

Universidade do Algarve

U.C.T.R.A.

(Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos)

**Efeito de Nitritos na Actividade da Redutase da
Metahemoglobina em *Halobatrachus didactylus*
e *Sparus aurata***

Relatório de Estágio do Curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas

Jaime Miguel Costa Aníbal

Faro

1995

O conteúdo deste relatório é da exclusiva responsabilidade do autor.

de de 1995

(Jaime Miguel Costa Aníbal)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível mediante o apoio e colaboração de diversas pessoas e entidades, merecedoras por isso do meu profundo reconhecimento. Em especial, pela importância relevante na execução deste trabalho, devo salientar:

A Prof^a. Josefina Coucelo, orientadora científica do estágio, pela disponibilidade de tempo e conhecimentos, bem como pela forma amigável e empenhada com que sempre me apoiou e incentivou, contribuindo assim, determinantemente para o resultado final do trabalho.

O Prof. Manuel Bicho e Dr^a. Maria Helena Franco, pela ajuda na aprendizagem e montagem do método, pela bibliografia cedida e pela enorme paciência com que me esclareceram as dúvidas, que surgiram durante a realização deste trabalho.

O Prof. Abílio Marques da Silva, o Prof. Adelino Canário e a Dr^a. Ana Barbosa, pela orientação crítica e construtiva.

A Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos da Universidade do Algarve, pela forma rápida e eficiente na disponibilização das instalações e material laboratorial, especialmente a Dr^a. Filomena.

Os Laboratórios de Genética e Química Fisiológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, pela forma simpática e prestável que demonstraram na disponibilidade das instalações e material laboratorial.

A Natércia Joaquim, pela forma como se prontificou a ajudar no trabalho laboratorial e na redação deste relatório.

A Prof^a. Margarida Castro e Prof. Karim Erzini, pelos conselhos sobre o tratamento estatístico deste trabalho.

A Dr^a. Raquel Machás, pelo inestimável apoio principalmente, pela forma preocupada e paciente com que sempre se prontificou a auxiliar.

O Ricardo Martins, pelas excelentes digitalizações das figuras das espécies utilizadas neste trabalho.

O Ricardo e D. Maria Emília, pela hospitalidade com que me receberam durante a estada em Lisboa.

A todos os meus colegas e amigos que me incentivaram, especialmente aqueles que me acompanharam em memoráveis momentos, ajudando-me nesta importante e construtiva etapa de vida na Universidade do Algarve, não podendo deixar de referir o Dr. João Pedro.

E por fim, mas não em último, gostava de salientar os meus pais e avós, pelo apoio inestimável que sempre me deram e a quem dedico este estágio.

RESUMO

No presente estudo determinou-se a actividade *in vitro* da redutase da metahemoglobina, na ausência e presença de nitritos, em duas espécies de teleósteos marinhos de habitats e comportamentos diferentes. *Halobatrachus didactylus* é uma espécie costeira bentónica, sedentária e solitária; *Sparus aurata* é uma espécie costeira não-bentónica, migradora e gregária. Determinaram-se a constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima (V_{max}) da redutase da metahemoglobina através do método directo de Eisenthal e Cornish-Bowden. A determinação da actividade da redutase da metahemoglobina baseia-se no princípio de que o sistema enzimático da redutase da metahemoglobina tem também, uma elevada actividade como redutase do ferricianeto. Na ausência de nitritos, *Halobatrachus didactylus* apresentou valores mais elevados de actividade enzimática ($38.9 \mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$) do que *Sparus aurata* ($27.8 \mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$). Nas mesmas condições, a redutase de *Halobatrachus didactylus* apresentou, para ambos os substratos, valores superiores de K_M (ferricianeto de potássio: 0.133mM ; NADH: 0.067mM) e inferiores de V_{max} (ferricianeto de potássio: 0.097min^{-1} ; NADH: 0.025min^{-1}) em relação à *Sparus aurata* (ferricianeto de potássio: $K_M=0.092\text{mM}$, $V_{max}=0.176\text{min}^{-1}$; NADH: $K_M=0.032\text{mM}$, $V_{max}=0.062\text{min}^{-1}$). Os resultados deste estudo indicaram que, na ausência de nitritos, a redutase da metahemoglobina de *Halobatrachus didactylus* apresentou uma maior eficiência antioxidativa, embora a de *Sparus aurata* tenha apresentado uma maior sensibilidade à presença de baixas concentrações de metahemoglobina. A actividade da redutase da metahemoglobina de *Halobatrachus didactylus* diminuiu com concentrações crescentes de nitritos. No caso de *Sparus aurata*, não se observaram variações da actividade enzimática na presença de nitritos.

ABSTRACT

In vitro activity of the methaemoglobin reductase was determined, in the presence and absence of nitrite, in two marine fishes with different habitats and behaviours (*Halobatrachus didactylus* and *Sparus aurata*). The K_M and V_{max} were determined through the Eisenthal and Cornish-Bowden Plot. The basis for this study is that the methaemoglobin reductase system has very active ferricyanide reductase activity. In the absence of nitrite, *Halobatrachus didactylus* showed higher values of methaemoglobin reductase activity ($38.9 \mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$), than *Sparus aurata* ($27.8 \mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$). In the same conditions, the reductase of *Halobatrachus didactylus* had, for both substrates, higher values of K_M (potassium ferricyanide: 0.133 mM ; NADH: 0.067 mM) and lower values of V_{max} (potassium ferricyanide: 0.097 min^{-1} ; NADH: 0.025 min^{-1}), than *Sparus aurata* (potassium ferricyanide: $K_M=0.092 \text{ mM}$, $V_{max}=0.176 \text{ min}^{-1}$; NADH: $K_M=0.032 \text{ mM}$, $V_{max}=0.062 \text{ min}^{-1}$). The results indicated that, in the absence of nitrite, *Halobatrachus didactylus*'s methaemoglobin reductase had high antioxidant efficiency, although the one of *Sparus aurata* had more sensitivity to the presence of low concentrations of methaemoglobin. *Halobatrachus didactylus*'s methaemoglobin reductase activity decreased in the presence of nitrite. In *Sparus aurata*, the nitrite didn't induced significant variations in the methaemoglobin reductase activity.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1 ESPÉCIES EM ESTUDO	1
I.2. ERITRÓCITOS E A HEMOGLOBINA.....	2
I.3. REDUTASE DA METAHEMOGLOBINA.....	5
I.4. OBJECTIVO	6
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
II.1. REAGENTES	8
II.2. APARELHOS UTILIZADOS	8
II.3. AMOSTRAS.....	8
II.4. ACTIVIDADE DA REDUTASE DA METAHEMOGLOBINA.....	9
II.5. INCUBAÇÃO IN VITRO DOS ERITRÓCITOS COM NITRITO DE SÓDIO	12
II.6. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS.....	12
II.7. MÉTODOS ESTATÍSTICOS	13
III. RESULTADOS	14
III.1 RELAÇÃO ENTRE A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA E O PESO DOS INDIVÍDUOS	14
III.2. COMPARAÇÃO ENTRE AS DUAS ESPÉCIES	17
III.3. EFEITO DOS NITRITOS.....	23
IV. DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32

ANEXO

I. INTRODUÇÃO

I.1 Espécies em estudo

Este estudo incidiu sobre duas espécies de teleósteos marinhos: *Halobatrachus didactylus* e *Sparus aurata*.

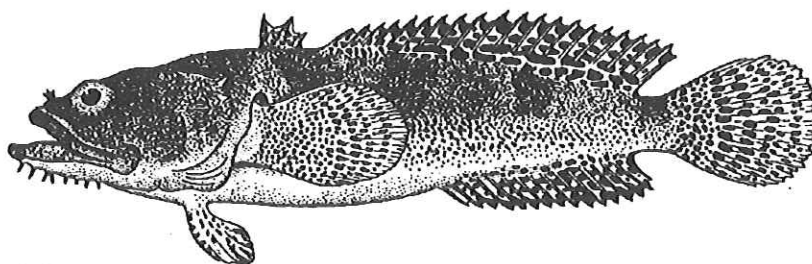


Figura 1: Ilustração de um indivíduo da espécie *Halobatrachus didactylus* (ROUX, 1986).

Halobatrachus didactylus (Schneider, 1801) pertence à Família Batrachoididae, sendo vulgarmente conhecida, no Algarve, por Encharroco (MUZAVOR *et al.*, 1993).

Esta espécie apresenta: corpo robusto; cabeça grande e achatada; olhos situados no bordo superior da cabeça e bem afastados; narinas anteriores tubulares terminando em tentáculos pouco desenvolvidos; boca larga, com 3 fiadas de dentes na região anterior; maxila inferior com 1 série de filamentos cutâneos no bordo ventral; bordo superior do opérculo com 2 espinhos curtos; subopérculo com 1 espinho; barbatanas peitorais largas e quase atingindo a origem da barbatana anal; barbatanas pélvicas implantadas anteriormente em relação às barbatanas peitorais (ROUX, 1986).

A distribuição geográfica da espécie *Halobatrachus didactylus* estende-se pelo Atlântico, desde o Golfo da Biscaia até à costa do Gana, incluindo a Madeira, Mediterrâneo ocidental e Mar Adriático (ROUX, *op. cit.*).

Halobatrachus didactylus é uma espécie bentónica, de comportamento sedentário e solitário, vivendo sobre fundos arenosos ou vasosos, muitas vezes parcialmente enterrada ou abrigada sob rochas (ROUX, 1986). A espécie *Halobatrachus didactylus* foi classificada por ANDRADE (1986 *in* CALVÁRIO, 1986) como sendo uma espécie permanente da Ria Formosa, porque se encontra sempre presente nesta, para a sua reprodução, crescimento e alimentação.

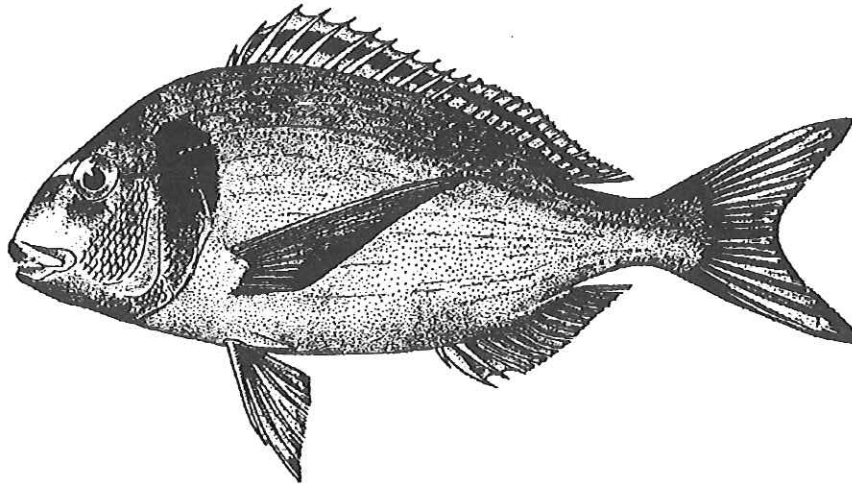


Figura 2: Ilustração de um indivíduo da espécie *Sparus aurata* (BAUCHOT & HUREAU, 1986).

Sparus aurata (Linnaeus, 1758) pertence à Família Sparidae, sendo vulgarmente conhecida, no Algarve, por Dourada ou Safata (MUZAVOR *et al.*, 1993).

Esta espécie apresenta: corpo oblongo; pré-opérculo sem escamas; maxila com 4-6 dentes caninos, seguidos de 2-4 fiadas de dentes que, progressivamente, se tornam molariformes; as 2 fiadas externas de molares são mais desenvolvidas; mancha negra na origem da linha lateral; barra dourada curva entre os olhos (BAUCHOT & HUREAU, 1986).

A distribuição geográfica de *Sparus aurata* estende-se pelo Atlântico, desde as Ilhas Britânicas até Cabo Verde, incluindo as Canárias, e por todo o Mediterrâneo, sendo pouco abundante no Mar Negro (BAUCHOT & HUREAU, *op. cit.*).

Sparus aurata é uma espécie de habitat costeiro não-bentónico, migradora e de hábitos gregários. Os juvenis entram na Ria Formosa a partir de Abril, e migram para o mar a partir de Outubro-Novembro. Esta espécie ocorre em zonas de fundo arenoso ou de fanerogâmicas marinhas, podendo ser encontrada em zonas de água salobra (espécie eurihalina) (MUZAVOR *et al.*, 1993).

I.2. Eritrócitos e a hemoglobina

O sangue é o elemento mais acessível no sistema de líquidos orgânicos do organismo dos teleósteos. Consequentemente, as variáveis hematológicas são usadas geralmente como indicadores directos ou indirectos do estado fisiológico do organismo (KORCOCK *et al.*, 1988).

O sangue dos teleósteos, tal como o sangue humano, é constituído por uma mistura de duas fases: o plasma (fase líquida), e uma fase sólida constituída por células com funções diversas.

O plasma funciona como meio de transporte tanto da fase sólida, como de uma série de substâncias nele dissolvidas (ex: nutrientes, alguns gases, produtos de excreção).

As células que constituem a fase sólida do sangue podem ser divididas em três grupos: leucócitos, eritrócitos e trombócitos. Os leucócitos constituem o mecanismo de defesa do organismo face à acção de agentes patogénicos. Os eritrócitos têm como principal função o transporte dos gases relacionados com o metabolismo (oxigénio e dióxido de carbono). Este transporte deve-se à existência de moléculas de hemoglobina no seu citoplasma. Os trombócitos estão envolvidos no processo de coagulação do sangue.

Nos teleósteos, os eritrócitos podem ser formados em três órgãos diferentes: o baço, o intestino e os rins. Em qualquer dos casos, durante o processo ontogénico, os eritrócitos passam por uma série de etapas: os proeritroblastos perdem progressivamente RNA do citoplasma; o seu núcleo torna-se mais denso e a forma da célula muda de esférica para elíptica (FÄNGE, 1986). A síntese da hemoglobina ocorre na fase final da maturação que geralmente decorre quando os eritrócitos já se encontram na circulação sistémica. Ao contrário dos mamíferos, os teleósteos apresentam eritrócitos maduros nucleados (FÄNGE, *op. cit.*).

Os teleósteos sendo animais poiquilotérmicos, estão sujeitos a grandes variações da temperatura interna. Essas variações influenciam as taxas metabólicas e conseqüentemente a necessidade de oxigénio; a existência de vários tipos de hemoglobinas, com diferentes propriedades funcionais (sensíveis e não-sensíveis à variação do valor de pH), constitui uma adaptação fisiológica importante (RIGGS, 1970; DI PRISCO & TAMBURRINI, 1992).

A hemoglobina é constituída por quatro grupos prostéticos ferrosos (grupos heme) ligados por uma proteína (globina). A globina é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, duas α e duas β enroladas sobre si próprias, contendo cada uma no seu interior um grupo heme, e ocupando no espaço os vértices de um tetraedro regular (*vide* Figura 3).

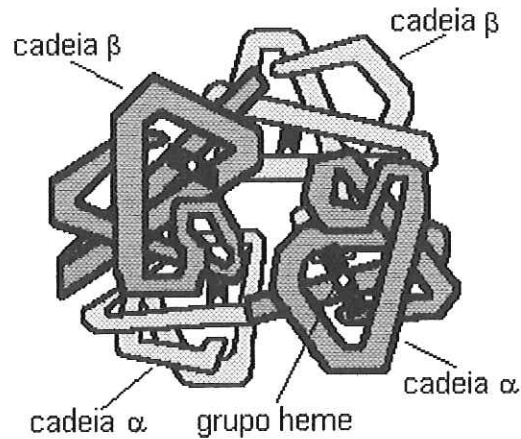


Figura 3: Esquema da estrutura quaternária da hemoglobina (adaptada de LEHNINGER, 1981).

A globina através da sua conformação, não só controla a afinidade da ligação do oxigénio ao grupo heme, como também faz com que essa ligação seja reversível (VOET & VOET, 1990).

Os grupos heme são estruturas policíclicas (porfirinas) com um átomo de ferro no centro, o que confere ao sangue a sua cor vermelha característica. Quando o ferro do grupo heme se encontra no estado ferroso (Fe^{2+}), a hemoglobina é funcional, podendo estar sob a forma de oxihemoglobina ou desoxihemoglobina.

No caso dos teleósteos, a oxihemoglobina transporta o oxigénio das brânquias para os tecidos. Por possuir quatro grupos heme, cada molécula de hemoglobina pode transportar quatro molécula de oxigénio. O metabolismo celular consome oxigénio e liberta dióxido de carbono, o qual em presença de água se dissocia formando hidrogenocarbonato e prótons:



O hidrogenocarbonato é transportado, dos tecidos para as brânquias, dissolvido no plasma. Os prótons são captados pelos grupos heme, formando-se a desoxihemoglobina.

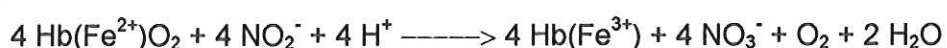
A hemoglobina, além da função de transporte de gases para os tecidos, funciona também como sistema tampão do pH do sangue, podendo ainda servir para ceder rapidamente oxigénio para a bexiga natatória ou para a coroideia do olho (DI PRISCO & TAMBURRINI, 1992).

Quando o ferro do grupo heme está no estado férrico (Fe^{3+}) a hemoglobina não é funcional, designando-se por metahemoglobina (LEHNINGER, 1981).

I.3. Redutase da metahemoglobina

A passagem de hemoglobina a metahemoglobina deve-se geralmente à acção de agentes oxidantes, os quais podem ser intrínsecos ou extrínsecos aos organismos.

Os nitritos (NO_2^-) são ambientalmente um dos agentes oxidantes mais relevantes, podendo ser originados por matéria orgânica em decomposição, ou por desequilíbrios nos processos de nitrificação-desnitrificação das aquaculturas (EDDY & WILLIAMS, 1987). Os teleósteos, quando sujeitos à presença de nitritos, apresentam no sangue concentrações deste ião mais elevadas que as do ambiente (JENSEN *et al.*, 1987). A forma como os nitritos são incorporados pelos teleósteos marinhos é ainda pouco conhecida, mas a hipótese mais aceitável é a de que entram no organismo sob forma de ácido nitroso (HNO_2). Os nitritos existentes na água combinam-se com protões (H^+) e originam HNO_2 . Este ácido é lipossolúvel o que lhe permite entrar através das membranas das células epiteliais das brânquias. Dentro do organismo o HNO_2 dissocia-se em H^+ e NO_2^- , estando esta reacção dependente do pH da água do mar e do sangue (LEWIS & MORRIS, 1986). Uma vez no plasma, pensa-se que os nitritos entram nos eritrócitos por transporte conductivo. Esta entrada estará dependente do grau de oxigenação e pH dos eritrócitos (JENSEN, 1990). Dentro dos eritrócitos, os nitritos vão induzir a formação de metahemoglobina (EDDY & WILLIAMS, 1987), através de uma série de reacções intermédias envolvendo radicais livres. A oxidação do grupo heme é mediada pelo radical NO_2^- , segundo a reacção descrita por KOSAKA e TYUMA (1987 *in* JENSEN, 1993):



Segundo LEWIS e MORRIS (1986), normalmente, cerca de 10% da hemoglobina dos teleósteos encontra-se sob a forma de metahemoglobina devido a vários factores: produção de agentes oxidantes (geralmente o ião superóxido) durante o metabolismo; acção de dadores de hidrogénio na presença de oxigénio (formação do ião peróxido) ou por autooxidação da hemoglobina ($\text{HbFe}^{2+} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{HbFe}^{3+} + \text{O}_2^-$).

Nenhum dos processos anteriormente descritos é fisiologicamente favorável aos teleósteos, pelo que estes possuem, nos seus eritrócitos, sistemas de agentes redutores que transformam o Fe^{3+} em Fe^{2+} (FREEMAN *et al.*, 1983; SCOTT & HARRINGTON, 1985).

Esta redução pode ser realizada directamente por compostos de elevado poder redutor (ex: o ácido ascórbico, glutatona na forma reduzida e a tetrahidropterina) ou por sistemas enzimáticos (redutases dependentes do NADPH e redutases dependentes do NADH). Em conjunto os sistemas redutores apresentam uma capacidade de redução 250 vezes superior à taxa de formação normal de metahemoglobina (SCHWARTZ *et al.*, s/d).

De entre os sistemas que efectuam a transformação da metahemoglobina em hemoglobina, a redutase dependente do NADH detém o maior poder redutor, sendo por isso genericamente designada de redutase da metahemoglobina.

A redutase de metahemoglobina existe livre no citoplasma e ligada à membrana celular (BORGESSE *et al.*, 1982; ZHANG & SOMERVILLE, 1990), e funciona como uma diaforase. Esta enzima utiliza um aceitador "artificial" de electrões (citocromo b5) entre o NADH oxidado e o Fe^{3+} do grupo heme da metahemoglobina (SCHWARTZ *et al.*, s/d) (*vide* Figura 4).

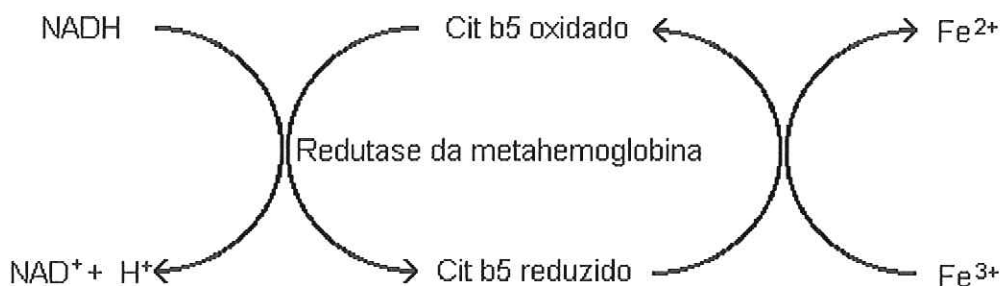


Figura 4: Representação esquemática da acção da redutase da metahemoglobina.

I.4. Objectivo

Os compostos azotados, entre eles os nitritos, são responsáveis por elevados índices de mortalidade em peixes, quer em condições naturais, quer em cultivo, devido ao facto de serem agentes oxidantes. Estes agentes actuam sobre compostos que possuem elementos susceptíveis de serem oxidados, nomeadamente o ferro do grupo heme da hemoglobina. Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares, através dos quais o genoma mobiliza uma resposta à agressão oxidativa. Além do interesse específico inerente a esta informação, ela é também essencial para a compreensão e manipulação dos intervalos de tolerância

dos teleósteos ao stress oxidativo ambiental, abrindo caminho a estudos futuros que visem aumentar esse intervalo de tolerância.

O objectivo deste trabalho foi determinar a actividade da redutase da metahemoglobina, *in vitro*, na ausência e na presença de nitritos, e observar o seu papel como mecanismo de antioxição ao nível da hemoglobina. Foram calculadas a constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima (V_{max}) da redutase da metahemoglobina através do método directo de Eisenthal e Cornish-Bowden. O estudo foi feito em duas espécies de teleósteos marinhos de habitats e comportamentos diferentes (*Halobatrachus didactylus*, espécie costeira bentónica sedentária e solitária; e *Sparus aurata*, espécie costeira não-bentónica, migradora e gregária).

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Reagentes

Cloreto de cálcio, Merck
Cloreto de magnésio, Merck
Cloreto de potássio, BHD
Cloreto de sódio, Sigma
Dihidrogenofosfato de sódio, Riedel
EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), Sigma
Ferricianeto de potássio, Sigma
Hidrogenocarbonato de sódio, Riedel
Mercaptoetanol, Merck
NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido), Sigma
Nitrito de sódio, Merck
Tris (tris-(hidroxi-metil)-aminometano), Merck

II.2. Aparelhos utilizados

Centrifuga Heraeus Megafuge 1.0 R
Espectrofotômetro de duplo feixe Hitachi U-2000

II.3. Amostras

Para a realização deste estudo, foram utilizados indivíduos de duas espécies: *Halobatrachus didactylus*, capturados com aparelho de anzol, entre os meses de Abril e Dezembro de 1994, na Ria Formosa e *Sparus aurata* obtidos na Timar, Culturas em Água, Lda.

As duas espécies foram mantidas em tanques de aclimação ($T=15^{\circ}\text{C}$; $S=36\%$; NO_2^- e $\text{NH}_4^+ < 0.1\text{mg/l}$), com arejamento e renovação de água constante, durante três dias.

Foi determinado o peso, comprimento total e sexo de cada indivíduo.

Os animais foram sacrificados por pancada na cabeça. As amostras de sangue foram obtidas por punção directa do bulbo aórtico na espécie *Halobatrachus didactylus*, e por ablação caudal na espécie *Sparus aurata*. As amostras foram colhidas para tubos de polietileno com heparina de lítio, e colocadas a 5°C (KORCOCK *et al.*, 1988).

II.4. Actividade da redutase da metahemoglobina

O método descrito por HEGESH *et al.* (1968) é o mais utilizado para determinar directamente a actividade da redutase da metahemoglobina. Este método utiliza um complexo ferricianeto-metahemoglobina como substrato. Embora este complexo reaga rapidamente, a sua preparação é demorada e requiere muita precisão para obter resultados óptimos. Além disso, a reacção só se processa em condições ácidas (pH 4.7), o que torna a sua manipulação muito difícil em estudos de cinética.

Por outro lado, o sistema enzimático da redutase da metahemoglobina tem também, uma elevada actividade como redutase do ferricianeto. A redução do ferricianeto, com concomitante oxidação do NADH, pode ser seguida espectrofotometricamente a 340 nm. Isto torna a determinação da actividade da redutase da metahemoglobina num processo rápido e simples, porque a relação entre as duas actividades é proporcional (BOARD, 1981).

A determinação da actividade da redutase da metahemoglobina foi feita pelo método de BOARD (1981), adaptado para teleósteos marinhos.

Este método compreende 5 etapas:

- Lavagem dos eritrócitos,
- Quantificação da hemoglobina nos eritrócitos lavados,
- Obtenção de um hemolisado de eritrócitos,
- Determinação da velocidade inicial da reacção de oxidação do NADH,
- Cálculo da actividade da redutase da metahemoglobina.

O plasma das amostras foi separado da camada globular por centrifugação a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, a 4°C. O precipitado ("papa de glóbulos vermelhos") foi lavado três vezes por centrifugação nas mesmas condições, com

solução fisiológica preparada para teleósteos marinhos (7.8 g/l NaCl; 0.18 g/l KCl; 0.166 g/l CaCl₂; 0.095 g/l MgCl₂; 0.084 g/l NaHCO₃; 0.06 g/l NaH₂PO₄) (FORSTERK & HONG, *s/d in* HOAR, 1978), na proporção de 1/4 (v/v).

Os eritrócitos lavados foram diluídos numa solução fisiológica preparada para teleósteos, na proporção de 1/4 (v/v), e conservados por congelação a -20°C.

A quantificação da hemoglobina (g/dl) foi feita num laboratório de análises clínicas, por análise espectrofotométrica do hemolisado a 525 nm.

Dado que a membrana celular não é permeável ao ferricianeto (ORRINGER & ROER, 1979), foi necessário hemolisar os eritrócitos. Após a lavagem, os eritrócitos foram hemolisados por adição de uma solução de estabilização contendo mercaptoetanol 0.7 mM e EDTA 2.7 mM com pH 7.0, na proporção 1/40 (v/v). Os hemolisados foram mantidos a -20°C até ao momento em que se realizou o ensaio para determinação da actividade enzimática (*vide* Figura 5).

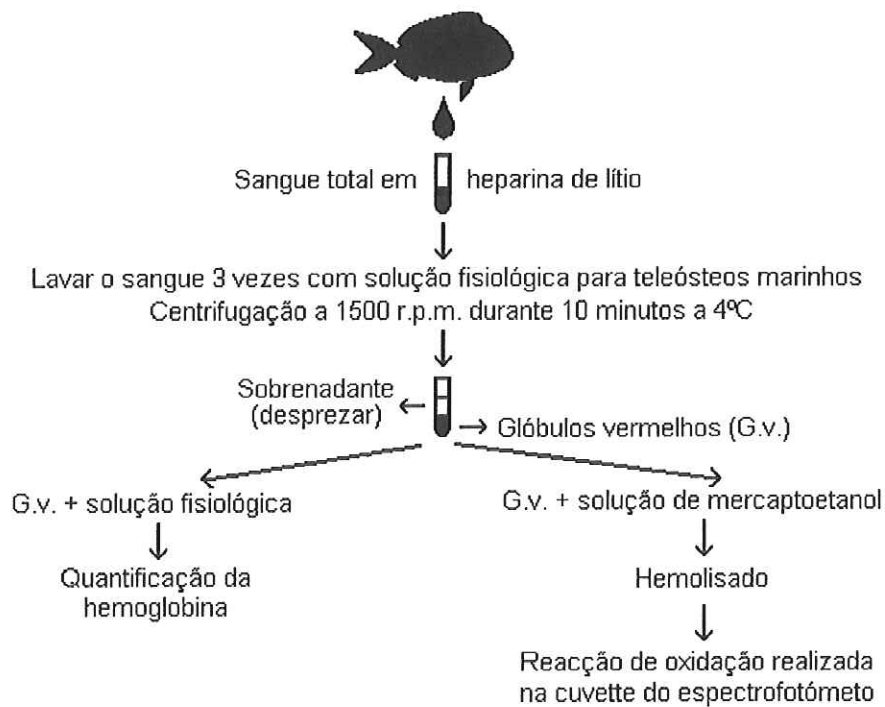


Figura 5: Representação esquemática do método de BOARD (1981).

O método de determinação da actividade desta enzima baseia-se no seguimento da oxidação do NADH, com conseqüente redução do ferricianeto, detectável espectrofotometricamente a 340 nm.

A mistura de reacção continha 100 µl de solução tampão Tris-HCl 1 M e EDTA 5 mM com pH 8.0, 100 µl de solução de ferricianeto de potássio 2 mM, 600 µl de água destilada e 100 µl de solução de NADH 2 mM.

A reacção foi iniciada por adição de 100 µl do hemolisado anteriormente preparado, e a oxidação do NADH foi seguida a 340 nm durante 3 minutos. A leitura de absorvâncias foi efectuada num espectrofotómetro de duplo feixe, contra um branco em que o hemolisado foi substituído por água destilada.

Para cada amostra, a reacção de oxidação do NADH foi efectuada em triplicado, e a velocidade inicial de oxidação do NADH foi calculada a partir do declive inicial das curvas obtidas (*vide* Figura 6).

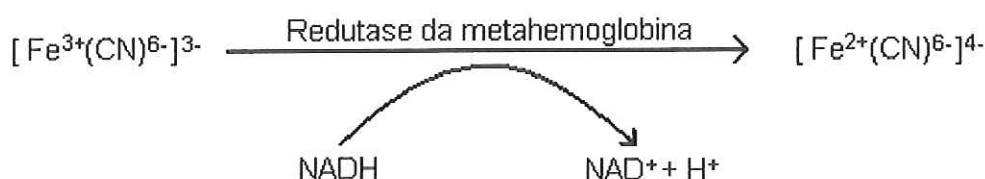


Figura 6: Representação esquemática da redução do ferricianeto pela redutase da metahemoglobina.

A determinação da actividade enzimática foi efectuada com base na mediana da velocidade inicial da reacção de oxidação do NADH, expressa em s⁻¹.

Para que os resultados sejam comparáveis entre si, a actividade é expressa por grama de hemoglobina, uma vez que a actividade é doseada em eritrócitos hemolisados e a actividade fisiológica deste sistema enzimático está relacionada com esta proteína.

A actividade da redutase da metahemoglobina (Act) foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Act} = D \times 60000 / 6.22 / \text{Hb}_f$$

onde:

D é a velocidade inicial da reacção de oxidação do NADH, expressa em s⁻¹; 60000 é o producto de 60 (converte s⁻¹ em min⁻¹) por 1000 (factor de correcção para o valor da absorvância específica (ε)); 6.22 é a absorvância específica do NADH expressa em mM; Hb_f é o valor final de hemoglobina: Hb / 10; Hb é a quantidade de hemoglobina presente em cada amostra, expressa em g/dl; 10 é o factor de correcção referente à diluição realizada na cuvette.

O valor final da actividade vem expresso em µmol NAD⁺ / min / g Hb.

II.5. Incubação *in vitro* dos eritrócitos com nitrito de sódio

Após a determinação da variação da actividade da redutase da metahemoglobina para as duas espécies em estudo, efectuaram-se incubações, *in vitro*, de eritrócitos lavados com concentrações crescentes de nitritos.

A partir de uma solução-mãe de NaNO₂ 100 mM, fizeram-se incubações de eritrócitos lavados, em que a concentração final de NaNO₂ foi de 1, 3, 6 e 9 mM.

Depois de 60 minutos de incubação, os eritrócitos foram novamente lavados 3 vezes por centrifugação nas condições anteriormente descritas, para retirar o meio de incubação com os nitritos. Em seguida, foram tratados pelo método de BOARD (1981), acima descrito.

Além da actividade enzimática foram também determinados parâmetros cinéticos.

II.6. Determinação de parâmetros cinéticos

Para completar a informação fornecida pela actividade da redutase da metahemoglobina, foram também determinados parâmetros cinéticos pelo método directo de EISENTHAL & CORNISH-BOWDEN (1974 *in* SEGEL, 1975).

Este método consiste no cálculo da velocidade máxima aparente (V^{ap}), que corresponde à velocidade máxima de reacção da enzima quando todos os seus centros activos estão ocupados por moléculas de substrato; e da constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{ap}), que corresponde à afinidade da enzima para um dado substrato sendo tanto maior quanto menor for o valor da constante, através dum gráfico directo.

De acordo com este método, a equação de Michaelis-Menten é transformada da seguinte forma:

$$V^{ap} = V_0 + (V_0 / [S]) \cdot K_M^{ap}$$

Para cada par de valores experimentais de velocidade inicial (V_0) e de concentração de substrato ($[S]$) é descrita uma linha que intersecta o eixo das ordenadas no valor V_0 e o das abcissas em $[S]$. Assim, é definido um conjunto de linhas para uma série de pares $V_0 / [S]$ que têm um ponto de intersecção cuja ordenada é V^{ap} e cuja abcissa é K_M^{ap} (*vide* Figura 7).

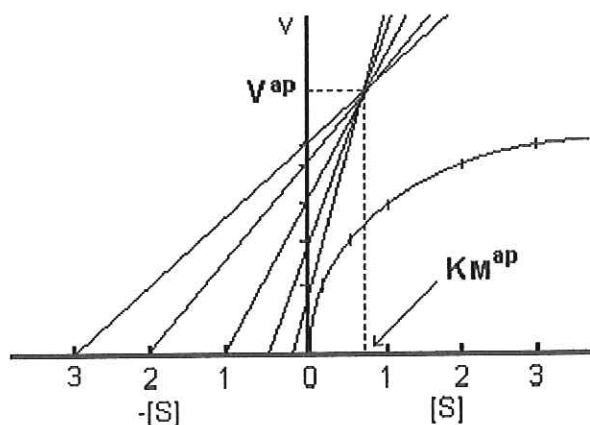


Figura 7: Determinação dos parâmetros cinéticos pelo método directo de Eisenthal & Cornish-Bowden (SEGEL, 1975).

Os resultados obtidos por este método directo, geralmente devido a erros experimentais, não permitem obter um ponto de intersecção, mas vários. Sendo assim, o valor mais provável de V^{ap} e de K_M^{ap} é dado pela mediana dos valores, respectivamente das ordenadas e das abcissas dos vários pontos de intersecção (MANSO *et al.*, 1986).

Utilizando o método de BOARD (1981) acima descrito, determinou-se a velocidade inicial da enzima, com e sem incubação com nitritos, variando a concentração de cada um dos substratos (ferricianeto de potássio: 0.1, 0.2, 0.4 e 0.6 mM; NADH: 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 e 0.25 mM).

Os resultados obtidos foram analisados segundo o método directo de Eisenthal e Cornish-Bowden, em que se determinou a V_{max}^{ap} e o K_M^{ap} .

II.7. Métodos estatísticos

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através de testes não-paramétricos, devido ao facto de se desconhecer a sua distribuição.

Para comparar as duas espécies na ausência de nitritos utilizou-se o teste de Wilcoxon para duas amostras (SOKAL & ROHLF, 1981).

A relação entre a actividade enzimática para cada indivíduo de cada espécie e o seu peso foi testada através do coeficiente de correlação de Kendall (CONOVER, 1980; SOKAL & ROHLF, 1981).

O efeito dos nitritos sobre cada uma das espécies em particular, foi analisado com o teste de Kruskal-Wallis (CONOVER, 1980; SOKAL & ROHLF, 1981).

III. RESULTADOS

III.1 Relação entre a actividade enzimática e o peso dos indivíduos

A variação da actividade da redutase da metahemoglobina em relação ao peso e ao sexo em 38 indivíduos da espécie *Halobatrachus didactylus*, na ausência de nitritos, encontra-se descrita na Tabela I.

Tabela I: Variação da actividade da redutase da metahemoglobina com o peso e o sexo, na ausência de nitritos, em *Halobatrachus didactylus*.

Indivíduos	Peso (g)	Sexo	Actividade enzimática ($\mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$)
1	243.3	macho	28.0
2	294.4	fêmea	25.5
3	222.3	macho	100.5
4	217.6	fêmea	22.1
5	250.9	fêmea	15.6
6	350.0	fêmea	38.6
7	249.6	macho	24.1
8	296.6	fêmea	46.1
9	267.3	macho	31.6
10	260.4	macho	20.5
11	333.3	fêmea	49.7
12	280.1	fêmea	39.2
13	230.1	macho	51.1
14	229.9	macho	37.1
15	194.7	macho	49.2
16	155.9	macho	65.8
17	217.0	macho	35.7
18	332.7	macho	73.2
19	165.9	macho	58.8
20	119.1	macho	22.5
21	249.3	fêmea	39.4
22	364.0	macho	32.4
23	371.5	macho	36.6
24	347.3	fêmea	60.8
25	306.7	macho	29.6
26	254.7	fêmea	57.6
27	187.0	fêmea	66.2
28	175.2	fêmea	53.1
29	231.4	fêmea	77.5
30	230.0	macho	50.7
31	243.0	fêmea	16.5
32	210.1	fêmea	60.0
33	168.4	macho	48.6
34	168.6	macho	21.6
35	223.8	macho	33.1
36	205.7	macho	53.3
37	262.4	macho	11.8
38	167.1	fêmea	15.8

Os valores da actividade da redutase da metahemoglobina apresentam uma distribuição aleatória, em relação ao peso dos indivíduos (*vide* Figura 8).

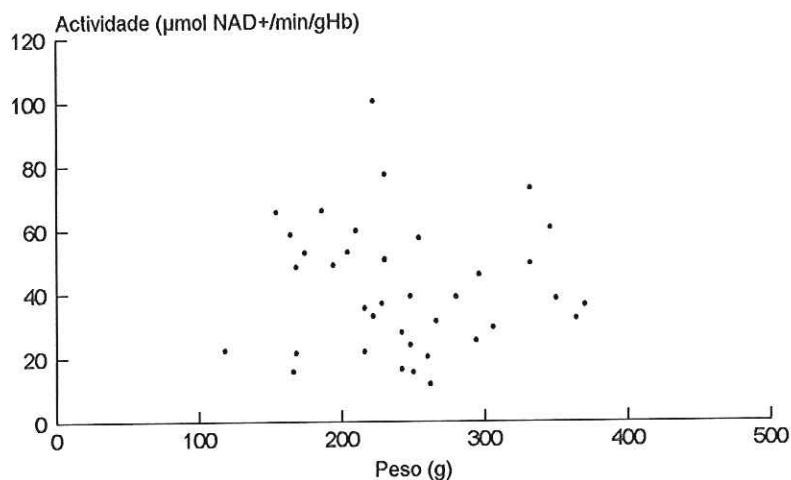


Figura 8: Relação entre o peso e a actividade da redutase da metahemoglobina em *Halobatrachus didactylus*.

Da análise do resultado do teste não-paramétrico de Kendall, para o cálculo do coeficiente de correlação entre o peso e a actividade verificou-se que para $\alpha=0.01$ não existe correlação estatisticamente significativa entre estas duas grandezas.

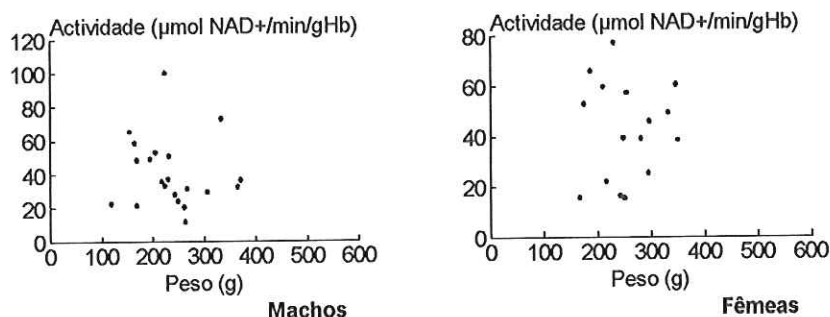


Figura 9: Relação entre o peso e a actividade enzimática nos machos e nas fêmeas em *Halobatrachus didactylus*.

Após a separação dos indivíduos amostrados por sexo, observou-se também uma distribuição aleatória entre a actividade enzimática e o peso (*vide* Figura 9).

No que diz respeito ao resultado do teste não-paramétrico de Kendall, para o cálculo do coeficiente de correlação entre o peso e a actividade enzimática, para os machos e para as fêmeas, verificou-se que para $\alpha=0.01$ não existe correlação entre as duas grandezas.

A Tabela II descreve os valores obtidos para a actividade da redutase da metahemoglobina, na ausência de nitritos, para 23 indivíduos da espécie *Sparus aurata*.

Tabela II: Variação da actividade da redutase da metahemoglobina com o peso e o sexo, em condições basais, em *Sparus aurata*.

Indivíduos	Peso (g)	Sexo	Actividade enzimática ($\mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$)
1	281.0	macho	47.6
2	358.3	macho	25.4
3	239.2	macho	30.3
4	387.6	macho	18.6
5	346.3	macho	48.0
6	275.9	macho	27.6
7	254.7	macho	32.2
8	309.7	macho	38.3
9	321.4	macho	20.6
10	314.0	macho	21.1
11	329.1	macho	45.6
12	255.7	macho	17.1
13	305.0	macho	33.1
14	282.4	macho	22.4
15	445.7	macho	24.2
16	299.4	macho	29.6
17	364.4	macho	32.8
18	241.4	macho	33.5
19	504.3	macho	11.2
20	480.5	macho	23.3
21	474.9	macho	23.2
22	277.3	macho	34.2
23	271.0	macho	25.4

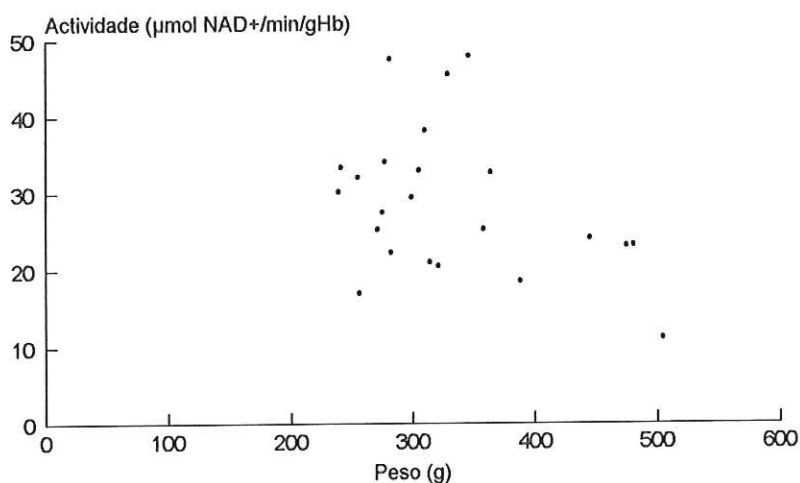


Figura 10: Relação entre o peso e a actividade da redutase da metahemoglobina em *Sparus aurata*.

Sparus aurata apresenta também uma distribuição aleatória da actividade enzimática face ao peso de cada indivíduo (*vide* Figura 10).

Da análise do resultado do teste não-paramétrico de Kendall, para o cálculo do coeficiente de correlação entre o peso e a actividade, verificou-se que para $\alpha=0.01$ não existe correlação entre estas duas grandezas. Nesta espécie todos os indivíduos eram machos.

III.2. Comparação entre as duas espécies

Os valores de actividade enzimática, K_M e V_{max} , determinados para cada uma das espécies, na ausência de nitritos, encontram-se descritos nas Tabelas I e II.

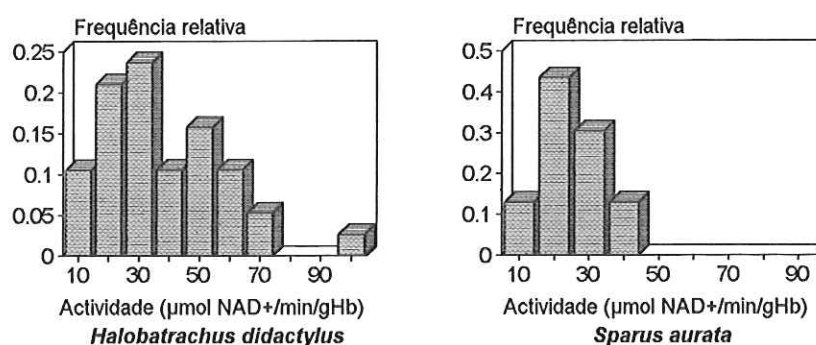


Figura 11: Distribuição da frequência relativa dos diferentes indivíduos, em função dos valores da actividade enzimática, nas duas espécies em estudo.

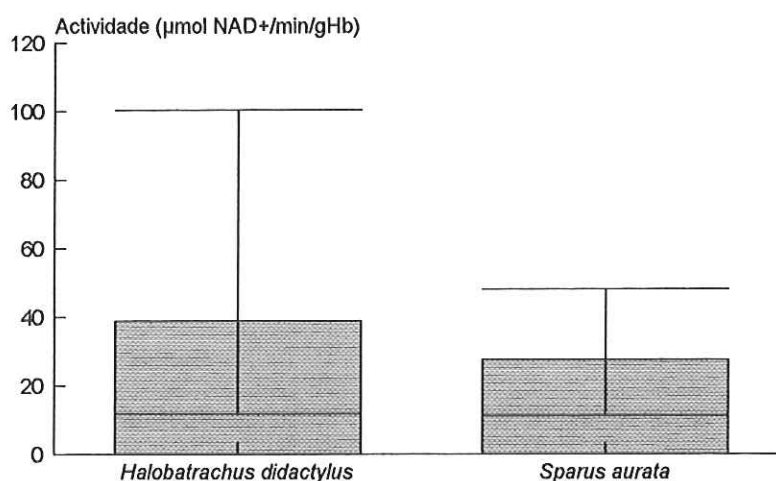


Figura 12: Valores da actividade enzimática nas duas espécies (mediana, máx, mín).

A distribuição da frequência relativa em função dos valores de actividade enzimática evidenciou, em *Sparus aurata*, uma tendência para valores menores

(entre 10 e 40 μ mol de NAD⁺/min/gHb) do que em *Halobatrachus didactylus* (entre 10 e 100 μ mol de NAD⁺/min/gHb) (vide Figura 11).

Da utilização do teste não-paramétrico de Wilcoxon para duas amostras desemparelhadas, verificou-se que para $\alpha=0.01$, a actividade enzimática dos indivíduos das duas amostras é diferente.

O valor mediano da actividade da redutase da metahemoglobina em *Halobatrachus didactylus* (38.9 μ mol NAD⁺/min/gHb) é superior ao da espécie *Sparus aurata* (27.6 μ mol NAD⁺/min/gHb) (vide Figura 12).

Os valores de K_M da redutase da metahemoglobina, para os dois substratos, e para ambas espécies, encontram-se descritos na Tabela III.

Tabela III: Valores de K_M da redutase da metahemoglobina, em condições basais.

<i>Halobatrachus didactylus</i>		<i>Sparus aurata</i>	
Ferricianeto de potássio (mM)	NADH (mM)	Ferricianeto de potássio (mM)	NADH (mM)
0.120	0.120	0.260	0.032
0.230	0.102	0.216	0.046
0.130	0.130	0.088	0.058
0.120	0.089	0.060	0.012
0.140	0.096	0.126	0.030
0.060	0.036	0.064	0.028
0.300	0.041	0.328	0.090
0.130	0.031	0.072	0.036
0.135	0.039	0.224	0.038
0.200	0.031	0.068	0.030
0.150	0.054	0.252	0.014
0.130	0.047	0.282	0.034
0.180	0.140	0.198	0.032
0.150	0.130	0.088	0.029
0.130	0.130	0.056	0.034
0.088	0.074	0.072	0.014
0.090	0.134	0.058	0.022
0.210	0.038	0.228	0.024
0.100	0.063	0.096	0.034
0.270	0.022	0.096	0.021
-	0.070	0.092	0.059
-	0.039	0.060	0.012
-	-	0.068	0.037

Os valores de K_M da redutase da metahemoglobina em *Halobatrachus didactylus*, para ambos os substratos, são geralmente superiores aos da *Sparus aurata*.

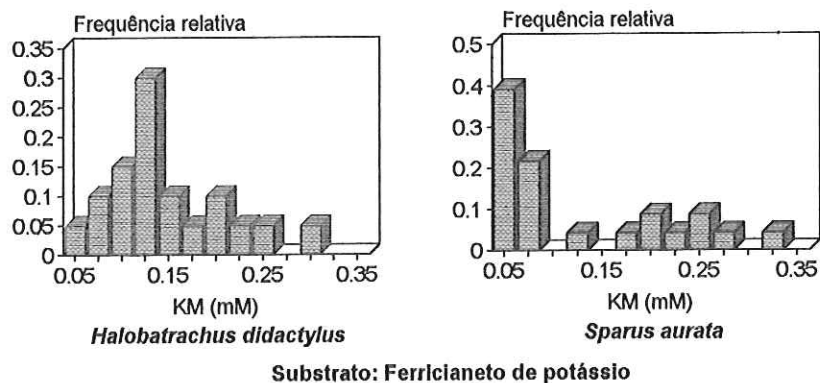


Figura 13: Distribuição da frequência relativa dos diferentes indivíduos, em função dos valores de K_M , nas duas espécies em estudo, quando o substrato é o ferricianeto de potássio.

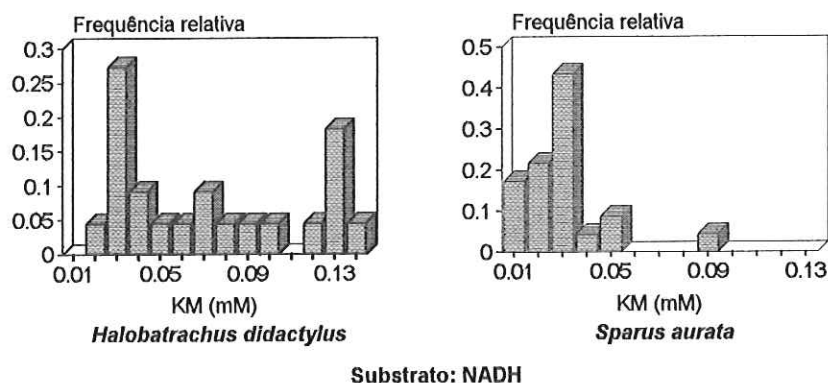


Figura 14: Distribuição da frequência relativa dos diferentes indivíduos, em função dos valores de K_M , nas duas espécies em estudo, quando o substrato é o NADH.

Para ambos os substratos é de salientar que a espécie *Sparus aurata* apresenta as frequências relativas mais elevadas para os valores inferiores de K_M (vide Figuras 13 e 14).

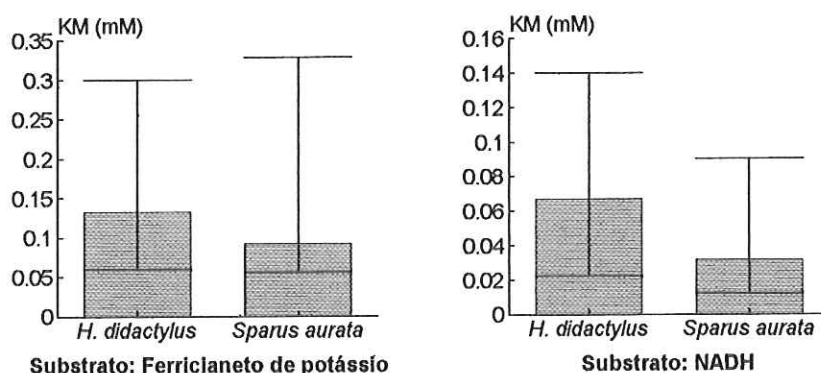


Figura 15: Valores de K_M , de ambos os substratos, nas duas espécies em estudo (mediana, máx, mfn).

Da utilização do teste não-paramétrico de Wilcoxon para duas amostras desemparelhadas, para comparar os valores de K_M das redutases da

metahemoglobina das duas espécies, utilizando como substratos o ferricianeto de potássio e o NADH, obtiveram-se resultados distintos.

No caso do substrato utilizado ser o ferricianeto de potássio, para $\alpha=0.05$, verificou-se que as redutases da metahemoglobina das duas espécies têm valores de K_M não significativamente diferentes. Graficamente é de salientar que o valor mediano da redutase de *Halobatrachus didactylus* (0.133mM) é superior ao da *Sparus aurata* (0.092mM) (vide Figura 15).

No caso do substrato utilizado ser o NADH, para $\alpha=0.05$, verificou-se que as redutases das duas espécies têm valores distintos. Tendo a redutase de *Halobatrachus didactylus* o valor mediano (0.067mM) superior ao da *Sparus aurata* (0.032mM) (vide Figura 15).

Os valores de V_{max} da redutase da metahemoglobina, para os dois substratos, e para ambas as espécies, encontram-se descritos na tabela IV.

Tabela IV: Valores de V_{max} da redutase da metahemoglobina, em condições basais.

<i>Halobatrachus didactylus</i>		<i>Sparus aurata</i>	
Ferricianeto de potássio (min^{-1})	NADH (min^{-1})	Ferricianeto de potássio (min^{-1})	NADH (min^{-1})
0.103	0.016	0.206	0.056
0.128	0.025	0.176	0.062
0.123	0.013	0.165	0.057
0.119	0.027	0.133	0.066
0.097	0.013	0.201	0.041
0.097	0.022	0.149	0.060
0.124	0.031	0.258	0.029
0.079	0.042	0.179	0.066
0.093	0.032	0.198	0.052
0.079	0.029	0.170	0.046
0.101	0.032	0.296	0.098
0.082	0.029	0.244	0.079
0.123	0.010	0.211	0.074
0.095	0.013	0.243	0.059
0.093	0.015	0.096	0.080
0.064	0.017	0.155	0.064
0.072	0.008	0.154	0.071
0.099	0.030	0.236	0.096
0.110	0.049	0.148	0.058
0.089	0.047	0.186	0.083
-	0.024	0.149	0.051
-	0.021	0.129	0.101
-	-	0.144	0.055

Os valores de V_{max} da redutase da metahemoglobina de *Halobatrachus didactylus*, para ambos os substratos, são geralmente inferiores aos da *Sparus aurata*.

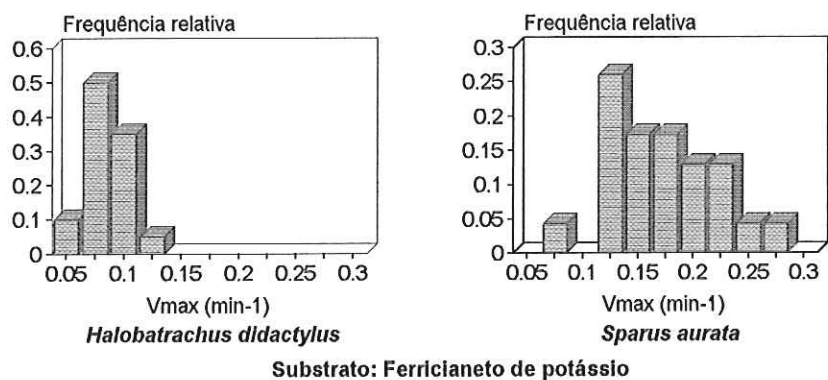


Figura 16: Distribuição da frequência relativa dos diferentes indivíduos, em função dos valores de V_{max} , nas duas espécies em estudo, quando o substrato é o ferricianeto de potássio.

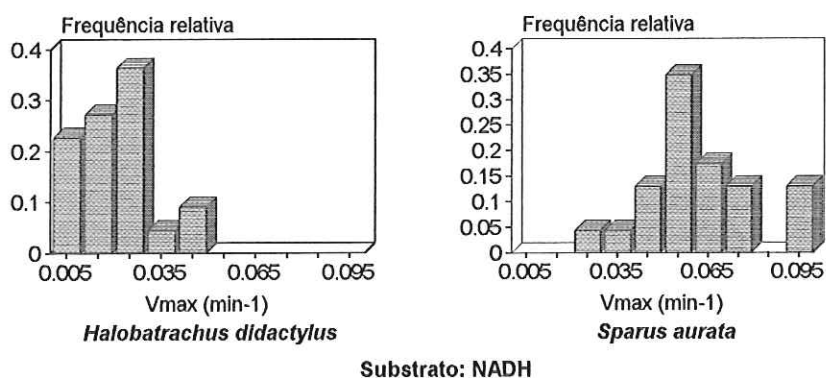


Figura 17: Distribuição da frequência relativa dos diferentes indivíduos, em função dos valores de V_{max} , nas duas espécies em estudo, quando o substrato é o NADH.

Para ambos os substratos, é de salientar que a espécie *Sparus aurata* apresenta as frequências relativas mais altas para os valores superiores de V_{max} . (vide Figuras 16 e 17).

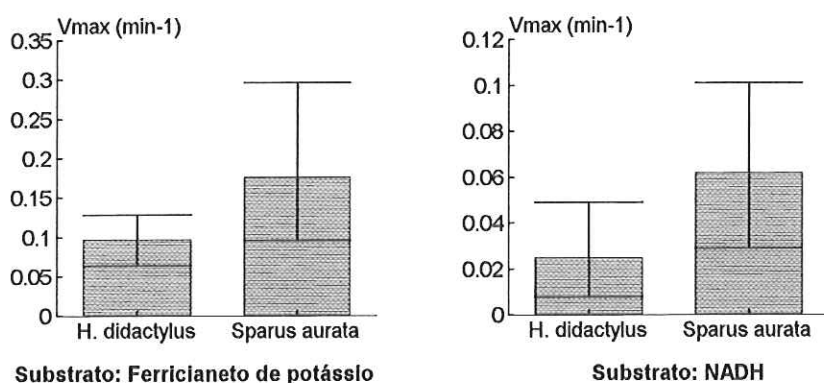


Figura 18: Valores de V_{max} , de ambos os substratos, nas duas espécies em estudo (mediana, máx, mín).

Utilizou-se o teste de Wilcoxon para duas amostras desemparelhadas, para comparar os valores de V_{max} das redutases da metahemoglobina das duas espécies, utilizando como substrato, quer o ferricianeto de potássio, quer o NADH.

Para ambos os substratos, e com um $\alpha=0.001$, as redutases das duas espécies apresentam valores de V_{max} distintos. A redutase da metahemoglobina de *Halobatrachus didactylus* tem para a V_{max} , valores medianos menores (ferricianeto de potássio: 0.097min^{-1} ; NADH: 0.025min^{-1}) do que os da *Sparus aurata* (ferricianeto de potássio: 0.176min^{-1} ; NADH: 0.062min^{-1}) (vide Figura 18).

Os dois parâmetros cinéticos, anteriormente referidos (K_M e V_{max}), foram determinados através do método directo de Eisenthal & Cornish-Bowden. As velocidades iniciais de reacção foram calculadas fazendo variar a concentração de cada um dos substratos.

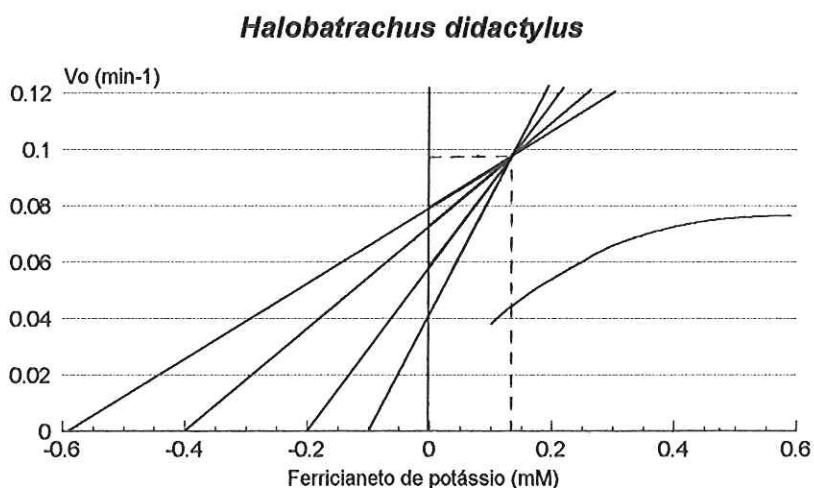


Figura 19: Representação da curva de Michaelis-Menten e do gráfico de Eisenthal e Cornish-Bowden para o ferricianeto de potássio, em *Halobaytrachus didactylus* (valores medianos).

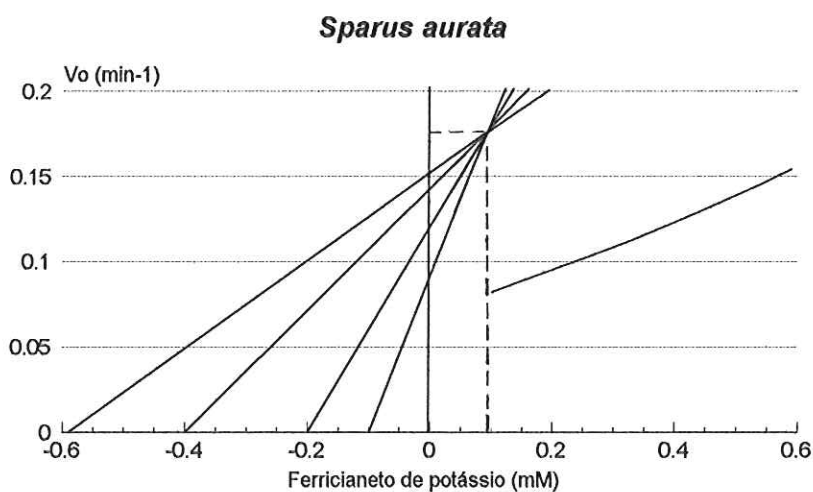


Figura 20: Representação da curva de Michaelis-Menten e do gráfico de Eisenthal e Cornish-Bowden para o ferricianeto de potássio, em *Sparus aurata* (valores medianos).

Verificou-se para ambas as espécies que, a velocidade inicial aumenta com concentrações crescentes de ferricianeto de potássio (*vide* Figuras 19 e 20).

III.3. Efeito dos nitritos

Nesta fase do trabalho foram analisadas amostras de eritrócitos de 20 indivíduos de cada espécie, que foram divididos em quatro grupos, de 5 elementos cada. Cada grupo foi submetido a uma concentração de nitritos diferente: 1, 3, 6 e 9mM de NaNO₂.

A variação da actividade enzimática, K_M e V_{max} da redutase da metahemoglobina, para 20 indivíduos de *Halobatrachus didactylus*, encontra-se descrita na tabela V.

Tabela V: Valores referente à actividade enzimática, K_M e V_{max} da redutase da metahemoglobina em *Halobatrachus didactylus* (amostras incubadas com nitritos).

[NO ₂] (mM)	Indiv.	Ferricianeto de potássio		NADH		Actividade enzimática (μmol NAD ⁺ /min/gHb)
		K _M (mM)	V _{max} (min ⁻¹)	K _M (mM)	V _{max} (min ⁻¹)	
1	1	0.090	0.051	0.056	0.018	13.40
	2	0.116	0.055	0.036	0.021	23.74
	3	0.176	0.042	0.020	0.029	27.87
	4	0.164	0.053	0.020	0.018	16.32
	5	0.194	0.046	0.034	0.017	16.88
3	6	0.116	0.046	0.044	0.012	14.91
	7	0.160	0.047	0.064	0.015	19.29
	8	0.156	0.056	0.024	0.028	14.24
	9	0.196	0.067	0.064	0.019	13.47
	10	0.116	0.047	0.026	0.024	14.47
6	11	0.124	0.050	0.041	0.010	20.01
	12	0.142	0.083	0.026	0.023	14.00
	13	0.140	0.033	0.022	0.022	16.32
	14	0.160	0.049	0.020	0.038	13.36
	15	0.136	0.064	0.016	0.032	11.50
9	16	0.120	0.046	0.026	0.020	12.28
	17	0.124	0.089	0.030	0.026	15.07
	18	0.198	0.045	0.030	0.020	12.48
	19	0.160	0.060	0.039	0.017	11.74
	20	0.100	0.066	0.025	0.020	12.22

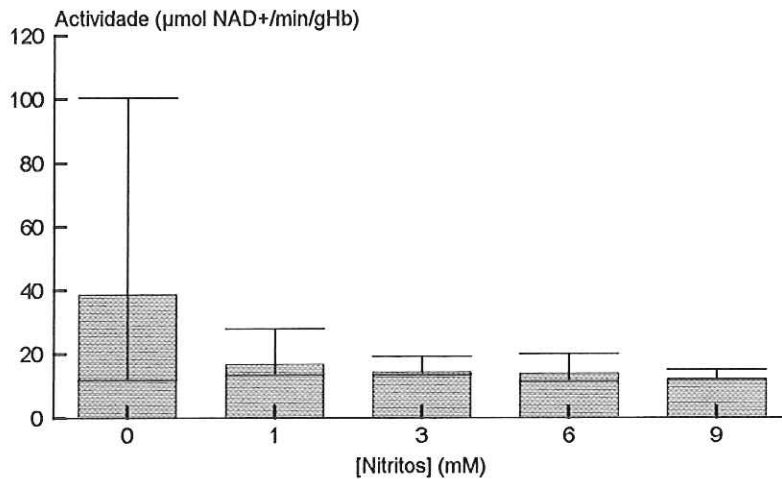


Figura 21: Actividade da redutase da metahemoglobina em função da exposição *in vitro* a nitritos, em *Halobatrachus didactylus* (mediana, máx, mín).

No que diz respeito ao resultado do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para analisar o efeito da variação da concentração dos nitritos sobre a actividade enzimática, verificou-se que para $\alpha=0.001$, os nitritos influenciam a actividade enzimática. Quanto maior é a concentração de nitritos, menor é a actividade enzimática da redutase da metahemoglobina (*vide* Figura 21).

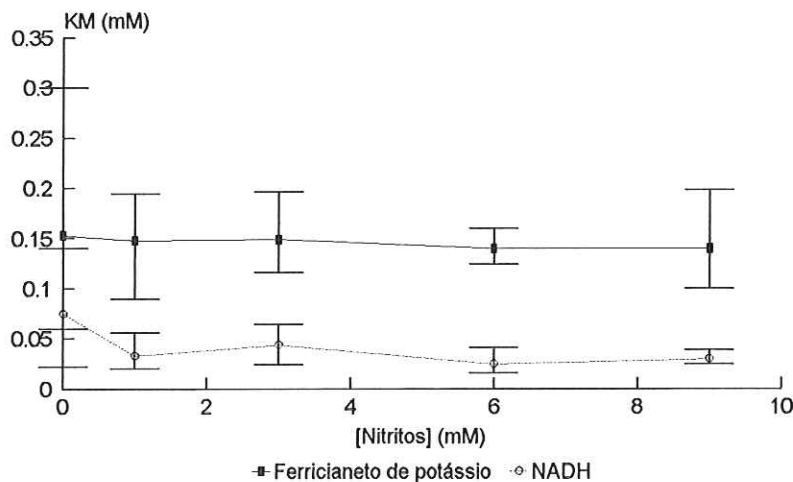


Figura 22: Efeito da exposição a nitritos nos valores de K_M da redutase da metahemoglobina de *Halobatrachus didactylus*, em função dos substratos ferricianeto de potássio e NADH (média, máx, mín).

Halobatrachus didactylus mostra uma tendência para a diminuição dos valores de K_M , para ambos os substratos, com o aumento da concentração dos nitritos de 0 a 9mM (*vide* Figura 22).

Com o aumento da concentração dos nitritos de 0 para 9mM, a V_{max} , para ambos os substratos, tem uma ligeira tendência para aumentar (*vide* Figura 23).

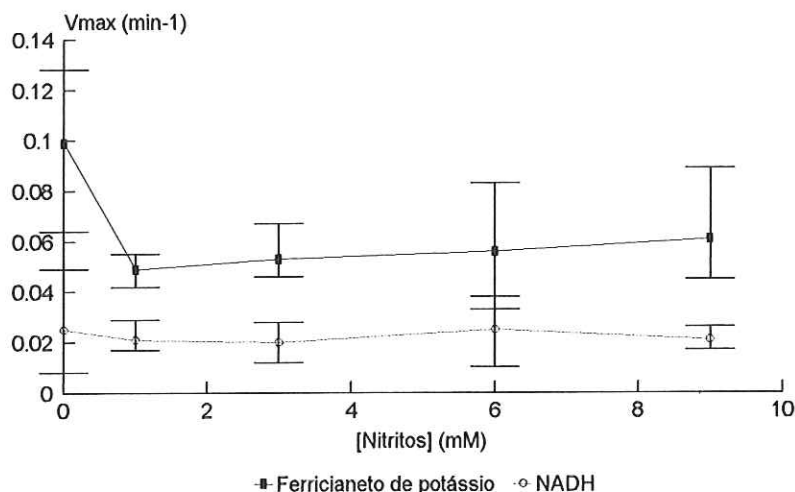


Figura 23: Efeito da exposição a nitritos nos valores de V_{max} da redutase da metahemoglobina de *Halobatrachus didactylus*, em função dos substratos ferricianeto de potássio e NADH (média, máx, mín).

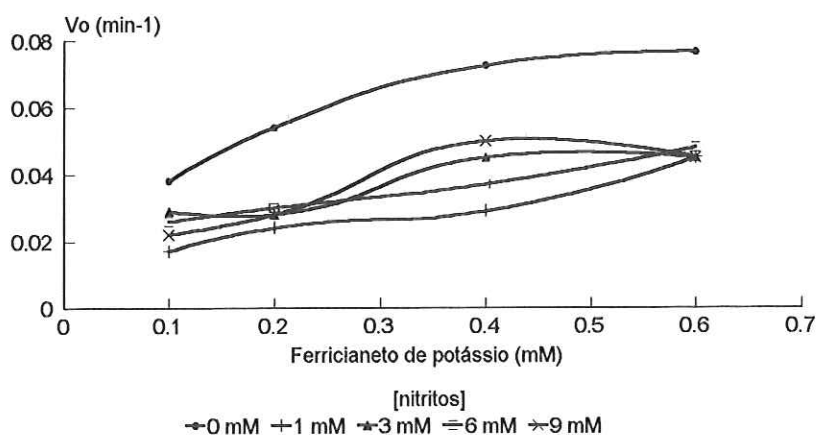


Figura 24: Representação das curvas de Michaelis-Menten para o ferricianeto de potássio quando incubado com nitritos, em *Halobatrachus didactylus* (valores medianos).

A velocidade inicial da redutase da metahemoglobina é significativamente reduzida na presença de nitritos, em *Halobatrachus didactylus* (vide Figura 24).

A variação da actividade enzimática, K_M e V_{max} da redutase da metahemoglobina para 20 indivíduos da espécie *Sparus aurata*, encontra-se descrita na Tabela VI.

Da utilização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para analisar o efeito da variação da concentração dos nitritos sobre a actividade enzimática, verificou-se que para $\alpha=0.001$, os nitritos não a influenciam. Independentemente do aumento da concentração de nitritos, a actividade da redutase da metahemoglobina mantêm-se constante (vide Figura 25).

Tabela VI: Valores referentes à actividade enzimática, K_M e V_{max} da redutase da metahemoglobina, em *Sparus aurata* (amostras incubadas com nitritos).

[NO ₂ ⁻] (mM)	Indiv.	Ferricianeto de potássio		NADH		Actividade enzimática ($\mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$)
		K_M (mM)	V_{max} (min ⁻¹)	K_M (mM)	V_{max} (min ⁻¹)	
1	1	0.096	0.156	0.046	0.064	30.42
	2	0.100	0.224	0.040	0.110	27.11
	3	0.096	0.121	0.022	0.068	30.55
	4	0.056	0.143	0.020	0.096	15.07
	5	0.078	0.193	0.030	0.088	23.39
3	6	0.088	0.186	0.028	0.065	31.19
	7	0.108	0.168	0.021	0.112	18.06
	8	0.068	0.090	0.028	0.050	25.26
	9	0.096	0.200	0.020	0.118	14.15
	10	0.098	0.137	0.030	0.062	34.45
6	11	0.056	0.196	0.024	0.060	28.37
	12	0.068	0.157	0.022	0.106	15.32
	13	0.080	0.157	0.038	0.070	14.10
	14	0.113	0.178	0.024	0.070	31.69
	15	0.098	0.154	0.018	0.124	22.26
9	16	0.076	0.176	0.030	0.076	13.71
	17	0.158	0.131	0.020	0.100	28.59
	18	0.068	0.144	0.034	0.110	18.74
	19	0.080	0.160	0.020	0.109	22.19
	20	0.104	0.166	0.044	0.103	17.87

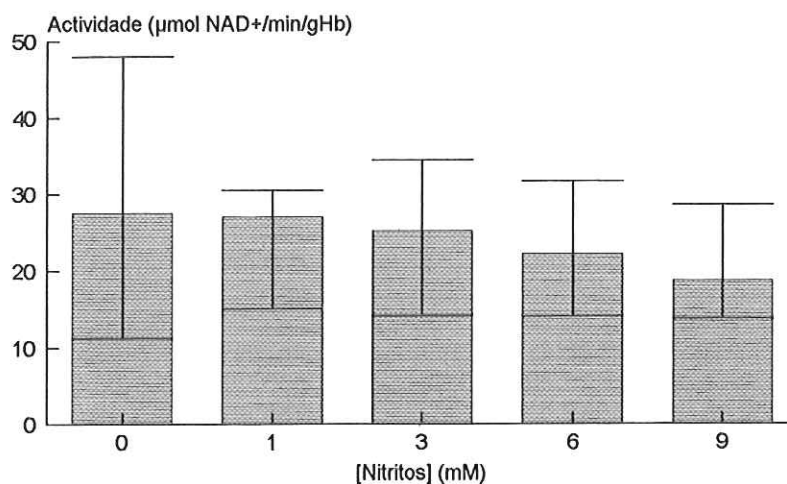


Figura 25: Actividade da redutase da metahemoglobina em função da exposição *in vitro* a nitritos, em *Sparus aurata* (mediana, máx, mín).

Sparus aurata mantém sensivelmente constante os seus valores de K_M , para ambos os substratos, consoante a concentração dos nitritos aumenta de 0 a 9mM (vide Figura 26).

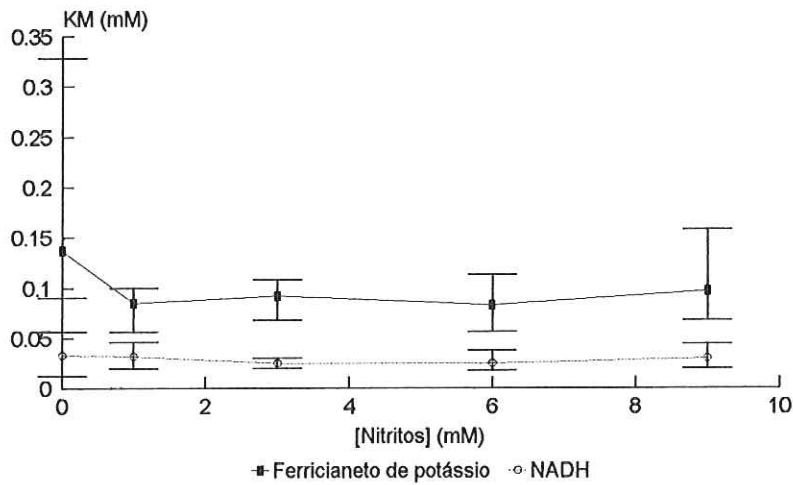


Figura 26: Efeito da exposição a nitritos nos valores de K_M da redutase da metahemoglobina de *Sparus aurata* em função dos substratos ferricianeto de potássio e NADH (média, máx, mín).

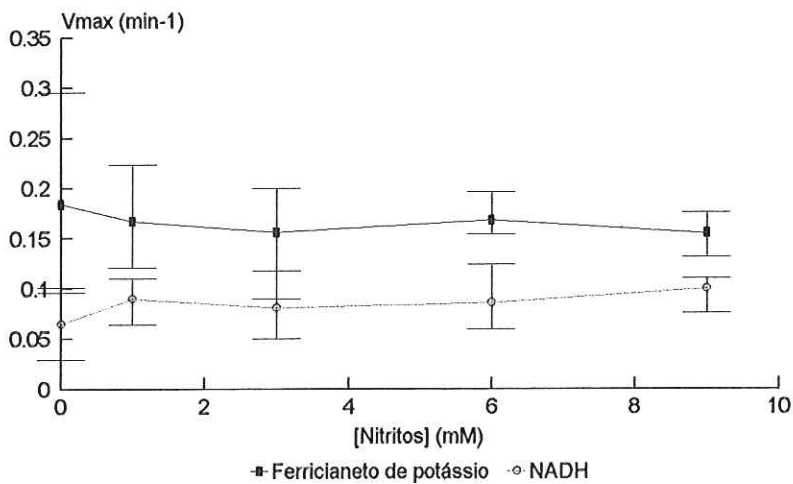


Figura 27: Efeito da exposição a nitritos nos valores de V_{max} da redutase da metahemoglobina de *Sparus aurata* em função dos substratos ferricianeto de potássio e NADH (média, máx, mín).

Com o aumento da concentração de nitritos de 0 até 9mM, a V_{max} , para ambos os substratos, mantém-se sensivelmente constante (*vide* Figura 27).

Os nitritos não alteraram a velocidade inicial para ambos os substratos, em *Sparus aurata* (*vide* Figura 28).

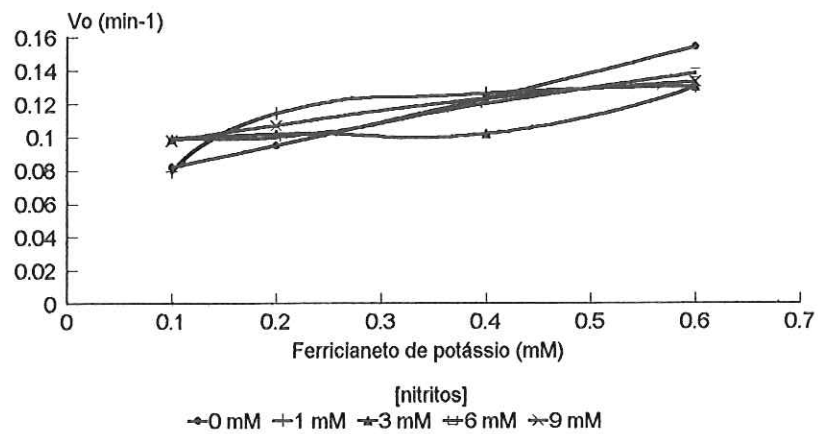


Figura 28: Representação das curvas de Michaelis-Menten para os dois substratos quando incubados com nitritos, para a espécie *Sparus aurata* (valores medianos).

IV. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com o estudo de FREEMAN *et al.* (1983), em que foi confirmada a existência, nos teleósteos, de uma enzima com propriedades semelhantes à enzima, redutase da metahemoglobina, descritas para os eritrócitos do homem.

A actividade da redutase da metahemoglobina, na ausência de nitritos, para ambas as espécies, não mostrou qualquer dependência em relação ao peso (indicador de idade), nem mesmo quando divididos os indivíduos por sexo, no caso de *Halobatrachus didactylus*. Isto levou a que os indivíduos de cada espécie fossem estudados como um todo, independentemente da idade ou sexo, ao contrário do que acontece no homem, em que a actividade da redutase da metahemoglobina aumenta com a idade e é superior nos indivíduos do sexo feminino (FRANCO, 1994).

É de salientar que tal como no trabalho de SCOTT e HARRINGTON (1985), também no presente estudo a actividade da redutase da metahemoglobina, na ausência de nitritos e nas duas espécies em estudo, tem valores superiores (valores superiores a $27.6 \mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$) aos do homem ($18.29 \mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$) (FRANCO, 1994). Isto poderá dever-se ao facto dos teleósteos terem uma taxa normal de formação de metahemoglobina na ordem dos 10% (em relação à hemoglobina total), contra apenas 1% no caso do homem (LEWIS & MORRIS, 1986). A esta razão poderá não ser alheio o facto do meio marinho possuir uma maior gama de agentes oxidantes, do que o meio terrestre.

Os peixes mais activos, e com maiores taxas metabólicas (caso de *Sparus aurata*), possuem uma menor afinidade da hemoglobina para o oxigénio (LAGLER, 1977), o que se poderá traduzir por uma menor formação de metahemoglobina, por autooxidação da hemoglobina ou acção de radicais livres de oxigénio. Este facto poderá explicar porque é que a actividade da redutase da metahemoglobina da espécie *Halobatrachus didactylus* ($38.9 \mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$) é superior à da espécie *Sparus aurata* ($27.6 \mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$).

Embora tendo valores de actividade enzimática menores, a redutase da metahemoglobina da espécie *Sparus aurata* apresenta uma maior especificidade para ambos os substratos (valores menores de K_M) e valores de velocidades máximas da reacção mais altos, do que a espécie *Halobatrachus didactylus*. Ou seja, a espécie *Sparus aurata* tem um poder de resposta mais rápido à formação

de metahemoglobina, mas uma menor resistência à exposição prolongada a agentes oxidantes (valores menores de actividade da redutase da metahemoglobina). Este comportamento está de acordo com o facto desta espécie ter elevada capacidade de locomoção, o que faz com que lhe seja fácil abandonar áreas que contenham elevadas concentrações de agentes oxidantes. Por outro lado a espécie *Halobatrachus didactylus*, que é menos activa (tendo uma menor capacidade de locomoção), protege-se tendo um eficiente sistema enzimático, capaz de contrariar o stress oxidativo, sem que a espécie tenha de abandonar o seu habitat.

Quando sujeitos a incubações *in vitro* com nitritos, os eritrócitos da espécie *Halobatrachus didactylus* reagem diminuindo a actividade da redutase da metahemoglobina. Esta diminuição pode não só ser devido à inibição da enzima por parte de concentrações crescente de nitritos, mas também à síntese de hemoglobina pelos eritrócitos, a qual altera o cálculo da actividade. Este comportamento por parte dos eritrócitos deve-se em parte à existência da grande quantidade de eritrócitos imaturos na corrente sanguínea dos teleósteos (SPECKNER *et al.*, 1989; MURAD *et al.*, 1990). Há ainda a salientar a hipótese de síntese de substância, como o ATP (adenosina tri-fosfato) e o DPG (2-3 difosfoglicerato), que aumentam a afinidade da hemoglobina para o oxigénio (ECKERT *et al.*, 1988), o que diminuiria o efeito anémico da formação de metahemoglobina.

No caso da espécie *Sparus aurata*, não houve alterações nem da actividade enzimática, nem dos parâmetros cinéticos determinados (K_M e V_{max}), com a incubação *in vitro* dos eritrócitos com nitritos. Este facto pode dever-se a duas razões: uma relacionada com a ontogénese dos indivíduos analisados, e a outra com a manutenção da informação genética dos seus progenitores. Os indivíduos analisados estiveram sujeitos durante a sua ontogénese na Timar, a elevadas concentrações de agentes oxidantes, o que fez com que as concentrações de nitritos utilizadas nas incubações *in vitro*, não provocassem uma reacção fisiológica significativa. A outra razão, acenta no facto dos indivíduos analisados descenderem directamente de progenitores capturados no seu habitat natural, o qual, comparativamente com o habitat do *Halobatrachus didactylus*, possui menos agentes capazes de oxidar a hemoglobina, o que faz com que *Sparus aurata* não tenha um sistema de defesa antioxidante bem desenvolvido.

CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou alguns aspectos que serão interessantes esclarecer, no âmbito do estudo dos mecanismos antioxidantes, em espécies de teleósteos marinhos:

As espécies *Halobatrachus didactylus* e *Sparus aurata* apresentam, nos seus eritrócitos, uma enzima que se comporta de forma semelhante à redutase da metahemoglobina do homem.

A actividade da redutase da metahemoglobina, na ausência de nitritos, apresentou valores superiores aos valores de actividade referidos para o homem.

A actividade da redutase da metahemoglobina, para as espécies estudadas, não apresentou variações, nem com o peso, nem com o sexo dos indivíduos.

Os valores de K_M e V_{max} determinados neste estudo sugerem que a redutase da metahemoglobina da espécie *Halobatrachus didactylus* apresenta uma maior eficiência antioxidativa, embora a da espécie *Sparus aurata* apresente uma maior sensibilidade à presença de baixas concentrações de metahemoglobina.

A diminuição da actividade enzimática, na presença de nitritos, observada para a espécie *Halobatrachus didactylus*, pode não só ser devido à inibição da enzima, mas também à síntese da hemoglobina por parte dos eritrócitos.

A não variação da actividade da redutase da metahemoglobina, na presença de nitritos, na espécie *Sparus aurata*, pode estar relacionada com a ontogénese dos seus indivíduos, ou com a manutenção da informação genética dos seus progenitores.

Seria necessário continuar este estudo para poder confirmar as hipóteses acima referidas.

REFERÊNCIAS

- BAUCHOT, M.-L. & HUREAU, J.-C. (1986). Sparidea in Whitehead, P.J.P.; Bauchot, M.-L.; Hureau, J.-C.; Nielsen, J. & Tortonese, E. (eds). Fishes of the North-eastern Atlantic and Mediterranean. Vol. III. Unesco, Bungay, U.K.. 883-907pp.
- BOARD, P.G. (1981). NADH-ferricyanide reductase, a convenient approach to the evaluation of NADH-methaemoglobin reductase in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta* **109**: 233-237.
- BORGESE, N.; MACCONI, D.; PAROLA, L. & PIETRINI, G. (1982). Rat erythrocyte NADH-cytochrome b₅ reductase. Quantitation and comparison between the membrane-bound and soluble forms using an antibody against the rat liver enzyme. *J. Biol. Chem.* **257**:13854-13861.
- CALVÁRIO, J. (1986). *Contribuição para o estudo ecológico do sistema lagunar "Ria Formosa"*. Relatório de provas de aptidão pedagógica e capacidade científica. U.A.I., Faro. 204p.
- CONOVER, W.J. (1980). *Practical Nonparametric Statistics*. 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York. 493p.
- DI PRISCO, G. & TAMBURRINI, M. (1992). The hemoglobins of marine and freshwater fish: the search for correlations with physiological adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**: 661-671.
- ECKERT, R. & RANDALL, D.J. (1988). *Animal Physiology - Mechanisms and Adaptations*. W.H. Freeman and Company, New York. 683p.
- EDDY, F.B. & WILLIAMS, E.M. (1987). Some effects of adrenaline on anion transport and nitrite-induced methaemoglobin formation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Exp. Zool.* **241**: 269-273.
- FÄNGE, R. (1986). Physiology of Haemopoiesis In Nilson, S.; Holmgren, S. (eds). *Fish Physiology*. Croom Helm, New Hampshire. 1-23pp.
- FRANCO, M.H. (1994). *Estudo de dois sistemas enzimáticos eritrocitários no stress oxidativo*. Relatório de estágio. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. 213p.
- FREEMAN, L.; BEITINGER, T. L. & HUEY, D. W. (1983). Methemoglobin reductase activity in phylogenetically diverse piscine species. *Comp. Biochem. Physiol.* **75B**: 27-30.
- HEGESH, E.; CALMANOVICI, N. & AVRON, M. (1968). New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-methemoglobin reductase) in erythrocytes. *J. Lab. Chem.* **72**: 339-343.

- HOAR, W.S. (1978). *Fisiologia General y Comparada*. Ediciones Omega,S.A.. Barcelona. -p.
- JENSEN, F. B. (1990). Nitrite and red cell function in carp: control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methaemoglobin formation. *J. exp. Biol.* **152**, 149-166.
- JENSEN, F. B. (1993). Influence of nucleoside triphosphates, inorganic salts, NADH, catecholamines, and oxygen saturation on nitrite-induced oxidation of rainbow trout haemoglobin. *Fish Physiol. Biochem.* **12**: 111-117.
- JENSEN, F. B.; ANDERSEN, N. A. & HEISLER, N. (1987). Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol. B* **157**: 533-541.
- KORCOK, D. E.; HOUSTON, A. H. & GRAY, J. D. (1988). Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* **33**: 319-330.
- LAGLER, K.F.; BARDACH; MILLER & PASSINO (1977). *Ichthyology*. 2nd Ed. John Wiley and Sons. New York, USA. 506p.
- LEHNINGER, A. L. (1981). *Biochemistry*. Worth Publishers, inc.; New York. 1104p.
- LEWIS, W.M.,JR & MORRIS, D.P. (1986). Toxicity of Nitrite to Fish: A Review. *Trans. Am. Fish. Soc.* **115**:183-195.
- MANSO, C.; FREIRE, A.; AZEVEDO, M. (1986). *Introdução à Bioquímica Humana*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 620p.
- MURAD, A.; HOUSTON, A.H. & SAMSON, L. (1990). Haematological response to reduced oxygen-carrying capacity, increased temperatura and hypoxia in goldfish, *Carassius auratus* L.. *J. Fish. Biol.* **36**: 289-305
- MUZAVOR, S.; ARRUDA, L.M. & ANDRADE, J.P. (1993). *Roteiro Ecológico da Ria Formosa, Il-Peixes*. Algarve em Foco Editora; Faro. 167p.
- ORRINGER, E.P. & ROER, M.E.S. (1979). An ascorbate-mediated transmembrane-reducing system of the human erythrocyte. *J. Clin. Invest.* **63**: 53-58.
- RIGGS, A. (1970). Properties of Fish Hemoglobins in Hoar, W. S.; Randall, D. J.. *Fish Physiology IV*. Academic Press, inc. San Diego. 523p.
- ROUX, C. (1986). Batrachoididae in Whitehead, P.J.P.; Bauchot, M.-L.; Hureau, J.-C.; Nielsen, J. & Tortonese, E. (eds). *Fishes of the North-eastern Atlantic and Mediterranean*. Vol. III. Unesco, Bungay, UK. 883-907pp.
- SCHWARTZ, J. M.; REISS, A. L. & JAFFÉ, E. R. (s/d). Hereditary methemoglobinemia with deficiency of NADH cytochrome b₅ reductase (chap. 75) in Strambury, J.B.; Wyngaarden, J.B.; Fredencksun, D.S. & Cooldstain, J.L.. *The Metabolic Basic of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill. 5th Edition.
- SCOTT, E. M. & HARRINGTON, J. P. (1985). Methemoglobin reductase activity in fish erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* **82B**: 511-513.

- SEGEL, I.H. (1975). *Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, USA. 945p.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. (1981). *Biometry*. 2nd Edition. W.H. Freeman and Company. USA. 859p.
- SPECKNER, W.; SCHINDLER, J.F. & ALBERS, C. (1989). Age-dependent changes in volume and haemoglobin content of erythrocytes in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Exp. Biol.* **141**: 133-149.
- VOET, D. & VOET, J.G. (1990). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1223p.
- ZHANG, H. & SOMERVILLE, C. (1990). Soluble and membrane-bound forms of cytochrome b₅ are the products of a single gene in chicken. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**: 412-415.

ANEXO

Tabela I: Valores referentes ao cálculo da actividade da redutase da metahemoglobina em *Halobatrachus didactylus*, na ausência de nitritos.

Indivíduo	Comprimento (cm)	Peso (g)	Sexo	Velocidade inicial (s ⁻¹)			Hb (g/dl)
				R1	R2	R3	
1	27.0	243.3	macho	0.00047	0.00061	0.00069	2.1
2	26.0	294.4	fêmea	0.00061	0.00061	0.00068	2.3
3	25.0	222.3	macho	0.00123	0.00125	0.00136	1.2
4	24.0	217.6	fêmea	0.00048	0.00071	0.00096	3.1
5	23.5	250.9	fêmea	0.00032	0.00034	0.00045	2.1
6	26.0	350.0	fêmea	0.00088	0.00099	0.00250	2.2
7	23.5	249.6	macho	0.00046	0.00055	0.00115	2.2
8	27.0	296.6	fêmea	0.00138	0.00148	0.00214	3.1
9	25.5	267.3	macho	0.00089	0.00131	0.00154	4.0
10	24.5	260.4	macho	0.00081	0.00085	0.00086	4.0
11	25.5	333.3	fêmea	0.00095	0.00103	0.00115	2.0
12	24.5	280.1	fêmea	0.00112	0.00122	0.00228	3.0
13	22.0	230.1	macho	0.00087	0.00159	0.00163	3.0
14	24.0	229.8	macho	0.00066	0.00077	0.00077	2.0
15	23.5	194.7	macho	0.00049	0.00051	0.00055	1.0
16	20.5	155.9	macho	0.00051	0.00075	0.00102	1.1
17	21.0	217.0	macho	0.00060	0.00063	0.00101	1.7
18	26.5	332.7	macho	0.00079	0.00091	0.00201	1.2
19	22.0	165.9	macho	0.00063	0.00128	0.00187	2.1
20	20.0	119.1	macho	0.00020	0.00021	0.00024	0.9
21	24.0	249.3	fêmea	0.00048	0.00049	0.00050	1.2
22	27.5	364.0	macho	0.00037	0.00037	0.00039	1.1
23	26.0	371.5	macho	0.00098	0.00114	0.00163	3.0
24	26.0	347.3	fêmea	0.00088	0.00126	0.00146	2.0
25	22.5	306.7	macho	0.00072	0.00092	0.00172	3.0
26	23.5	254.7	fêmea	0.00177	0.00179	0.00185	3.0
27	21.5	187.0	fêmea	0.00190	0.00206	0.00238	3.0
28	21.5	175.2	fêmea	0.00111	0.00165	0.00213	3.0
29	24.0	231.4	fêmea	0.00085	0.00249	0.00261	3.1
30	25.0	230.0	fêmea	0.00067	0.00242	0.00264	4.6
31	23.0	243.0	fêmea	0.00065	0.00070	0.00131	4.1
32	22.5	210.1	fêmea	0.00058	0.00168	0.00197	2.7
33	20.0	168.4	macho	0.00093	0.00151	0.00273	3.0
34	22.0	168.6	macho	0.00047	0.00049	0.00065	2.9
35	22.5	223.8	macho	0.00115	0.00127	0.00230	3.7
36	21.5	205.7	macho	0.00031	0.00043	0.00072	2.3
37	25.5	262.4	macho	0.00041	0.00042	0.00044	3.6
38	20.5	167.1	macho	0.00037	0.00040	0.00041	2.5

Tabela II: Valores referentes ao cálculo da actividade da redutase da metahemoglobina em *Halobatrachus didactylus*, na presença de nitritos.

[NO ₂ ⁻] (mM)	Indivíduo	Velocidade inicial (s ⁻¹)			Hb (g/dl)
		R1	R2	R3	
1	1	0.00025	0.00025	0.00026	1.8
	2	0.00021	0.00032	0.00062	1.3
	3	0.00020	0.00026	0.00028	0.9
	4	0.00018	0.00022	0.00022	1.3
	5	0.00028	0.00028	0.00029	1.6
3	6	0.00014	0.00015	0.00017	1.1
	7	0.00011	0.00014	0.00014	0.7
	8	0.00030	0.00031	0.00034	2.1
	9	0.00032	0.00039	0.00046	3.3
6	10	0.00032	0.00033	0.00034	2.2
	11	0.00024	0.00025	0.00026	1.2
	12	0.00045	0.00051	0.00060	3.1
	13	0.00014	0.00022	0.00029	1.3
	14	0.00030	0.00036	0.00041	2.6
9	15	0.00031	0.00031	0.00035	2.6
	16	0.00026	0.00028	0.00031	2.2
	17	0.00024	0.00025	0.00026	1.6
	18	0.00018	0.00022	0.00023	1.7
20	19	0.00027	0.00028	0.00033	2.3
	20	0.00019	0.00019	0.00020	1.5

Tabela III: Valores de velocidades iniciais (min^{-1}) da redutase da metahemoglobina referentes à variação de concentração do ferricianeto de potássio em *Halobatrachus didactylus*, na ausência de nitritos.

Indiv.	Ferricianeto de potássio											
	0.1 mM			0.2 mM			0.4 mM			0.6 mM		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	.016	.023	.031	.050	.064	.347	.015	.073	.194	.038	.093	.094
2	.017	.032	.068	.029	.060	.379	.088	.089	.092	.090	.092	.123
3	.049	.050	.064	.052	.064	.075	.054	.092	.131	.044	.058	.059
4	.051	.052	.088	.049	.054	.186	.021	.084	.090	.080	.098	.099
7	.028	.040	.041	.042	.057	.058	.070	.072	.092	.039	.095	.096
9	.065	.067	.073	.064	.065	.134	.070	.072	.074	.098	.100	.101
10	.023	.026	.089	.048	.049	.059	.117	.119	.145	.048	.077	.140
11	.035	.036	.090	.075	.076	.085	.024	.060	.061	.024	.025	.030
12	.039	.040	.093	.042	.048	.112	.034	.081	.090	.029	.029	.030
13	.020	.025	.051	.050	.051	.111	.050	.055	.162	.050	.060	.117
15	.038	.039	.051	.050	.054	.067	.028	.073	.080	.049	.080	.111
29	.012	.034	.040	.040	.043	.138	.046	.092	.124	.066	.098	.100
30	.037	.043	.115	.050	.054	.104	.080	.081	.092	.053	.097	.106
31	.025	.053	.083	.040	.045	.109	.041	.068	.093	.042	.076	.080
32	.021	.040	.069	.043	.046	.046	.059	.069	.072	.090	.095	.118
33	.031	.035	.053	.040	.043	.094	.042	.051	.094	.050	.057	.106
34	.026	.037	.041	.033	.048	.054	.056	.058	.059	.043	.072	.073
35	.014	.050	.051	.068	.076	.244	.028	.065	.067	.030	.073	.116
36	.029	.033	.037	.047	.076	.076	.031	.088	.090	.020	.023	.030
37	.006	.018	.020	.037	.048	.050	.053	.053	.059	.072	.074	.093

Tabela IV: Valores de velocidade iniciais (min^{-1}) da redutase da metahemoglobina referentes à variação de concentração do NADH em *Halobatrachus didactylus*, na ausência de nitritos.

Ind.	NADH														
	0.05 mM			0.1 mM			0.15 mM			0.2 mM			0.25 mM		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	.051	.058	.234	.026	.030	.220	.026	.061	.088	.020	.040	.114	.026	.028	.045
4	.011	.014	.059	.151	.155	.290	.051	.123	.123	.028	.039	.062	.040	.050	.265
5	.028	.077	.228	.100	.148	.150	.043	.123	.130	.025	.045	.154	.018	.020	.053
6	.050	.079	.132	.091	.135	.162	.058	.079	.123	.021	.056	.061	.033	.035	.067
7	.022	.047	.098	.020	.062	.146	.046	.051	.068	.024	.028	.101	.014	.025	.042
8	.018	.079	.114	.025	.031	.036	.025	.040	.042	.068	.071	.080	.023	.026	.033
9	.121	.175	.226	.061	.098	.141	.084	.109	.335	.040	.040	.064	.030	.036	.091
10	.086	.099	.116	.053	.070	.089	.048	.062	.113	.070	.073	.107	.034	.040	.101
11	.097	.132	.138	.044	.059	.089	.043	.059	.148	.043	.043	.072	.022	.035	.086
12	.059	.075	.133	.048	.058	.069	.036	.040	.107	.056	.075	.106	.022	.029	.050
13	.021	.081	.095	.053	.075	.164	.045	.052	.115	.017	.046	.053	.029	.031	.142
14	.100	.155	.160	.053	.123	.228	.032	.065	.066	.028	.041	.079	.026	.054	.084
29	.095	.089	.150	.073	.245	.261	.030	.068	.121	.043	.161	.220	.020	.045	.068
30	.086	.096	.220	.053	.220	.222	.036	.058	.098	.054	.104	.137	.015	.050	.090
31	.075	.011	.175	.135	.281	.937	.040	.062	.096	.045	.109	.178	.018	.046	.078
32	.100	.150	.180	.053	.058	.093	.050	.064	.105	.038	.043	.046	.021	.047	.069
33	.050	.099	.189	.024	.074	.076	.037	.078	.112	.043	.094	.104	.014	.038	.102
34	.031	.082	.084	.051	.052	.055	.031	.054	.061	.033	.037	.048	.015	.036	.036
35	.199	.273	.667	.112	.155	.194	.046	.088	.271	.068	.076	.244	.032	.036	.042
36	.055	.078	.372	.061	.061	.075	.034	.062	.089	.031	.076	.076	.036	.051	.052
37	.057	.060	.099	.061	.082	.089	.029	.048	.128	.034	.037	.048	.034	.067	.170
38	.060	.098	.107	.044	.053	.154	.028	.031	.039	.017	.025	.062	.026	.046	.490

Tabela V: Valores de velocidades iniciais (min^{-1}) da redutase da metahemoglobina referentes à variação de concentração do ferricianeto de potássio em *Halobatrachus didactylus*, na presença de nitritos.

[NO ₂] (mM)	Ind.	Ferricianeto de potássio											
		0.1 mM			0.2 mM			0.4 mM			0.6 mM		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	1	.023	.026	.068	.030	.040	.040	.031	.040	.043	.061	.046	.050
	2	.023	.025	.033	.024	.024	.029	.020	.026	.073	.023	.046	.056
	3	.014	.014	.015	.015	.048	.073	.013	.018	.036	.023	.043	.046
	4	.008	.017	.038	.015	.059	.062	.016	.037	.056	.027	.041	.050
	5	.015	.017	.023	.020	.020	.025	.020	.029	.044	.029	.045	.050
3	6	.017	.040	.095	.016	.020	.029	.042	.052	.064	.039	.052	.078
	7	.007	.018	.070	.006	.011	.011	.020	.025	.046	.030	.037	.048
	8	.020	.043	.059	.023	.031	.035	.025	.040	.064	.027	.053	.060
	9	.018	.020	.048	.023	.034	.040	.032	.045	.175	.037	.045	.050
	10	.021	.029	.241	.026	.028	.037	.025	.049	.051	.034	.038	.048
6	11	.009	.011	.039	.014	.030	.031	.029	.040	.046	.024	.031	.036
	12	.023	.037	.043	.032	.045	.051	.044	.058	.062	.046	.070	.086
	13	.015	.016	.021	.017	.018	.037	.023	.024	.076	.035	.048	.052
	14	.007	.126	.132	.020	.026	.062	.021	.034	.045	.039	.043	.044
	15	.012	.026	.060	.025	.039	.065	.021	.037	.044	.052	.090	.177
9	16	.013	.016	.020	.022	.028	.030	.030	.035	.097	.032	.045	.124
	17	.018	.039	.039	.010	.039	.088	.046	.068	.075	.028	.043	.048
	18	.012	.015	.141	.021	.021	.023	.020	.040	.059	.025	.033	.040
	19	.012	.022	.034	.018	.027	.038	.023	.050	.077	.041	.047	.204
	20	.030	.033	.036	.022	.039	.040	.026	.053	.063	.029	.040	.041

Tabela VI: Valores de velocidades iniciais (min^{-1}) da redutase da metahemoglobina referentes à variação de concentração do NADH em *Halobatrachus didactylus*, na presença de nitritos.

[NO ₂] (mM)	Ind.	NADH														
		0.05 mM			0.1 mM			0.16 mM			0.2 mM			0.25 mM		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	1	.037	.038	.078	.028	.041	.086	.040	.047	.089	.030	.040	.040	.018	.023	.089
	2	.054	.056	.064	.036	.039	.045	.014	.033	.112	.024	.024	.029	.021	.026	.056
	3	.039	.039	.052	.024	.029	.033	.018	.028	.030	.015	.019	.073	.016	.026	.070
	4	.029	.030	.049	.021	.021	.024	.019	.021	.064	.015	.026	.032	.013	.019	.056
	5	.050	.053	.060	.022	.026	.035	.022	.025	.041	.020	.020	.025	.015	.015	.028
3	6	.018	.018	.030	.028	.030	.096	.025	.028	.072	.016	.016	.029	.012	.015	.025
	7	.016	.034	.079	.032	.037	.039	.030	.036	.050	.006	.011	.011	.012	.016	.037
	8	.030	.050	.053	.030	.030	.092	.061	.061	.111	.023	.031	.035	.025	.043	.072
	9	.025	.046	.087	.050	.051	.055	.029	.034	.066	.023	.034	.040	.023	.025	.065
	10	.034	.045	.066	.043	.046	.057	.018	.027	.060	.026	.028	.037	.016	.025	.283
6	11	.028	.034	.035	.025	.027	.061	.014	.017	.027	.016	.020	.030	.011	.012	.015
	12	.027	.031	.052	.035	.038	.042	.026	.063	.157	.032	.045	.050	.020	.026	.055
	13	.017	.039	.040	.026	.028	.048	.028	.039	.039	.012	.017	.018	.010	.014	.034
	14	.030	.059	.108	.020	.048	.071	.025	.037	.083	.026	.042	.049	.009	.046	.053
	15	.029	.042	.045	.030	.038	.072	.035	.036	.042	.035	.039	.065	.018	.038	.044
9	16	.021	.042	.050	.019	.023	.046	.023	.024	.048	.022	.028	.030	.023	.026	.030
	17	.024	.049	.163	.069	.070	.155	.021	.040	.050	.010	.039	.088	.021	.031	.078
	18	.032	.034	.040	.030	.032	.036	.013	.037	.039	.021	.023	.025	.017	.023	.044
	19	.021	.042	.088	.027	.032	.088	.021	.025	.027	.016	.018	.038	.018	.020	.031
	20	.033	.040	.050	.027	.030	.123	.016	.019	.103	.022	.031	.039	.018	.040	.063

Tabela VII: Resumo dos valores calculados referentes à espécie *Halobatrachus didactylus*, na ausência de nitritos.

Ind.	Comp. (cm)	Peso (g)	Sexo	Ferricianeto de potássio		NADH		Actividade enzimática ($\mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$)
				K_M (mM)	V_{max} (min^{-1})	K_M (mM)	V_{max} (min^{-1})	
1	27.0	243.3	macho	0.120	0.103	0.120	0.016	28.0
2	26.0	294.4	fêmea	0.230	0.128	-	-	25.5
3	25.0	222.3	macho	0.130	0.123	-	-	100.5
4	24.0	217.6	fêmea	0.120	0.119	0.102	0.025	22.1
5	23.5	250.9	fêmea	-	-	0.130	0.013	15.6
6	26.0	350.0	fêmea	-	-	0.089	0.027	38.6
7	23.5	249.6	macho	0.140	0.097	0.096	0.013	24.1
8	27.0	296.6	fêmea	-	-	0.036	0.022	46.1
9	25.5	267.3	macho	0.060	0.097	0.041	0.031	31.6
10	24.5	260.4	macho	0.300	0.124	0.031	0.042	20.5
11	25.5	333.3	fêmea	0.130	0.079	0.039	0.032	49.7
12	24.5	280.1	fêmea	0.135	0.093	0.031	0.029	39.2
13	22.0	230.1	macho	0.200	0.079	0.054	0.032	51.1
14	24.0	229.8	macho	-	-	0.047	0.029	37.1
15	23.5	194.7	macho	0.150	0.101	-	-	49.2
16	20.5	155.9	macho	-	-	-	-	65.8
17	21.0	217.0	macho	-	-	-	-	35.7
18	26.5	332.7	macho	-	-	-	-	73.2
19	22.0	165.9	macho	-	-	-	-	58.8
20	20.0	119.1	macho	-	-	-	-	22.5
21	24.0	249.3	fêmea	-	-	-	-	39.4
22	27.5	364.0	macho	-	-	-	-	32.4
23	26.0	371.5	macho	-	-	-	-	36.6
24	26.0	347.3	fêmea	-	-	-	-	60.8
25	22.5	306.7	macho	-	-	-	-	29.6
26	23.5	254.7	fêmea	-	-	-	-	57.6
27	21.5	187.0	fêmea	-	-	-	-	66.2
28	21.5	175.2	fêmea	-	-	-	-	53.1
29	24.0	231.4	fêmea	0.130	0.082	0.140	0.010	77.5
30	25.0	230.0	macho	0.180	0.123	0.130	0.013	50.7
31	23.0	243.0	fêmea	0.150	0.095	0.130	0.015	16.5
32	22.5	210.1	fêmea	0.130	0.093	0.074	0.017	60.0
33	20.0	168.4	macho	0.088	0.064	0.134	0.008	48.6
34	22.0	168.6	macho	0.090	0.072	0.038	0.030	21.6
35	22.5	223.8	macho	0.210	0.099	0.063	0.049	33.1
36	21.5	205.7	macho	0.100	0.110	0.022	0.047	53.3
37	25.5	262.4	macho	0.270	0.089	0.070	0.024	11.8
38	20.5	167.1	fêmea	-	-	0.039	0.021	15.8

Tabela VIII: Resumo dos valores calculados referentes à espécie *Halobatrachus didactylus*, na presença de nitritos.

[NO ₂] (mM)	Indiv.	Ferricianeto de potássio		NADH		Actividade enzimática ($\mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$)
		K_M (mM)	V_{max} (min^{-1})	K_M (mM)	V_{max} (min^{-1})	
1	1	0.090	0.051	0.056	0.018	13.40
	2	0.116	0.055	0.036	0.021	23.74
	3	0.176	0.042	0.020	0.029	27.87
	4	0.164	0.053	0.020	0.018	16.32
	5	0.194	0.046	0.034	0.017	16.88
3	6	0.116	0.046	0.044	0.012	14.91
	7	0.160	0.047	0.064	0.015	19.29
	8	0.156	0.056	0.024	0.028	14.24
	9	0.196	0.067	0.064	0.019	13.47
	10	0.116	0.047	0.026	0.024	14.47
6	11	0.124	0.050	0.041	0.010	20.01
	12	0.142	0.083	0.026	0.023	14.00
	13	0.140	0.033	0.022	0.022	16.32
	14	0.160	0.049	0.020	0.038	13.36
	15	0.136	0.064	0.016	0.032	11.50
9	16	0.120	0.046	0.026	0.020	12.28
	17	0.124	0.089	0.030	0.026	15.07
	18	0.198	0.045	0.030	0.020	12.48
	19	0.160	0.060	0.039	0.017	11.74
	20	0.100	0.066	0.025	0.020	12.22

Tabela IX: Valores referentes ao cálculo da actividade da redutase da metahemoglobina em *Sparus aurata*, na ausência de nitritos.

Indivíduo	Comprimento (cm)	Peso (g)	Sexo	Velocidade Inicial (s ⁻¹)			Hb (g/dl)
				R1	R2	R3	
1	24.0	281.0	macho	0.00129	0.00148	0.00152	3.0
2	25.0	358.3	macho	0.00055	0.00079	0.00094	3.0
3	24.5	239.2	macho	0.00035	0.00113	0.00119	3.6
4	26.0	387.6	macho	0.00040	0.00054	0.00076	2.8
5	25.5	346.3	macho	0.00173	0.00184	0.00188	3.7
6	2.5	275.9	macho	0.00075	0.00126	0.00152	4.4
7	24.5	254.7	macho	0.00084	0.00157	0.00157	4.7
8	24.5	309.7	macho	0.00117	0.00127	0.00142	3.2
9	24.0	321.4	macho	0.00061	0.00079	0.00109	3.7
10	24.0	314.0	macho	0.00076	0.00092	0.00119	4.2
11	25.0	329.1	macho	0.00110	0.00175	0.00192	3.7
12	23.5	255.7	macho	0.00032	0.00071	0.00085	4.0
13	24.0	305.0	macho	0.00107	0.00120	0.00196	3.5
14	25.0	282.4	macho	0.00058	0.00095	0.00090	4.1
15	28.0	445.7	macho	0.00131	0.00133	0.00153	5.3
16	24.0	299.4	macho	0.00121	0.00132	0.00142	4.3
17	26.0	364.4	macho	0.00099	0.00126	0.00148	3.7
18	23.0	241.4	macho	0.00099	0.00118	0.00126	3.4
19	28.5	504.3	macho	0.00059	0.00068	0.00092	5.9
20	28.5	480.5	macho	0.00061	0.00094	0.00114	3.9
21	27.5	474.9	macho	0.00074	0.00101	0.00156	4.2
22	24.5	277.3	macho	0.00118	0.00124	0.00146	3.5
23	24.0	271.0	macho	0.00080	0.00113	0.00124	4.3

Tabela X: Valores referentes ao cálculo da actividade da redutase da metahemoglobina em *Sparus aurata*, na presença de nitritos.

[NO ₂ ⁻] (mM)	Indivíduo	Velocidade Inicial (s ⁻¹)			Hb (g/dl)
		R1	R2	R3	
1	1	0.00030	0.00082	0.00083	2.6
	2	0.00093	0.00104	0.00117	3.7
	3	0.00032	0.00057	0.00066	1.8
	4	0.00037	0.00050	0.00153	3.2
	5	0.00073	0.00097	0.00177	4.0
3	6	0.00046	0.00097	0.00113	3.0
	7	0.00045	0.00073	0.00083	3.9
	8	0.00050	0.00055	0.00078	2.1
	9	0.00044	0.00044	0.00068	3.0
	10	0.00054	0.00075	0.00114	2.1
6	11	0.00032	0.00043	0.00050	1.7
	12	0.00032	0.00054	0.00056	3.4
	13	0.00026	0.00038	0.00039	2.6
	14	0.00044	0.00046	0.00195	1.4
	15	0.00059	0.00090	0.00091	3.9
9	16	0.00039	0.00054	0.00057	3.8
	17	0.00046	0.00083	0.00093	2.8
	18	0.00042	0.00068	0.00070	3.5
	19	0.00050	0.00069	0.00084	3.0
	20	0.00062	0.00063	0.00063	3.4

Tabela XI: Valores de velocidades iniciais (min^{-1}) da redutase da metahemoglobina referentes à variação de concentração do ferricianeto de potássio em *Sparus aurata*, na ausência de nitritos.

Indiv.	Ferricianeto de potássio											
	0.1 mM			0.2 mM			0.4 mM			0.6 mM		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	.045	.056	.059	.164	.175	.263	.114	.123	.186	.147	.176	.181
2	.041	.081	.128	.082	.084	.222	.046	.115	.177	.131	.139	.142
3	.059	.087	.119	.100	.115	.141	.074	.134	.180	.050	.105	.117
4	.037	.087	.140	.063	.102	.198	.080	.115	.252	.070	.150	.159
5	.036	.087	.136	.102	.123	.250	.134	.139	.146	.131	.155	.186
6	.050	.091	.127	.050	.126	.194	.053	.096	.096	.127	.133	.155
7	.014	.059	.170	.023	.054	.072	.111	.151	.230	.136	.167	.366
8	.042	.104	.230	.065	.079	.238	.147	.148	.164	.090	.161	.170
9	.018	.060	.064	.022	.059	.134	.094	.119	.183	.085	.154	.183
10	.048	.072	.093	.074	.127	.153	.050	.098	.101	.120	.155	.158
11	.063	.084	.148	.028	.037	.198	.095	.178	.211	.152	.208	.459
12	.050	.050	.136	.061	.091	.093	.158	.160	.166	.160	.166	.224
13	.028	.071	.168	.040	.046	.053	.103	.123	.160	.147	.179	.234
14	.040	.129	.249	.040	.069	.088	.127	.189	.277	.179	.235	.297
15	.048	.062	.065	.053	.090	.148	.058	.067	.112	.072	.075	.093
16	.054	.091	.118	.083	.104	.174	.114	.137	.208	.095	.104	.138
17	.074	.119	.209	.034	.081	.083	.080	.086	.098	.099	.187	.227
18	.056	.072	.120	.072	.109	.109	.078	.150	.159	.088	.190	.408
19	.046	.075	.079	.066	.102	.122	.103	.152	.187	.072	.126	.194
20	.004	.093	.231	.084	.091	.126	.031	.062	.098	.081	.086	.089
21	.034	.077	.103	.057	.101	.101	.109	.109	.118	.110	.130	.140
22	.043	.082	.104	.034	.095	.135	.101	.111	.147	.092	.117	.122
23	.061	.083	.104	.055	.095	.170	.073	.133	.179	.087	.127	.132

Tabela XII: Valores de velocidade iniciais (min^{-1}) da redutase da metahemoglobina referentes à variação de concentração do NADH em *Sparus aurata*, na ausência de nitritos.

Ind.	NADH														
	0.05 mM			0.1 mM			0.15 mM			0.2 mM			0.25 mM		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	.154	.159	.165	.049	.106	.119	.032	.106	.158	.096	.175	.263	.046	.064	.114
2	.138	.185	.413	.080	.144	.158	.029	.137	.147	.083	.084	.222	.052	.073	.086
3	.111	.154	.175	.040	.148	.162	.055	.102	.193	.058	.084	.141	.015	.054	.070
4	.084	.086	.356	.019	.077	.081	.025	.053	.095	.032	.043	.045	.068	.069	.151
5	.065	.103	.181	.019	.052	.186	.066	.076	.106	.036	.048	.102	.040	.047	.097
6	.027	.136	.207	.074	.083	.091	.073	.148	.222	.039	.050	.194	.020	.045	.079
7	.020	.046	.330	.126	.269	.565	.100	.107	.188	.023	.054	.072	.068	.219	.239
8	.164	.217	.296	.053	.122	.208	.052	.071	.105	.065	.079	.238	.069	.081	.114
9	.036	.209	.219	.015	.044	.066	.046	.062	.199	.022	.059	.134	.055	.061	.112
10	.105	.110	.160	.037	.096	.166	.043	.056	.217	.074	.127	.153	.039	.057	.123
11	.073	.131	.204	.103	.120	.255	.155	.249	.284	.028	.057	.198	.048	.104	.277
12	.039	.231	.399	.032	.061	.078	.029	.106	.162	.050	.061	.091	.028	.092	.128
13	.100	.203	.220	.080	.115	.138	.075	.095	.100	.040	.046	.053	.078	.122	.180
14	.063	.133	.153	.088	.125	.173	.115	.120	.137	.040	.069	.088	.060	.064	.081
15	.143	.164	.204	.086	.135	.137	.079	.111	.121	.053	.090	.148	.041	.047	.081
16	.089	.090	.173	.195	.202	.241	.039	.074	.088	.083	.104	.174	.065	.068	.262
17	.100	.115	.212	.043	.093	.117	.075	.095	.107	.034	.081	.083	.026	.076	.076
18	.116	.179	.344	.092	.098	.177	.063	.113	.319	.072	.109	.109	.104	.122	.141
19	.106	.138	.170	.092	.101	.141	.100	.100	.131	.066	.079	.084	.044	.059	.078
20	.136	.136	.183	.093	.114	.134	.093	.105	.161	.084	.085	.091	.030	.053	.071
21	.126	.205	.274	.091	.134	.146	.065	.084	.097	.057	.073	.101	.044	.059	.078
22	.088	.133	.148	.054	.115	.145	.076	.110	.125	.095	.135	.202	.045	.071	.073
23	.125	.178	.204	.091	.108	.166	.068	.075	.144	.055	.067	.095	.007	.065	.073

Tabela XIII: Valores de velocidades iniciais (min^{-1}) da redutase da metahemoglobina referentes à variação de concentração do ferricianeto de potássio em *Sparus aurata*, na presença de nitritos.

[NO ₂] (mM)	Ind.	Ferricianeto de potássio											
		0.1 mM			0.2 mM			0.4 mM			0.6 mM		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	1	.053	.079	.258	.055	.089	.119	.081	.148	.169	.108	.134	.189
	2	.103	.110	.121	.072	.148	.150	.167	.177	.208	.073	.080	.101
	3	.046	.060	.069	.045	.048	.054	.065	.089	.090	.080	.103	.105
	4	.062	.090	.248	.029	.114	.299	.088	.126	.130	.114	.128	.292
	5	.042	.065	.147	.106	.128	.130	.083	.158	.162	.121	.130	.244
3	6	.069	.099	.158	.045	.084	.090	.105	.152	.154	.090	.130	.133
	7	.073	.079	.143	.036	.074	.080	.144	.147	.310	.130	.143	.199
	8	.042	.046	.125	.058	.131	.132	.090	.092	.094	.042	.045	.050
	9	.048	.102	.112	.057	.102	.110	.050	.169	.201	.145	.162	.250
	10	.100	.104	.153	.057	.057	.068	.032	.102	.105	.104	.116	.120
6	11	.023	.124	.285	.019	.100	.101	.068	.120	.122	.067	.158	.160
	12	.092	.100	.156	.042	.069	.070	.056	.102	.110	.136	.140	.163
	13	.065	.086	.090	.087	.101	.110	.064	.073	.080	.062	.138	.153
	14	.015	.069	.123	.033	.119	.120	.083	.134	.173	.064	.081	.090
	15	.078	.117	.123	.072	.086	.157	.108	.137	.166	.117	.125	.192
9	16	.031	.098	.136	.061	.076	.080	.021	.101	.106	.144	.156	.187
	17	.038	.115	.140	.037	.072	.084	.083	.085	.140	.105	.112	.147
	18	.075	.087	.283	.061	.066	.120	.046	.123	.159	.084	.097	.181
	19	.046	.093	.115	.051	.107	.110	.068	.137	.140	.061	.133	.140
	20	.040	.081	.122	.100	.108	.110	.125	.131	.138	.117	.149	.150

Tabela XIV: Valores de velocidades iniciais (min^{-1}) da redutase da metahemoglobina referentes à variação de concentração do NADH em *Sparus aurata*, na presença de nitritos.

[NO ₂] (mM)	Ind.	NADH														
		0.05 mM			0.1 mM			0.15 mM			0.2 mM			0.25 mM		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	1	.153	.174	.186	.136	.151	.200	.154	.163	.343	.027	.089	.119	.060	.068	.070
	2	.162	.166	.268	.138	.186	.325	.167	.193	.217	.130	.138	.140	.084	.133	.134
	3	.053	.124	.132	.064	.090	.100	.156	.170	.181	.045	.046	.054	.072	.099	.184
	4	.093	.157	.393	.093	.170	.265	.170	.175	.291	.021	.114	.299	.101	.104	.199
	5	.112	.123	.246	.105	.184	.286	.119	.143	.290	.061	.106	.128	.097	.108	.224
3	6	.119	.156	.160	.120	.148	.194	.072	.133	.169	.045	.084	.090	.050	.051	.167
	7	.151	.215	.249	.128	.158	.197	.093	.134	.366	.036	.074	.080	.060	.078	.080
	8	.087	.114	.115	.062	.109	.110	.073	.116	.147	.045	.058	.131	.082	.118	.130
	9	.131	.149	.236	.135	.154	.386	.206	.277	.312	.037	.057	.061	.128	.128	.265
	10	.131	.149	.236	.130	.146	.156	.080	.083	.162	.057	.057	.068	.032	.062	.076
6	11	.050	.082	.106	.047	.077	.135	.064	.117	.159	.030	.039	.042	.032	.064	.081
	12	.081	.185	.200	.073	.134	.275	.147	.159	.205	.031	.069	.072	.040	.050	.126
	13	.110	.281	.389	.072	.115	.129	.117	.159	.162	.062	.087	.123	.043	.054	.125
	14	.080	.112	.213	.046	.050	.064	.067	.105	.156	.015	.119	.233	.037	.045	.075
	15	.169	.189	.211	.147	.149	.246	.107	.139	.183	.072	.086	.157	.103	.122	.125
9	16	.123	.178	.185	.114	.192	.216	.100	.118	.178	.023	.061	.073	.064	.084	.157
	17	.130	.167	.207	.074	.142	.148	.086	.116	.168	.037	.072	.084	.069	.074	.100
	18	.143	.191	.309	.143	.166	.182	.085	.144	.185	.061	.066	.120	.101	.128	.168
	19	.129	.183	.225	.183	.195	.292	.093	.119	.156	.020	.051	.107	.090	.118	.137
	20	.133	.210	.211	.138	.186	.190	.125	.142	.145	.100	.108	.110	.065	.115	.120

Tabela XV: Resumo dos valores calculados referentes à espécie *Sparus aurata*, na ausência de nitritos.

Ind.	Comp. (cm)	Peso (g)	Sexo	Ferricianeto de potássio		NADH		Actividade enzimática ($\mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$)
				K_M (mM)	V_{max} (min^{-1})	K_M (mM)	V_{max} (min^{-1})	
1	24.0	281.0	macho	0.260	0.206	0.032	0.056	47.6
2	25.0	358.3	macho	0.216	0.176	0.046	0.062	25.4
3	24.5	239.2	macho	0.088	0.165	0.058	0.057	30.3
4	26.0	387.6	macho	0.060	0.133	0.012	0.066	18.6
5	25.5	346.3	macho	0.126	0.201	0.030	0.041	48.0
6	23.5	275.9	macho	0.064	0.149	0.028	0.060	27.6
7	24.5	254.7	macho	0.328	0.258	0.090	0.029	32.2
8	24.5	309.7	macho	0.072	0.179	0.036	0.066	38.3
9	24.0	321.4	macho	0.224	0.198	0.038	0.052	20.6
10	24.0	314.0	macho	0.068	0.170	0.030	0.046	21.1
11	25.0	329.1	macho	0.252	0.296	0.014	0.098	45.6
12	23.5	255.7	macho	0.282	0.244	0.034	0.079	17.1
13	24.0	305.0	macho	0.198	0.211	0.032	0.074	33.1
14	25.0	282.4	macho	0.088	0.243	0.029	0.059	22.4
15	28.0	445.7	macho	0.056	0.096	0.034	0.080	24.2
16	24.0	299.4	macho	0.072	0.156	0.014	0.064	29.6
17	26.0	364.4	macho	0.058	0.154	0.022	0.071	32.8
18	23.0	241.4	macho	0.228	0.236	0.024	0.096	33.5
19	28.5	504.3	macho	0.096	0.148	0.034	0.058	11.2
20	28.5	480.5	macho	0.096	0.186	0.021	0.083	23.3
21	27.5	474.9	macho	0.092	0.149	0.059	0.051	23.2
22	24.5	277.3	macho	0.060	0.129	0.012	0.101	34.2
23	24.0	271.0	macho	0.068	0.144	0.037	0.055	25.4

Tabela XVI: Resumo dos valores calculados referentes à espécie *Sparus aurata*, na presença de nitritos.

[NO ₂] (mM)	Indiv.	Ferricianeto de potássio		NADH		Actividade enzimática ($\mu\text{mol NAD}^+/\text{min/gHb}$)
		K_M (mM)	V_{max} (min^{-1})	K_M (mM)	V_{max} (min^{-1})	
1	1	0.096	0.156	0.046	0.064	30.42
	2	0.1	0.224	0.04	0.11	27.11
	3	0.096	0.121	0.022	0.068	30.55
	4	0.056	0.143	0.02	0.096	15.07
	5	0.078	0.193	0.03	0.088	23.39
3	6	0.088	0.186	0.028	0.065	31.19
	7	0.108	0.168	0.021	0.112	18.06
	8	0.068	0.09	0.028	0.05	25.26
	9	0.096	0.2	0.02	0.118	14.15
	10	0.098	0.137	0.03	0.062	34.45
6	11	0.056	0.196	0.024	0.06	28.37
	12	0.068	0.157	0.022	0.106	15.32
	13	0.08	0.157	0.038	0.07	14.1
	14	0.113	0.178	0.024	0.07	31.69
	15	0.098	0.154	0.018	0.124	22.26
9	16	0.076	0.176	0.03	0.076	13.71
	17	0.158	0.131	0.02	0.1	28.59
	18	0.068	0.144	0.034	0.11	18.74
	19	0.08	0.16	0.02	0.109	22.19
	20	0.104	0.166	0.044	0.103	17.87