

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO RIO DE JANEIRO



Rachel Ann Hauser Davis

**Biomarcadores morfológicos, bioquímicos e genotóxicos de
contaminação ambiental em *Mugil liza*, *Geophagus brasiliensis* e
*Tilapia rendalli***

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Lourenço Ziolli

Rio de Janeiro

Julho de 2008



Rachel Ann Hauser Davis

**Biomarcadores morfológicos, bioquímicos e genotóxicos de
contaminação ambiental em *Mugil liza*, *Geophagus brasiliensis* e
*Tilapia rendalli***

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.
Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo
assinada.

Dra. Roberta Lourenço Ziolli

Orientadora

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Abílio Soares Gomes

Departamento de Biologia Marinha – UFF

Dra. Letícia Teixeira

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro
Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 31 de Julho de 2008

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Rachel Ann Hauser Davis

Graduou-se em Ciências Biológicas em 2005 e em Licenciatura em Ciências Biológicas em 2006, ambos pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Participou de inúmeras atividades relacionadas ao estudo e à preservação do meio ambiente.

Ficha Catalográfica

Davis, Rachel Ann Hauser

Biomarcadores morfológicos, bioquímicos e genotóxicos de contaminação ambiental em *Mugil liza*, *Geophagus brasiliensis* e *Tilapia rendalli* / Rachel Ann Hauser Davis ; orientador: Roberta Lourenço Ziolli. – 2008.
128 f. : il.(col.) ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Química)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Biomarcadores. 3. Índice Gonadossomático. 4. Fator de condição. 5. Índice Hepatossomático. 6. HPA. 7. Metais pesados. 8. AChE. I. Ziolli, Roberta Lourenço. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

“IDIC – Infinite Diversity in Infinite Combinations.”

Agradecimentos

À minha orientadora, Roberta Lourenço Ziolli, pela oportunidade e incentivo.

Ao Professor Ricardo Queiroz Aucélio, pelo empréstimo de equipamentos, e pela paciência.

Aos amigos do LEA Danielle Mendonça, Mônica Vianna e Roberta Lyrio (o eterno POP) pela ajuda, tanto nas coletas como no cotidiano no laboratório, além de serem incríveis amigas.

Aos amigos que fiz ao longo do mestrado, do LEA, do LEEA e agregados!

Ao Professor Reinaldo Calixto de Campos, por disponibilizar sua equipe e laboratório para análise de materiais neste trabalho.

À professora Ângela Rebelo Wagener pelo material emprestado.

Ao Ricardo do LABMAM, pela ajuda fornecida.

Ao Rodrigo Araújo Gonçalves pela análise dos metais neste trabalho.

Ao Ciro Ribeiro, da Universidade Federal do Paraná, pelas análises histopatológicas.

À minha amiga Natália Quinete por ser quem é, sem reservas, e por sempre me dar apoio!

Às minhas grandes amigas Mariana Bloch, Renata Maron Mendes e Tatiana Hellman, pelo apoio, não só na minha decisão inicial de enfrentar um mestrado mas também ao longo dele, com muitos intervalos e interrupções para cuidar de assuntos de cunho pessoal.

Resumo

Davis, Rachel Ann Hauser; Ziolli, Roberta Lourenço. **Biomarcadores morfológicos, bioquímicos e genotóxicos de contaminação ambiental em *Mugil liza*, *Geophagus brasiliensis* e *Tilapia rendalli*.** Rio de Janeiro, 2008. 128p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A comparação das respostas bioquímicas, morfológicas e genotóxicas de organismos coletados em áreas com e sem histórico de contaminação é útil para avaliar a qualidade ambiental dos ecossistemas. Este trabalho analisou as respostas de biomarcadores utilizando *Mugil liza*, *Geophagus brasiliensis* e *Tilapia rendalli*. Os peixes foram coletados da Lagoa Rodrigo de Freitas, Magé (Praia de Ipiranga e Olaria), São Gonçalo (Gradim), Itaipu e Lagoa de Jacarepaguá. Em laboratório foi realizada a morfometria dos peixes, para cálculo do Índice Gonadossomático (IGS), Índice Hepatossomático (IHS) e Fator de Condição (FC). Foram retirados os encéfalos das tainhas para obtenção da Acetilcolinesterase, que foi exposta a soluções padrão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), para verificar a influência destes na atividade da enzima. As bílis dos peixes foram retiradas para determinação da concentração de metais e de biliverdina. Os fígados e gônadas foram retirados para análises histopatológicas. Os resultados indicaram que não houve correlações entre o IGS e o IHS. Os dados preliminares da atividade da AChE em presença de HPA não foram conclusivos. As análises das bílis de peixes para o teor de metais demonstraram a presença de Níquel, Selênio, Arsênio e Cromo na bílis da espécie *Mugil liza*, tanto da Praia de Ipiranga quanto de Itaipu. A concentração de biliverdina não apresentou relação significativa com a concentração de HPA, como sugerido por alguns autores. As análises histopatológicas indicaram anormalidades celulares mais aparentes na Praia de Ipiranga do que em Itaipu, com presença maior que o normal de melanomacrófagos, infiltrações leucocitárias e parasitas.

Palavras-chave

Biomarcadores; Índice Gonadossomático; Fator de Condição; Índice Hepatossomático; HPA; metais pesados; AChE.

Abstract

Hauser-Davis, Rachel Ann; Ziolli, Roberta Lourenço. **Morphological, biochemical and genotoxic biomarkers for environmental contamination in *Mugil liza*, *Geophagus brasiliensis* and *Tilapia rendalli***. Rio de Janeiro, 2008. 128p. MSc. Dissertation – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The comparison of biochemical, morphological and genotoxic responses sampled from areas protected from chronic or acute contamination with responses of organisms sampled from historically contaminated areas is useful in determining the environmental quality of ecosystems. This study aimed to analyse biomarker responses using *Mugil liza* (mulletts), *Geophagus brasiliensis* (acarás) and *Tilapia rendalli* (tilapias). The fish were sampled from the Rodrigo de Freitas Lagoon, Magé (Ipiranga beach and Olaria), São Gonçalo (Gradim), Itaipu and Jacarepaguá Lagoon. At the laboratory, morphometric measurements were taken, in order to calculate the Gonadosomatic Index (GSI), Hepatosomatic (HSI) and Condition Factor (CF). Mullet brains were removed to obtain Acetylcholinesterase, which was then exposed to standard-solutions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), to verify the influence these compounds might have on the activity of the Acetylcholinesterase enzyme. The fish bile was removed to determine metals and billiverdin concentrations. Livers and gonads were removed to conduct histopathological analyses. Results indicated no correlation between the GSI and HSI. Preliminary data on the AChE activity in the presence of HPA were not conclusive. The fish bile analysis regarding metals demonstrated the presence of Nickel, Selenium, Arsenium and Chrome in the bile of the species *Mugil liza*, both from Ipiranga beach and Itaipu. Billiverdin concentrations did not present significant relationship with HPA concentration, as suggested by some authors. The histopathological analyses indicated more cellular abnormalities in fish sampled from Magé than in Itaipu, with the presence of higher than normal number of melanomacrophages, leucocitary infiltrations and parasites

Keywords

Biomarkers; Gonadosomatic Index; Hepatosomatic Index, Condition Factor; PAH; heavy metals; AChE.

Sumário

1 Introdução	15
1.1. Uso de bioindicadores e biomarcadores de contaminação ambiental	17
1.2. A Acetilcolinesterase (AChE) e sua importância em estudos de monitoramento ambiental	18
1.2.1. Mecanismo de funcionamento da Acetilcolinesterase (AChE)	20
1.2.2. Metodologia enzimática de determinação da atividade de Acetilcolinesterase (AChE)	21
1.3. Biotransformação de xenobióticos em peixes	21
1.3.1. A biliar e a biliverdina	22
1.4. Parâmetros morfológicos	24
1.4.1. Fator de Condição	24
1.4.2. IGS e IHS	25
1.5. Análises histopatológicas	25
1.6. O Petróleo	27
1.6.1. Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	28
1.6.2. A Origem dos HPA	29
1.6.3. Efeitos tóxicos do petróleo em peixes	30
1.7. Metais no ecossistema aquático	31
2 Objetivos	34
2.1 Objetivos gerais	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3 Áreas de Estudo	36
3.1. Lagoa Rodrigo de Freitas	37
3.2. Lagoa de Jacarepaguá	38
3.3. Itaipu	39
3.4. Gradim – São Gonçalo	40
3.5. Praia de Olaria – Magé	40
3.6. Praia de Ipiranga – Magé	41

4 Parte experimental	42
4.1. Coleta dos peixes	42
4.2. Espécies estudadas	42
4.3. Análises biométricas e morfológicas dos peixes estudados	46
4.4. Cálculo do IGS, IHS e Fator de Condição	48
4.5. Retirada da bÍlis	48
4.6. Retirada dos encéfalos	50
4.7. Preparo da fração enzimática de Acetilcolinesterase a partir de encéfalos de <i>Mugil Liza</i>	51
4.7.1. Testes enzimáticos para determinação do efeito de HPA na atividade da Acetilcolinesterase	52
4.8. Absorção molecular da biliverdina	53
4.8.1. Curva analítica de solução de biliverdina em etanol 48%	54
4.9. Análise das bÍlis de peixe para determinação de metais por absorção atômica	55
4.10. Limpeza do Material Utilizado	55
4.11. Análises estatísticas dos dados	57
4.11.1. Análise de correspondência	57
4.11.2. Teste de Hipóteses	57
4.11.3. Análise por Levene	58
4.11.4. Teste de Pearson	58
5 Resultados e Discussão	59
5.1. Distribuição das três espécies coletas por data e área de coleta	59
5.2. Análises morfométricas dos peixes	61
5.1.2. Sexagem dos indivíduos capturados	61
5.1.3. Estatísticas descritivas de <i>Geophagus brasiliensis</i>	61
5.1.4. Estatísticas descritivas de <i>Tilapia rendalli</i>	62
5.1.5. Estatísticas descritivas de <i>Mugil liza</i>	64
5.3. Análises de metais na bÍlis de peixes	68
5.3.1. Selênio	68
5.3.2. Cromo	69
5.3.3. Arsênio	70

5.3.4. Níquel	70
5.4. Fator de Condição	71
5.4.1. Fator de Condição de <i>Geophagus brasiliensis</i> e sua relação com o IGS	72
5.4.2. Fator de Condição de <i>Tilapia rendalli</i> e sua relação com o IGS	73
5.4.3. Fator de Condição de <i>Mugil liza</i> e sua relação com o IGS	73
5.4.4. Considerações sobre a relação entre o Fator de Condição de <i>Mugil liza</i> e metais pesados	76
5.5. IGS e IHS	77
5.5.1. IGS e IHS de <i>Geophagus brasiliensis</i>	79
5.5.2. IGS e IHS de <i>Tilapia rendalli</i>	79
5.5.3. IGS e IHS de <i>Mugil liza</i>	80
5.5.4. Considerações sobre a relação entre o IHS de <i>Mugil liza</i> e metais pesados	82
5.6. Alterações histopatológicas	82
5.7. Atividade colinesterásica	86
5.7.1. Peixes de São Gonçalo	87
5.7.2. Peixes de Magé	87
5.7.3. Peixes de Itaipu	88
5.8. Biliverdina	90
5.8.1. Limites de detecção e quantificação do método	90
5.8.2. Absorção molecular e normalização dos dados de metabólitos de HPA em relação à concentração de biliverdina	91
6 Conclusões e Considerações Finais	97
7 Referências Bibliográficas	100
8 Anexos	120

Lista de figuras

Figura 1. Degradação da acetilcolina promovida pela ação catalítica da acetilcolinesterase	20
Figura 2. Representação esquemática das fases da biotransformação de xenobióticos (adaptado de Bastos, 2006).	22
Figura 3. Oxidação do anel heme até a formação da biliverdina.	24
Figura 4. Estrutura dos 16 HPA considerados prioritários pela USEPA (Fonte: Stefens, 2006)	28
Figura 5. Mapa representando as áreas de estudo.	37
Figura 6. Representação esquemática das medições morfométricas realizadas.	47
Figura 7. Localização da vesícula biliar de um dos peixes em estudo.	49
Figura 8. Escala de cor de bÍlis de peixes utilizada ao longo deste trabalho.	49
Figura 9. Vista dorsal mostrando a localização do encéfalo de tainha (<i>Mugil liza</i>) “in vivo”.	50
Figura 10. Encéfalo de tainha (<i>Mugil liza</i>) “in vivo”, vista dorsal.	51
Figura 11. Representação esquemática de encéfalo de peixe e suas estruturas, (A) vista dorsal e (B) ventral. (Fonte: Höfling <i>et al</i> , 1995).	51
Figura 12. Fluxograma ilustrando todos os passos da parte experimental deste trabalho.	56
Figura 13. Distribuição de freqüência do comprimento total d e exemplares de <i>Geophagus brasiliensis</i> (Acarás).	62
Figura 14. Gráfico de Boxplot do peso dos acarás, classificado por sexo.	62
Figura 15. Distribuição de freqüência do comprimento total de exemplares de <i>Tilapia rendalli</i> (Tilápias).	63
Figura 16. Gráfico de Boxplot do peso das tilápias, classificado por sexo.	63
Figura 17. Fêmea de tilápia (<i>Tilapia rendalli</i>) apresentando ovários maduros, com ovócitos visíveis.	64
Figura 18. Espécime de <i>Mugil liza</i> apresentando grânulos ovalados presos ao intestino.	65
Figura 19. Espécime de <i>Mugil liza</i> apresentando grânulos ovalados presos na	

parte superior da cabeça.	65
Figura 20. Distribuição de freqüência do comprimento total de exemplares de <i>Mugil liza</i> (Tainhas).	66
Figura 21. Gráfico de Boxplot do peso das tainhas, classificado por sexo.	66
Figura 22. Gráfico Box-Plot mostrando o comprimento (cm) das tainhas por local de coleta.	67
Figura 23. Gráfico Box-Plot mostrando o peso (g) das tainhas por local de coleta.	67
Figura 24. Fêmea de tainha (<i>Mugil liza</i>) apresentando ovários maduros.	68
Figura 25. Gráfico de simetria da Análise de correspondência.	76
Figura 26. Histogramas mostrando a freqüência de distribuição dos valores de IGS nas 3 espécies estudadas.	77
Figura 28. Plot de intervalo de 95% para media do IGS por temporalidade.	81
Figura 29. Histopatologia do fígado de <i>Mugil liza</i> e <i>Geophagus brasiliensis</i> corados com Hematoxilina e Eosina. A. Tecido normal sem danos aparentes (<i>Mugil liza</i> - Itaipu). B e F. Tecido hepático muito alterado apresentando infecção generalizada com infestação bacteriana (<i>Geophagus brasiliensis</i> – Lagoa de Jacarepaguá). C. Área de infiltração leucocitária demonstrando resposta inflamatória (seta) (<i>Mugil liza</i> – Magé – Praia de Ipiranga). D. Presença de centros de melanomacrófagos (seta menor) e resposta inflamatória (seta maior) (<i>Mugil liza</i> Magé – Praia de Ipiranga). E. Presença de endoparasita (seta) (<i>Mugil liza</i> Magé – Praia de Ipiranga). Escala = 20 µm.	84
Figura 30. Fígado de <i>Tilapia rendalli</i> apresentando manchas verde-escuras atípicas.	85
Figura 31. Curva analítica das soluções padrão de biliverdina em etanol 48%.	93
Figura 32. Espectros de varredura das soluções padrão de Biliverdina.	93
Figura 33. Espectro das amostras de bÍlis diluídas a 1%, coletadas em Itaipu, Lagoa Rodrigo de Freitas, Magé - Olaria, Magé – Praia de Ipiranga e São Gonçalo.	94

Lista de tabelas

Tabela 1. Local de coleta, data e número de amostras das 3 espécies de peixes estudadas ao longo deste trabalho. $N_{total} = 237$.	60
Tabela 2. Concentrações médias ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm DP dos 4 metais determinados neste estudo, em amostras de bÍlis de <i>Mugil liza</i> coletados em Magé e em Itaipu.	68
Tabela 3. Concentrações de Se nas amostras de bÍlis de peixes coletados em Magé e Itaipu.	69
Tabela 4. Concentrações de Cr nas amostras de bÍlis de peixes coletados em Magé e Itaipu.	70
Tabela 5. Concentrações de As nas amostras de bÍlis de peixes coletados em Magé e Itaipu.	70
Tabela 6. Concentrações de Ni nas amostras de bÍlis de peixes coletados em Magé e Itaipu.	71
Tabela 7. Estatísticas descritivas do fator de condição da <i>Mugil liza</i> por local de coleta.	74
Tabela 8. Distribuição de freqüência do fator de condição por local de coleta da espécie <i>Mugil liza</i> .	75
Tabela 9. Alterações histopatológicas encontradas nos fÍgados de <i>Mugil liza</i> coletados em Magé-Ipiranga.	83
Tabela 10. Alterações histopatológicas encontradas nos fÍgados de <i>Mugil liza</i> coletados em Itaipu.	83
Tabela 11. Alterações histopatológicas encontradas nos fÍgados de <i>Tilapia rendalli</i> coletados na Lagoa de Jacarepaguá.	83
Tabela 12. Comparação entre a atividade média de AChE por minuto extraída de cérebros de rato e encéfalos de peixe.	87
Tabela 13. Estatística de regressão	90
Tabela 14. Concentrações de biliverdina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e de compostos fluorescentes totais (CFT) em equivalentes de 1-OH-Pireno ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das amostras de bÍlis de <i>Tilapia rendalli</i> e <i>Mugil liza</i> analisadas neste trabalho.	95

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

HPA – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IGS – Índice Gonadossomático

IHS – Índice Hepatossomático

FC – Fator de Condição

Lt – Comprimento total (cm)

Wt – Peso total (g)

Ac – Altura da cabeça (cm)

Wg – Peso das gônadas (g)

Wf – Peso do fígado (g)

Lc – Comprimento da cabeça (cm)

Lp – Comprimento padrão (cm)

RBC – Rede Brasileira de Calibração

AChE – Acetilcolinesterase

CFT – Compostos fluorescentes totais

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

CV – Coeficiente de variação