

1 Introdução

Historicamente as civilizações, desde os tempos mais remotos, habitaram preferencialmente as margens de corpos hídricos, tais como rios, lagos, lagoas, lagoas, estuários e regiões litorâneas, devido à necessidade de água e de seus recursos vivos e minerais para a sobrevivência das populações humanas, e da importância dos corpos hídricos para a navegação. Por esses motivos, os maiores adensamentos populacionais localizam-se nas regiões litorâneas e ao redor de corpos d'água em todo o mundo (Diamond, 2001; Weber, 1992).

Em escala mundial, o aumento da população e a era industrial fizeram surgir um grande número de compostos químicos orgânicos sintéticos que são persistentes e causam efeitos adversos ao ambiente (Tanabe & Tatsukawa, 1991; Rocha *et al.*, 2004). O elevado desenvolvimento industrial ocorrido nas últimas décadas tem sido um dos principais responsáveis pela crescente contaminação ambiental (Loureiro, *et al.* 2005). Desse modo, os ambientes aquáticos, que são habitat de muitos organismos da fauna e da flora e comportam uma alta diversidade de espécies, ficam vulneráveis ao impacto das atividades antropogênicas (lançamentos de efluentes e emissões urbanas, rurais e industriais), seja pelo simples aporte de matéria orgânica, seja pelo aporte de contaminantes orgânicos ou inorgânicos, sintéticos ou naturais (Weber, 1992). Neste cenário, podemos citar contaminações por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e por metais pesados.

A atividade industrial tem contribuído muito para um aumento significativo nas concentrações de íons metálicos em águas, representando uma importante fonte de contaminação dos corpos aquáticos, principalmente quando consideramos que tais íons podem ser disseminados via cadeia alimentar (Jimenez, Dal Bosco & Carvalho, 2004).

Uma vez no ecossistema aquático, os metais pesados são distribuídos nos diversos compartimentos do ambiente, como solo, sedimento, plantas e animais (Santana & Barroncas, 2007). A mensuração de metais pesados em organismos aquáticos pode ser considerada um importante bioindicador do impacto que estes elementos causam na saúde do organismo e do ecossistema (Krishnauker *et al.*, 1994).

Os combustíveis fósseis são as principais fontes de obtenção de energia para a civilização atual e o crescente aumento do consumo mundial tem acarretado a sua introdução no ambiente marinho (Marques Jr., 2002). Nesse ambiente, processa-se a maior parte do transporte e o desembarque do petróleo do mundo, atividades essas que aumentam a probabilidade de serem verificados acidentes com tais produtos. Esses acidentes causam diferentes tipos de impacto em vários ecossistemas marinhos mundiais, através de eventos crônicos ou críticos de contaminação, daí a necessidade de um estudo constante desses ambientes (Douglas, 2005).

Quantidades consideráveis de produtos de petróleo são descarregados para o ambiente marinho através de vazamentos, efluentes industriais e domésticos, escoamento da água da chuva, embarcações marítimas, entre outros (Readman *et. al.*, 2002). A composição química do petróleo, conforme Freedman (1995) e Marques Jr. (2002), é complexa, variável e extremamente influenciada por condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente de formação. O petróleo natural é uma mistura de compostos inorgânicos e orgânicos, principalmente hidrocarbonetos, que são, quantitativamente, os seus mais importantes constituintes (Douglas, 2005), e a concentração desses compostos no ambiente sofre mudanças significativas devido à dissolução, evaporação, oxidação química e fotoquímica e biodegradação (Readman *et. al.*, 2002).

Os hidrocarbonetos de petróleo e de origem pirolítica merecem atenção pelos seus aportes globais ao ambiente, tanto por fontes difusas e agudas, causando efeitos letais ou subletais aos organismos, como pelo fato de afetarem significativamente habitats que suportam importantes ecossistemas aquáticos (Clark, 2001).

Os hidrocarbonetos presentes nos ecossistemas aquáticos são originados de várias fontes, as quais podem ser agrupadas nas seguintes categorias (UNEP/IOC/IAEA, 1992; Clark, 2001): 1) aportes de petróleo e produtos derivados; 2) aportes de efluentes domésticos e industriais; 3) hidrocarbonetos, especialmente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), liberados como resultado da combustão parcial de combustíveis; 4) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) originados da queima de florestas e pastagens; 5) biossíntese de hidrocarbonetos por organismos marinhos e terrestres; 6) transformação diagenética de produtos naturais não-hidrocarbonetos para hidrocarbonetos.

Em regiões altamente urbanizadas e industrializadas, os HPA são frequentemente encontrados associados ao particulado atmosférico e aos ambientes aquáticos devido à exaustão de veículos e a emissão de poluentes pelas indústrias (Stefens, 2006).

A Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* – EPA) dos Estados Unidos lista vários hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) como compostos poluentes de prioridade ambiental e que devem ser freqüentemente monitorados em efluentes industriais, devido ao fato de serem considerados carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, além de possuírem efeitos tóxicos aos seres vivos (Keith & Telliard, 1979; Eisler, 1987; Odum, 1988; Lijinsky, 1991; Kennish, 1992) e terem a capacidade de se bioacumularem nas diferentes cadeias alimentares (Godsy, 1983; Marques Jr., 2002). Por isso existe um interesse crescente de se entender o destino e as formas de desaparecimento dos hidrocarbonetos para que haja o desenvolvimento de métodos mais eficientes de remoção dos mesmos do meio ambiente.

No Brasil a avaliação da qualidade dos cursos d'água é baseada em análises físicas e químicas, o que nos limita à identificação de contaminantes sem qualquer informação do efeito destas substâncias sobre a biota. Torna-se, então, necessário desenvolver os conhecimentos e as técnicas sobre biomarcadores que possam proteger os ecossistemas contra rejeitos e subprodutos originados da expansão industrial.

Os peixes são animais bastante diversificados tanto nos aspectos morfo-fisiológicos quanto bioquímicos. Comparar respostas bioquímicas, citológicas e histopatológicas entre organismos controle retirados de áreas desprovidas de poluentes e organismos de áreas com suspeita de contaminação pode ser útil para determinar a qualidade do ecossistema (Camargo & Martinez, 2006; Fossi & Leonzio, 1994; Mc Carthy & Shugart, 1990).

1.1.

Uso de bioindicadores e biomarcadores de contaminação ambiental

O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas vem sendo amplamente utilizado nas últimas décadas (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005).

Bioindicadores são definidos como uma espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (Adams, 2002). Já os biomarcadores são alterações biológicas que expressam a exposição e/ou o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente (Walker *et al.*, 2005). Um biomarcador eficiente deve apresentar grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (Stegeman *et al.*, 1992;

Katsumiti, 2006). Os biomarcadores são ferramentas eficientes e de baixo custo para monitoramento e identificação de riscos ambientais a organismos aquáticos (Rodríguez-Fuentes & Gold-Buochot, 2000).

Os efeitos do óleo sobre os organismos marinhos podem ser divididos em efeitos físicos, resultantes do recobrimento dos organismos por óleo e, efeitos químicos, associados à toxicidade dos compostos presentes. Estes efeitos não são excludentes, podendo ocorrer simultaneamente. Nos óleos de alta densidade, o efeito físico de recobrimento é predominante, enquanto nos óleos de baixa densidade o efeito químico é mais representativo (CETESB, 2008).

É consenso geral que, além da anoxia, o despejo de substâncias tóxicas pelas atividades de exploração petrolífera é um dos principais responsáveis pelo estresse que os peixes passam. Os mais evidentes efeitos são os letais, como intervenção no funcionamento das brânquias, causando seu colapso, e o contato e a ingestão (em áreas restritas ou fechadas), causando sua morte. Já os efeitos sub-letais são os mais significativos para os peixes, pois causam alterações na alimentação, migração, crescimento e reprodução das espécies (Monteiro, 2003).

O uso de biomarcadores é sugerido como uma estratégia adequada para estudar efeitos subletais de poluentes, provendo uma indicação o mais cedo possível de possíveis efeitos adversos em organismos (Hugget, *et al.*, 1992).

1.2. A Acetilcolinesterase (AChE) e sua importância em estudos de monitoramento ambiental

A acetilcolinesterase presente no tecido nervoso é o mediador químico necessário para transmissão do impulso nervoso e é responsável pela degradação da acetilcolina, um dos mais importantes neurotransmissores, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico.

A atividade da acetilcolinesterase no cérebro de peixes foi amplamente utilizada durante as décadas de 60 e 70 como um biomarcador para determinar a zona de impacto durante operações de pulverização de pesticidas em larga escala, porém o seu uso entrou em declínio durante a década de 80, talvez pelo fato de métodos analíticos para determinação de organofosforados e carbamatos terem se tornado mais acessíveis.

Durante a década de 90 surgiu um novo interesse no uso de AChE como biomarcador, pois surgiram evidências que a atividade da AChE em peixes mostrou

inibição em locais não obviamente contaminados por pesticidas e outras substâncias anti-colinérgicas (Galgani, Bocquene & Cadiou, 1992; Payne *et al.*, 1996), e, embora ainda não tenha sido identificada a causa química desta inibição, a AChE está atualmente sendo muito utilizada como um método de identificação de locais potencialmente contaminados que podem ser examinados mais detalhadamente usando os métodos da química analítica (Kirby *et al.*, 2000).

A atividade da acetilcolinesterase, portanto, tem sido usada como um biomarcador enzimático de contaminação neurotóxica em estudos de monitoramento ambiental (Kirby *et al.*, 2000; Rodríguez-Fuentes & Gold-Bouchot, 2000). Este grupo de enzimas tem tradicionalmente sido considerado como biomarcador do efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos, mas recentemente se descobriu que outras substâncias possuem ação semelhante na resposta da AChE, como alguns metais pesados e produtos derivados de petróleo, sendo inibidores da AChE em organismos marinhos. Dentre estes compostos ambientais, alguns metais pesados e produtos derivados de petróleo, como HPA, têm sido descritos como inibidores da acetilcolinesterase em organismos marinhos (Chamber *et al.*, 1978; Sheehan, Crimmins & Burnell, 1991; Bocquené *et al.*, 1995; Martinez-Tabche *et al.*, 1997; Mora, Fournier & Narbonne, 1999; Akcha *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2004; Cunha, Garcia & Guilhermino, 2005), e em estudos “*in vitro*” (Kang and Fang, 1997; Jett *et al.*, 1999). Porém, pouco se sabe sobre os efeitos de HPA na fisiologia de organismos aquáticos e/ou a resposta da atividade de AChE à exposições acidentais.

A mensuração das atividades de AChE em peixes tem sido sugerida como um biomarcador diagnóstico, onde as atividades reduzidas indicam contaminação do local por substâncias anti-colinérgicas (Weiss & Gakstatter, 1964; Coppage & Braidech, 1976).

As acetilcolinesterases são categorizadas em dois grupos principais, as acetilcolinesterases (AChE) e as butirilcolinesterases (BChE). A BChE possui estrutura molecular similar a AChE mas é caracterizada pela especificidade a diferentes substratos, hidrolizando a butilcolina, enquanto a AChE hidroliza preferencialmente acetil ésteres como a acetiltiocolina (Andreescu & Marty, 2006). Outro aspecto que distingue estas duas enzimas é a inibição da AChE pelo excesso de substrato.

O tecido de cérebro de peixe contém apenas atividade de AChE, e a BChE é encontrada em tecido muscular. Portanto, é essencial uma caracterização cuidadosa do material a ser usado em análises e em atividades de monitoramento (Sturm *et al.*, 1999, Jung, Addison & Shim, 2007).

A toxicidade destes compostos é devido à inibição da acetilcolinesterase do cérebro (AChE). A acetilcolinesterase no tecido nervoso é responsável pela degradação da acetilcolina, um dos neurotransmissores mais importantes do sistema nervoso central e do periférico. Quando a atividade da AChE decresce, a acetilcolina não é quebrada e se acumula nas sinapses, causando um declínio geral no controle muscular e neural (Dutta e Arends, 2003).

Kang e Fang (1997) demonstraram que diversos HPAs (pireno, benzo(a)pireno, fluoranteno e antraceno) são inibidores mais fracos da AChE “in vitro”, estabelecendo a hipótese de que os HPAs com 3 ou mais anéis aromáticos são inibidores mais potentes da AChE (ou seja, causam efeitos negativos na atividade da AChE, reduzindo a sua atividade). Portanto, estudos “in vivo” são necessários para determinar a relevância toxicológica destes resultados “in vitro”.

1.2.1.

Mecanismo de funcionamento da Acetilcolinesterase (AChE)

Para que ocorra a transmissão sináptica é necessário que a acetilcolina seja liberada na fenda sináptica e se ligue a um receptor pós-sináptico. Em seguida, a acetilcolina disponível é hidrolizada pela acetilcolinesterase (figura 1).

A inibição da acetilcolinesterase leva a um acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas do sistema nervoso, resultando em estímulo excessivo dos receptores pós-sinápticos colinérgicos (Sturm *et al.*, 2007), o que pode levar a danos ao organismo.

Na superfície da colinesterase existe um centro ativo para inativação da acetilcolina que contém um sítio aniônico e um esterásico. A inibição da colinesterase se dá através da ligação do composto inibidor com o centro esterásico da enzima. Há uma posterior hidrólise destes compostos e então a enzima é regenerada. A taxa de regeneração, se ocorrer, varia de acordo com o composto.

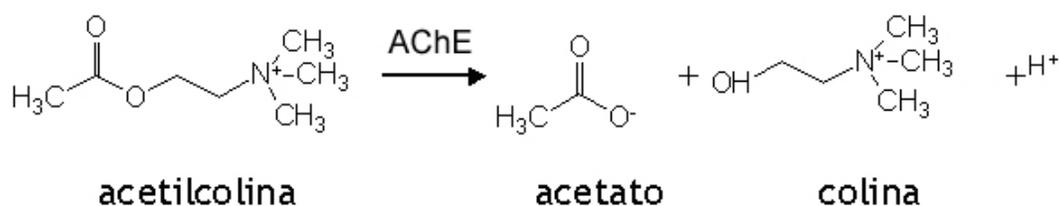


Figura 1. Degradação da acetilcolina promovida pela ação catalítica da acetilcolinesterase

1.2.2.

Metodologia enzimática de determinação da atividade de Acetilcolinesterase (AChE)

As técnicas que utilizam a medida da atividade catalítica das enzimas colinesterases são procedimentos analíticos de custo mais baixo que as técnicas convencionais e apresentam sensibilidade adequada com relação à análise de material clínico e ambiental.

A metodologia desenvolvida por Ellman *et al.* (1961) envolve a medição da atividade catalítica da acetilcolinesterase a partir da variação de absorvância do produto formado na reação de hidrólise da molécula de acetiltiocolina. A medida espectrofotométrica permite a quantificação da variação da atividade da acetilcolinesterase e possíveis sinais de inibição. Desde o seu desenvolvimento, esta metodologia se tornou uma alternativa na avaliação da atividade enzimática da AChE e na determinação de substâncias anticolinérgicas (como pesticidas organofosforados e carbamatos e alguns HPA).

O princípio deste método é a medição da velocidade de produção de colina quando a acetilcolina é hidrolisada. Esta é acompanhada pela reação contínua do tiol com o íon 5:5 – ditiobis-2-2 nitrobenzoato para produzir o ânion de 5-tiol-2-nitrobenzoato.

Nostrand *et al.* (1993) propuseram modificações no método de Ellman (1961), entre as quais cita-se a utilização de microplacas de 96 poços para as medições espectrofotométricas.

As colinesterases extraídas de *Drosophila melanogaster*, enguia elétrica e ratos estão disponíveis comercialmente.

1.3.

Biotransformação de xenobióticos em peixes

Para assegurar sua sobrevivência, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa para a proteção de suas células na presença de xenobióticos, que envolvem a absorção, distribuição, biotransformação e excreção dessas substâncias estranhas.

O órgão mais comumente envolvido no processo de biotransformação (metabolização) é o fígado. Este processo geralmente leva à formação de compostos mais polares, portanto, mais hidrofílicos, e, conseqüentemente, mais facilmente excretados que o composto original.

A biotransformação geralmente envolve dois estágios distintos, referidos como reações da Fase I e da Fase II (Figura 2). Na Fase I, a biotransformação de xenobióticos ocorre através de reações de redução, hidrólise e/ou oxidação, sendo responsáveis por

introduzir grupos funcionais no xenobiótico (Livingstone, 1998). A principal reação nesta fase do processo é a oxidação, catalisada principalmente pelo citocromo P-450 monooxigenase, pelas monoamino oxidases e pelas flavinas monooxigenase (Bastos, 2006). As reações de hidrólise são catalisadas principalmente pelas epóxido hidrolases, peptidases e A-estearases. As reduções são catalisadas por várias enzimas, dentre elas as carbonil redutases e as glutathion redutases, como também por processos não enzimáticos através de agentes redutores (Bastos, 2006).

A Fase II freqüentemente envolve reações de conjugação na tentativa de neutralizar o xenobiótico presente, catalisadas pelas glutathion S-transferases (GST), uridina difosfoglicuronosil transferases (UGT) e sulfotransferases (ST) (Bastos, 2006).

Em geral, o aumento da polaridade da molécula leva à perda do potencial tóxico do composto, levando a desintoxicação. Porém, em alguns casos, pode ocorrer a ativação metabólica da molécula e o xenobiótico pode ser convertido em um produto com maior potencial tóxico (bioativação).

Essa biotransformação ocorre em peixes, muitas vezes levando à excreção dos xenobióticos através da bÍlis.

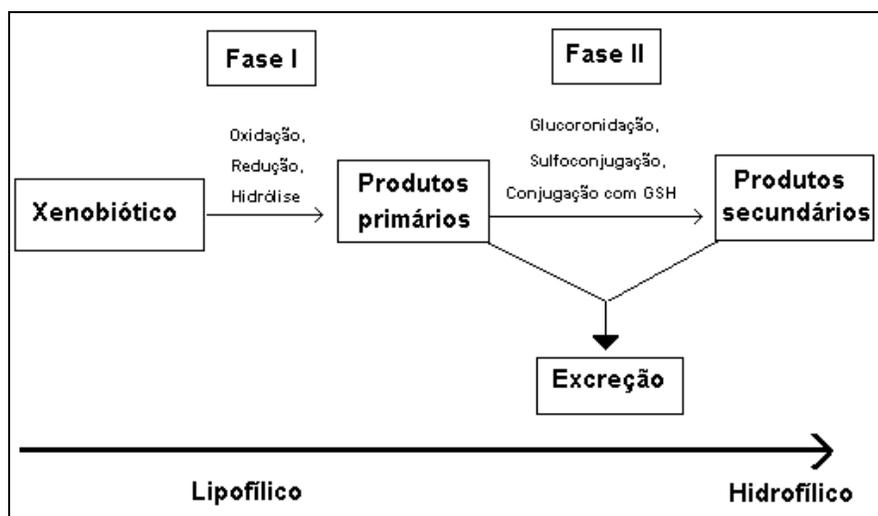


Figura 2. Representação esquemática das fases da biotransformação de xenobióticos (adaptado de Bastos, 2006).

1.3.1. A bÍlis e a biliverdina

Uma das principais funções do fÍgado é a formação de bÍlis, que, além de desempenhar papel importante na digestão e absorção de gorduras, ajudando na emulsão de grandes moléculas de gordura, transformando-as em moléculas menores,

serve como meio de excreção de xenobióticos, entre outras substâncias (Guyton & Hall, 2002; Kierszenbaum, 2004). Essa eliminação biliar de xenobióticos foi pouco estudada durante a primeira metade do século XX, porém a partir da 2ª metade, com o aparecimento de uma grande variedade de substâncias químicas sintéticas, foi reconhecida a importância da bÍlis como via de excreção destes compostos (Klaassen & Watkins, 1984). Em condições normais a bÍlis se encontra concentrada na vesÍcula biliar por cerca de cinco vezes, podendo chegar a um mÁximo de 20 vezes (Guyton, 1988).

Os sais biliares sÁo importantes componentes da bÍlis. AlÍm destes, a bÍlis contÍm colesterol, fosfolipÍdios, pigmentos biliares (bilirubina, de coloraÇão amarela, e biliverdina, de coloraÇão verde) e possÍveis metabÓlitos de xenobióticos, provenientes das fases de biotransformaÇão.

A bilirrubina e a biliverdina resultam do desdobramento da hemoglobina, pigmento respiratÓrio presente no interior das hemÁcias (Motta, 2005). A hemÁcia, ao se romper, libera a hemoglobina, que É então fagocitada por macrÓfagos do sistema reticuloendotelial. Isto ocorre em muitas partes do organismo, particularmente no fÍgado, no baço e na medula Óssea, liberando globina e heme (Guyton & Hall, 2002).

O anel heme É então oxidado a α -*meso*-hidroxiheme, que no estado desprotonado tem caracterÍsticas de radical livre, reagindo com oxigÍnio para produzir verdoheme e carbonila (Figura 3). A verdoheme É então, convertida a biliverdina e ferro livre em uma reaÇão que requer um NADPH-citocromo P-450- redutase e O₂.

Diversos autores utilizam a concentraÇão do pigmento biliar biliverdina como indicador do *status* alimentar dos peixes, através de mediÇões de absorÇão molecular (Aas *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2004), pois quanto mais tempo o peixe estÁ sem se alimentar, mais concentrada estarÁ a sua bÍlis. Portanto, se torna importante monitorar os parÁmetros de cor e absorvância em 380 nm, que É o comprimento de onda de maior absorvância da biliverdina.

Esses mesmos autores sugerem a normalizaÇão de dados de concentraÇões de xenobióticos em relaÇão à concentraÇão de biliverdina, para tentar reduzir a variância do conjutno de dados e investigar se diferenÇas entre os grupos de amostras são na verdade devido à diferenÇas na exposiÇão e ingestão de xenobióticos, como os HPA, ou se são conseqncias do acúmulo ao longo do tempo dos metabÓlitos de HPA na bÍlis. Portanto, neste estudo, dados de metabÓlitos de HPA obtidos em anÁlises no LaboratÓrio de Estudos Ambientais do Departamento de QuÍmica da PUC-Rio foram normalizados em

relação à concentração de biliverdina das amostras de bÍlis de peixes, para verificar as afirmações destes autores.

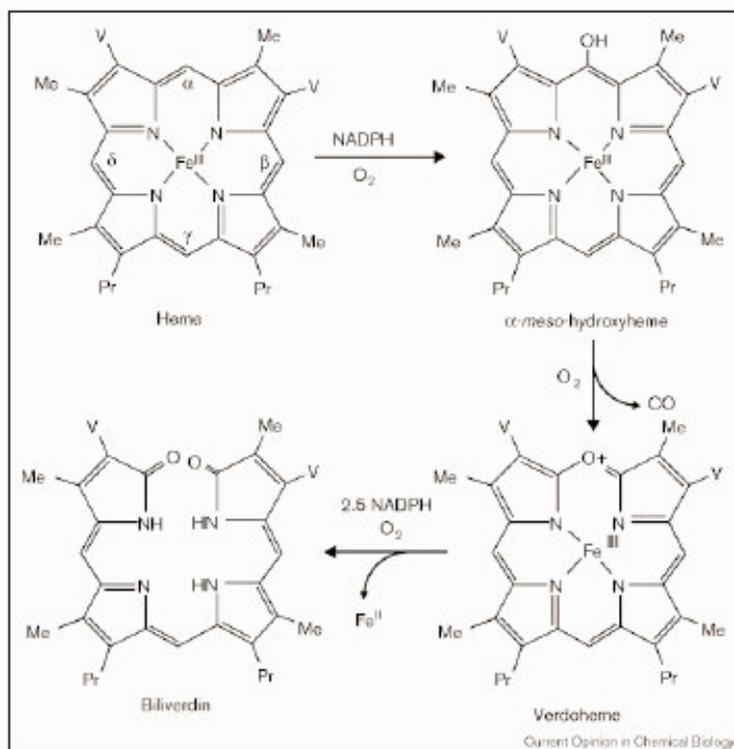


Figura 3. Oxidação do anel heme até a formação da biliverdina.

1.4. Parâmetros morfológicos

Os parâmetros morfológicos que determinam e descrevem as interferências ambientais no organismo são os índices somáticos do fígado, ou índice hepatossomático (IHS), que identifica possíveis desordens do fígado, e o fator de condição (FC) que avalia a condição geral do peixe (Van der Oost, *et al.*, 2002).

1.4.1. Fator de Condição

O fator de condição identifica momentos de reserva de energia e a capacidade do animal em tolerar agentes tóxicos ou outras interferências no ambiente (Mayer *et al.*, 1992). É um bioindicador individual relacionado a parâmetros biológicos, indicado pelo “Standard Methods” (Eaton *et al.*, 1998), e é bastante utilizado no estudo da biologia de

peixes, pois fornece importantes informações sobre o estado fisiológico desses animais, a partir do pressuposto de que indivíduos com maior massa em um dado comprimento estão em melhor condição.

Embora não seja específico, diversos estudos relacionaram o fator de condição com a contaminação por metais (Laflamme *et al.* 2000; Eastwood & Couture 2002).

1.4.2. IGS e IHS

O Índice Gonadossomático (IGS) e o Índice Hepatossomático (IHS) podem ser utilizados conjuntamente para calcular valores de reservas energéticas, período de maturação gonadal, período reprodutivo de espécies e, finalmente, o Fator de Condição. Todos estes parâmetros podem indicar mudanças no estado dos peixes e possíveis efeitos tóxicos de poluentes.

A variação da alimentação e de hormônios sexuais reflete no IHS de peixes adultos, principalmente no período de reprodução, devido às extensas mudanças fisiológicas que ocorrem nos peixes neste período. Já o IGS tem sido utilizado como importante parâmetro reprodutivo para fêmeas. Em machos, nem sempre este índice representa corretamente a condição reprodutiva, particularmente em peixes (Nikolsky, 1963; Vazzoler, 1996). Nas fêmeas o IGS aumenta durante o período de reprodução (Barbieri, 1988), enquanto nos machos esse aumento nem sempre ocorre, ou é aparente, durante o mesmo período.

1.5. Análises histopatológicas

Análises histopatológicas têm sido reconhecidas como ferramentas muito úteis no estudo e diagnóstico dos efeitos agudos e crônicos de poluentes em teleósteos (Akaishi *et al.*, 2004; Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2002a, 2002b, 2005). Além disso, as características histopatológicas de órgãos-alvo específicos podem expressar condições ambientais e representar o tempo de exposição aos quais estão submetidos os organismos (Shmalz *et al.*, 2002). Sendo assim, aparecem como uma resposta a estressores subletais, fornecendo um método rápido na avaliação do comprometimento de tecidos e órgãos de espécimes expostos a agentes químicos estressores (Johnson *et al.*, 1993). Alguns estudos na área de biomarcadores procuram avaliar os impactos sobre a biota,

analisando parâmetros, bioquímicos morfológicos e genéticos dentre outros (Katsumiti, 2006).

O fígado é o principal órgão com potencial de biotransformação, bioativação e excreção de xenobiontes, sendo, portanto, um dos principais órgãos alvos que podem refletir a exposição aos contaminantes (Bernet *et al.*, 1999). Este órgão é um dos de maior atividade metabólica de componentes endógenos e exógenos, tendo, portanto, um alto potencial de expressão dos efeitos deletérios na exposição a poluentes (Katsumiti, 2006)

Por estas razões, o fígado foi escolhido como órgão alvo para a realização deste estudo.

As investigações sobre a presença de HPA no ambiente aquático constituem uma parte muito importante da avaliação da qualidade ambiental por determinar o status da contaminação química e do impacto em potencial que possam causar aos ecossistemas (Kennicutt *et al.*, 1994). Estas análises químicas ajudam a determinar contaminações antropogênicas, porém fornecem apenas informações sobre o efeito tóxico sobre a biota quando analisados em conjunto com dados biológicos.

A histopatologia é um dos métodos mais rápidos e sensíveis na detecção dos níveis tóxicos de exposição dos organismos (Katsumiti, 2006). Danos ao fígado de peixes expostos a contaminantes derivados de HPA têm sido amplamente utilizados nos últimos anos como parâmetros para avaliação de diferentes ambientes (Marty *et al.*, 2003; Akaishi *et al.*, 2004; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005).

Os efeitos agudos e crônicos de poluentes em peixes teleósteos podem ser estudados e diagnosticados por ferramentas reconhecidamente muito úteis, como as análises histopatológicas (Akaishi *et al.*, 2004; Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2005). Além disso, as características histopatológicas de órgãos alvos específicos podem expressar condições ambientais e representar o tempo de exposição aos quais estão submetidos os organismos (Schmalz *et al.*, 2002). Sendo assim, aparecem como uma resposta a estressores subletais, fornecendo um método rápido na avaliação do comprometimento de tecidos e órgãos de espécimes expostos a agentes químicos estressores (Johnson *et al.*, 1993).

Os melanomacrófagos podem ser considerados como parte integrante do sistema hematopoiético de teleósteos, atuando como centros de reposição de materiais que não podem ser metabolizados ou que são requeridos para reciclagem (Roberts, 1975). Possuem diversas funções ligadas ao sistema imunológico, como seqüestro e apresentação de antígenos aos linfócitos e podem se desenvolver nas lesões inflamatórias de caráter crônico, em uma variedade de infecções como algumas doenças

bacterianas, fúngicas, viróticas e parasitárias (Agius *et al.*, 2003; Ribelin *et al.*, 1975). A existência deste tipo de alteração celular pode ser considerada indicadora de estresse em peixes, decorrente da presença de agentes químicos (Anderson & Zeeman, 1995).

A presença de infiltrações leucocitárias (respostas inflamatórias) pode ser um indicativo de lesões inflamatórias no tecido. Noreña-Barroso *et al.* (2004) encontraram este tipo de patologia em aproximadamente 65% dos animais analisados em seu trabalho expostos à múltiplos xenobiontes, como HPA e PCBs.

A presença de parasitas pode ser um indicativo de estresse ambiental sendo utilizado como um parâmetro morfológico (Galli *et al.*, 2001). Em estudos de biomonitoramento, a presença de parasitas pode ser considerada um importante indicador de toxicidade, visto que o aumento da sua incidência indica diminuição na resistência imunológica, e a sua diminuição pode indicar um desequilíbrio nas relações hospedeiro-parasita do ecossistema (Akaishi, 2003).

1.6. O Petróleo

A fonte primária de quase todos os derivados de petróleo é o óleo cru. Este consiste de uma mistura de hidrocarbonetos de peso molecular variável e, na média, contém aproximadamente 84,5% de carbono, 13% de hidrogênio, 1,5% de enxofre, 0,5% de nitrogênio e 0,5% de oxigênio. Existem mais de 600 compostos de hidrocarbonetos identificados no petróleo (Mancini, 2002).

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, além de baixas concentrações de compostos organo-metálicos, principalmente níquel e vanádio (Pedrozo, *et al.*, 2002). A composição química do petróleo é diferente para cada fonte geográfica de extração (Overton *et al.*, 2004), porém de maneira geral, cerca de 75% do petróleo é constituído por hidrocarbonetos de cadeias curtas e longas (Neff, 1979).

Os componentes no petróleo que, até agora, tem sido associados com a maior preocupação com relação a riscos ambientais são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), principalmente por suas propriedades carcinogênicas e mutagênicas (Varanasi, 1989).

1.6.1. Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são uma classe de compostos orgânicos que consistem de dois ou mais anéis aromáticos condensados na sua estrutura (Stefens, 2006). Estes compostos são muito estudados devido às propriedades mutagênicas e/ou carcinogênicas que alguns deles possuem. HPA de baixa massa molar (constituídos de dois ou três anéis na estrutura) apresentam toxicidade significativa, enquanto que alguns compostos de mais alto peso molecular (quatro a seis anéis) são potencialmente carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (Witt, 1995; Neff, 1979). Os HPA têm recebido atenção especial em amostras ambientais de sedimento e biota devido a sua ação tóxica prejudicial para o ambiente (Baumard *et al.*, 1998c; Witt, 1995). Os HPA são potenciais responsáveis por diversos efeitos biológicos e ecológicos no ambiente aquático (Baumard *et al.*, 1998c), portanto o estudo de seus potenciais impactos dentro os ecossistemas aquáticos é de considerável interesse ambiental (Fenet, Gómez & Rosain, 2006). A figura 4 representa a estrutura dos 16 HPA considerados prioritários pela USEPA.

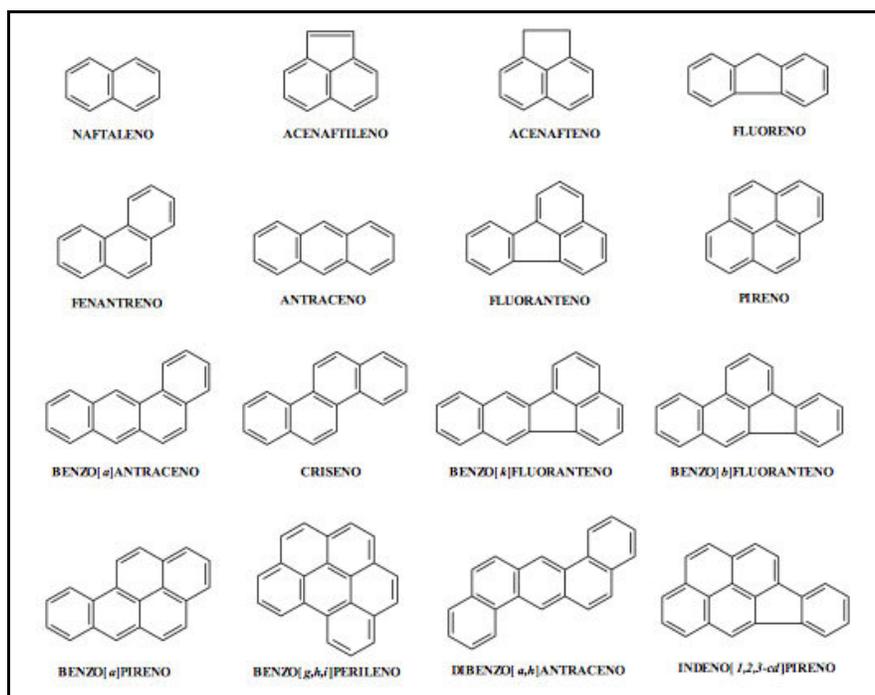


Figura 4. Estrutura dos 16 HPA considerados prioritários pela USEPA (Fonte: Stefens, 2006)

Neste trabalho, além de 4 destes HPA, o Pireno, Naftaleno, Criseno e Fenantreno, foram utilizados 2 metabólitos, o 2-Naftol, metabólito do Naftaleno, e o 1-OH-Pireno,

metabólito do Pireno. Este último é um dos metabólitos mais encontrados nas bílis de peixes. Estas substâncias são produtos das fases de biotransformação já descritas anteriormente.

1.6.2. A Origem dos HPA

Os HPA podem ser formados a altas ou baixas temperaturas. As alterações termais de baixa temperatura da matéria orgânica, como na formação de combustíveis fósseis, resultam em HPA com 2 ou 3 anéis na estrutura e uma grande proporção de alquilados homólogos. Opostamente, altas temperaturas de combustão produzem HPA com 4, 5 ou 6 anéis na estrutura e um mínimo de produtos alquilados. Nos processos a baixas temperaturas a distribuição de HPA é governada por propriedades termodinâmicas e nos processos a altas temperaturas a distribuição é governada por características cinéticas. Assim, misturas de HPA formadas durante a combustão de combustíveis fósseis são geralmente caracterizadas pela predominância de HPA de alta massa molar (Hoffman, 2003). Alguns HPA, entretanto, ocorrem naturalmente em minerais (ex.: coroneno) e outros (ex.: perileno) são sintetizados por organismos, como bactérias, algas e fungos. Os aportes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) provenientes de processos naturais são geralmente baixos quando comparados com aqueles provenientes de fontes antropogênicas (Witt, 1995).

Os processos de combustão envolvendo altas temperaturas formam HPA pirogênicos através de reações de condensação ou de fusão de anel, limitando a presença de grupos alquilados. Os HPA de origem pirogênica possuem mais de três anéis aromáticos e apresentam baixo grau de alquilação na sua estrutura. Os HPA pirogênicos mais abundantes são: fluoreno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzofluorantenos, benzopirenos, indeno[1,2,3-*cd*]pireno e benzo[*g,h,i*]perileno.

Já os HPA de origem petrogênica possuem dois ou três anéis aromáticos, apresentando geralmente homólogos alquilados e heteroátomos em sua estrutura (Tolosa *et al.*, 2004). Os principais HPA presentes no petróleo bruto são o naftaleno e seus homólogos alquilados, podendo apresentar ainda o fenantreno e seus homólogos alquilados e o antraceno.

Os HPA de origem petrogênica são introduzidos no meio ambiente aquático de rios e lagos principalmente através da liberação de efluentes industriais e derramamento

acidental de petróleo e produtos derivados em regiões altamente industrializadas e urbanizadas (Fänrich, Guilbault & Pravda, 2002).

Entre as fontes predominantes de HPA no ambiente marinho estão as fontes antropogênicas, como a queima de combustíveis fósseis e seus derivados (origem pirogênica), principalmente derramamento de petróleo e derivados (origem petrogênica) e descargas industriais e urbanas. As fontes naturais aparecem com menores contribuições como a combustão da biomassa vegetal e a diagênese de precursores naturais (Soclo, Garrigues & Ewald, 2000; Readman, *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2005).

Segundo Hoffman (2003), a contaminação das regiões costeiras é causada por derramamentos de óleo, esgoto urbano e industrial, escoamento urbano (*runoff*) e deposição atmosférica. Em regiões altamente urbanizadas, muitos HPA também são introduzidos no ambiente via deposição atmosférica, através da combustão incompleta de combustíveis fósseis por veículos automotores, que pode ser considerada a principal fonte de contaminação de HPA pirogenicos (Fänrich, Guilbault & Pravda, 2002; Baumard *et al.*, 1998; Dallarosa, *et al.*, 2005; Kucklick *et al.*, 1997).

Técnicas utilizadas para diferenciar HPA de fontes pirogênicas e petrogênicas incluem a determinação da quantidade relativa da massa molar destes compostos. HPA originários de fontes petrogênicas são identificados pela presença de massas molares predominantemente menores do que HPA de fontes pirogênicas e alta proporção de compostos alquilados (Soclo, Garrigues & Ewald, 2000). Adicionalmente, podem ser usados índices baseados na razão da concentração de HPA selecionados, usando a razão entre HPA de baixa massa molar e HPA de alta massa molar, onde valores menores que 1 sugerem fonte de contaminação por combustão. Pode-se usar também as razões entre componentes homólogos como Fenantreno e Antraceno, Benzo(a)antraceno e Criseno (Neves, 2006).

1.6.3. Efeitos tóxicos do petróleo em peixes

Os peixes podem entrar em contato com os componentes derivados do petróleo por diferentes vias. As principais são através das trocas gasosas e iônicas com a conseqüente contaminação via brânquias, e a via trófica, que também constitui uma importante rota de exposição para os peixes.

Espécimes de peixes expostos ao petróleo podem apresentar aumento da taxa de má formação das larvas e juvenis; crescimento lento e diminuição da performance natatória (Lyra, 2006).

A exposição aos HPA também pode causar inibição da atividade colinesterásica levando a alterações em respostas motoras, desordens neurológicas, formação de adutos de DNA, alterações no epitélio branquial e lesões em outros tecidos como rins e baço (Lyra, 2006; Beyer *et al.*, 1996; Reichert *et al.*, 1998; Akaishi *et al.*, 2004; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005), além de alterações cardíacas, disfunções respiratórias, alterações bioquímicas e reprodutivas (USEPA, 1999). Entre os efeitos descritos no tecido hepático pode-se incluir fibrose, infiltração leucocitária, necrose, pré-neoplasias, neoplasias e lipidoses (Akaishi *et al.*, 2004; Katsumiti, 2006; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005).

1.7.

Metais no ecossistema aquático

A poluição do ambiente aquático por metais pesados se tornou um problema mundial na última década, porque estes elementos são indestrutíveis e a maioria possui efeitos tóxicos em organismos (MacFarlane & Burchett, 2000). Dentre os poluentes ambientais, os metais são de preocupação particular devido aos seus potenciais efeitos tóxicos e a habilidade de bioacumular em ecossistemas aquáticos (Miller *et al.* 2002; Censi *et al.* 2006).

Os efeitos de metais em ecossistemas naturais são diversos, complexos e muitas vezes, imprevisíveis. No contexto de gerenciamento dos impactos ambientais de elementos traço, existe uma necessidade urgente de desenvolver métodos para investigar seus efeitos *in situ* em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce (Depledge *et al.*, 1994).

Embora não possam ser criados ou destruídos, metais podem ser redistribuídos em escala regional e global (Lange, Ausseil & Segner 2002). Alguns metais são elementos essenciais para o metabolismo normal do organismo, enquanto outros não desempenham nenhum papel biológico significativo (Van Dyk, Pieterse & Van Vuren, 2005). Metais como o cobre, zinco, ferro, cobalto, selênio e manganês são essenciais para a saúde da maioria dos organismos, formando componentes importantes de proteínas envolvidas em todos os aspectos da função biológica. Sua ubiquidade é governada pela possibilidade destes formarem diversas geometrias de coordenação e estados redox, permitindo a interação destes elementos com diversas entidades

celulares, tendo papel essencial na respiração celular, transporte de oxigênio, estabilidade de proteínas e transcrição do DNA. Porém, em excesso, esses elementos se tornam tóxicos, se ligando a moléculas inapropriadas ou formando radicais livres perigosos (Bury, Walker & Glover, 2003).

A exposição a metais pode causar diversos efeitos deletérios em organismos expostos. Zinco e cádmio, por exemplo, são metais neurotóxicos, conhecidos como importantes contaminantes ambientais. Metais traço podem ser acumulados por peixes, tanto pela cadeia trófica quanto pela água. Os efeitos potenciais de metais em peixes podem ser examinados ao analisar seu acúmulo em tecidos-alvo (Rajotte *et al.*, 2003; Mendil & Uluözlö, 2007). Metais pesados como cobre e zinco são essenciais para o metabolismo dos peixes, enquanto outros, como o chumbo, não possuem nenhuma função em sistemas biológicos. Porém, todos podem exercer efeitos prejudiciais nos peixes, dependendo de sua concentração.

Mansour & Sidky (2002, 2003) reportaram que o comportamento alimentar de *Mugil* sp. faz com que esta espécie seja mais vulnerável a poluição por metais pesados do que outras espécies de peixes, como o linguado (*Solea* sp.) e a Tilápia (*Tilapia* sp.), pois esta espécie é detritívora e os metais pesados muitas vezes estão presentes em altas concentrações no sedimento de áreas contaminadas por estes elementos.

A excreção biliar pode oferecer uma solução para analisar estes elementos em organismos marinhos, pois diversos estudos indicam que muitos metais são excretados pelo fígado para a bÍlis (Bunton e Frazier, 1994; Dijkstra *et al.*, 1996). Um exemplo são o cobre, que é excretado, primariamente, em peixes teleósteos, pela bÍlis (Grosell *et al.*, 1997, 2000), enquanto outros metais, como o zinco, podem ser excretados tanto pela bÍlis ou pelo intestino (Handy, 1996).

Os quatro elementos analisados neste trabalho foram Selênio, Cromo, Arsênio e NÍquel.

O selênio (Se) é conhecido como um micronutriente essencial para a maioria dos animais, porém em concentrações elevadas este elemento é considerado tóxico. (Chatterjee, 2001; Eisler, 1985). Para organismos marinhos, como os peixes, o selênio se torna tóxico a partir de 0,3 mg L⁻¹ (Lemly, 1997). O limite máximo de selênio estabelecido pela legislação brasileira (Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965) é de 0,3 mg L⁻¹ para "outros alimentos".

O Cromo (Cr) têm sido descrito como mutagênico e carcinogênico em diversos sistemas-teste (Vutukuru, 2005). Efeitos do cromo em peixes incluem redução na taxa de crescimento, aberrações cromossômicas, menor resistência à doenças, alterações da

atividade locomotora e mudanças morfológicas (EPA, 1980). O limite máximo estabelecido de cromo pela legislação brasileira (Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965) é de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para "qualquer alimento".

O arsênio (As) exerce seus efeitos prejudicando a respiração celular pela inibição de diversas enzimas mitocondriais, e pelo desdobramento da fosforilação oxidativa. A toxicidade do arsênio resulta de sua habilidade de interagir com grupos sulfahidril de roteínas e enzimas e de substituir fósforo em diversas reações químicas. Estudos recentes descrevem a toxicidade por arsênio associada à formação de espécies reativas de oxigênio, o que pode causar danos severos ao sistema nervoso (Patololla & Tchounwou, 2005). De acordo com Vutukuru *et al.* (2007), este metal pode também se acumular no fígado em níveis tóxicos e causar alterações patológicas. Efeitos em organismos aquáticos incluem câncer, mutações, mudanças comportamentais, redução nas taxas de crescimento, perda de apetite e falência metabólica. Organismos aquáticos que se alimentam no fundo da coluna d'água são mais suscetíveis a este elemento (Stanley *et al.*, 1994; Whitworth *et al.*, 1991). Apesar de seus efeitos hepatotóxicos deletérios, poucos estudos existem sobre os efeitos do arsênio no fígado (Nimmi, 1990). O limite máximo estabelecido de arsênio pela legislação brasileira (Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965) é de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para "qualquer alimento".

O níquel (Ni) é carcinogênico e mutagênico. Alguns efeitos observados do níquel em ambientes aquáticos incluem danos aos tecidos de organismos, genotoxicidade e redução das taxas de crescimento (Environmental Canadá, 1994a). O limite máximo estabelecido de Níquel pela legislação brasileira, conforme Portaria Nº 685 da ANVISA, de 27 de agosto de 1998 (republicada no D.O.U. de 24/09/98) e Decreto nº 55781 de 26 de março de 1965 é de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ para "qualquer alimento".