds to juveniles of Flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 453-459.
- DOBLANDER, C., LACKNER, R., 1996. Metabolism and detoxication of nitrite by trout hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1289: 270-274.
- EVANS, D.H., 1993. Osmotic and ionic regulation. Em: EVANS, D.H. (Ed.) *The Physiology of Fishes*. Marine Science Series. CRC Press, Boca Raton. Chapter 11: 315-337.
- GONÇALVES, E., 1993. Estratégias territoriais e reprodutivas da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). UNESP, dissertação de mestrado.
- GROSELL, M., JENSEN, F. B., 2000. Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology* 50:97-107.
- HECHMAN, C. W., CAMPOS, J. L. E., HARDOIM, E. L., 1997. Nitrite Concentration in well water from Poconé, Mato Grosso, and its relationship to public health in rural Brazil. *Environ. Contam. Toxicol.* 58: 8-15.
- HENTSCHEL, H., ELGER, M., 1989. Morphology of glomerular and aglomerular kidneys. Em: KINNE, R.K.H. (Ed.) *Structure and Function of the Kidney*. Karger, Basel. *Comp. Physiol.* 1: 1-72

- HILMY, A. M., EL-DOMIATY, N. A., WERSHANA, K., 1986. Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias Lazera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C: 247-253.
- HWANG, P.P., SUN, C.M., WU, S.M., 1989. Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na-K-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. *Mar. Biol.* 100: 295-299.
- JENSEN, F. B., ANDERSEN, N. A., HEISLER, N., 1987. Effect of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol. B* 157: 533-541.
- JENSEN, F. B., 1990. Nitrite and red cell function in carp: control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methahemoglobin formation. *J. Exp. Biol.* 152: 149-166.
- JOBLING, M., 1995. Osmotic and ionic regulation – water and salt balance. Em: JOBLING, M. *Environmental Biology of Fishes*. Fish and Fisheries Series vol 16. Chapman & Hall, London. Chapter 7: 211-249.
- KNUDSEN, P. K., JENSEN, F. B., 1997. Recovery from nitrite –induced methahemoglobinaemia and potassium balance disturbances in carp. *Fish Physiol Biochem* 16:1-10.
- MARTINEZ, C. B. R., SOUZA, M. M., 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 133A:151-160.
- MCCORMICK, S.D., 1995. Hormonal control of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell function. Em: WOOD, C.M., SHUTTLEWORTH, T.J. (Eds). *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*. Fish Physiology Series, vol. 14. Academic Press, San Diego. Chapter 11: 285-315.
- VENTURINI, G., CATALDI, E., MARINO, G., PUCCI, P., GARIBALDI, L., BRONZI, P., CATAUDELLA, S., 1992. Serum ions concentration and ATPase activity in gills, kidney and oesophagus of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Pisces, Perciformes) during acclimation trials to fresh water. *Comp. Biochem. Physiol.* 103A: 451-454.
- VOLPATO, G. L., FERNANDES, M. O., 1994. Social control fo growth in fish. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27: 797-810.
- VOLPATO, G.L., BARRETO, R. E., 2001. Enviromental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 34: 1041-1045.
- WILLIAMS, M., EDDY, F. B., 1987. Some effects of adrenaline on ion transport and nitrite-induced methahemoglobin formation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Exp. Zool.* 241:269-273.