

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromático (HPA) são uma classe de compostos orgânicos formados por dois ou mais anéis aromáticos. Possuem alta hidrofobicidade, a maioria possui baixa solubilidade em água e baixa tendência à degradação microbiana, o que contribui para sua persistência no meio ambiente. Os HPA estão na lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental americana (*U.S. Environmental Protection Agency - EPA*) por que alguns são considerados carcinogênicos e mutagênicos. Sua lipofilicidade, persistência no meio ambiente e genotoxicidade aumentam com o aumento da sua massa molecular até 4 a 6 anéis aromáticos (Riser-Roberts, 1998). Exemplos de HPA são mostrados nas figuras 2.1 e 2.2.

São originados naturalmente por processos de diagênese, pirólise de matéria orgânica e por biossíntese realizada por microorganismos ou plantas. A emissão desses compostos também se dá de forma ampla em todo o mundo, através de fontes pirolíticas e petrogênicas, principalmente aquelas ligadas à petroquímica, exploração de petróleo e combustão incompleta de matéria orgânica como, por exemplo, queimadas de florestas, incineração de lixo e combustão veicular (Johnsen et al, 2005). O compartimento ambiental marinho representa a principal reserva desses compostos onipresentes (Lipiatou et al, 1997). A composição e a complexidade das misturas de HPA dependem das fontes emissoras. Em geral as misturas são bastante complexas e contêm grande variedade de HPA em diferentes níveis de concentração (Netto et al, 2000).

O destino ambiental de contaminantes depende de forma geral, de fatores como seu coeficiente de partição entre as fases, sua composição e estrutura, tendência a degradação, bioacumulação, fotólise, hidrólise e oxidação, além das condições do ambiente. Algumas propriedades físico-químicas importantes para entender o comportamento ambiental e biológico dos HPA são mostradas nas tabelas 2.1 e 2.2.

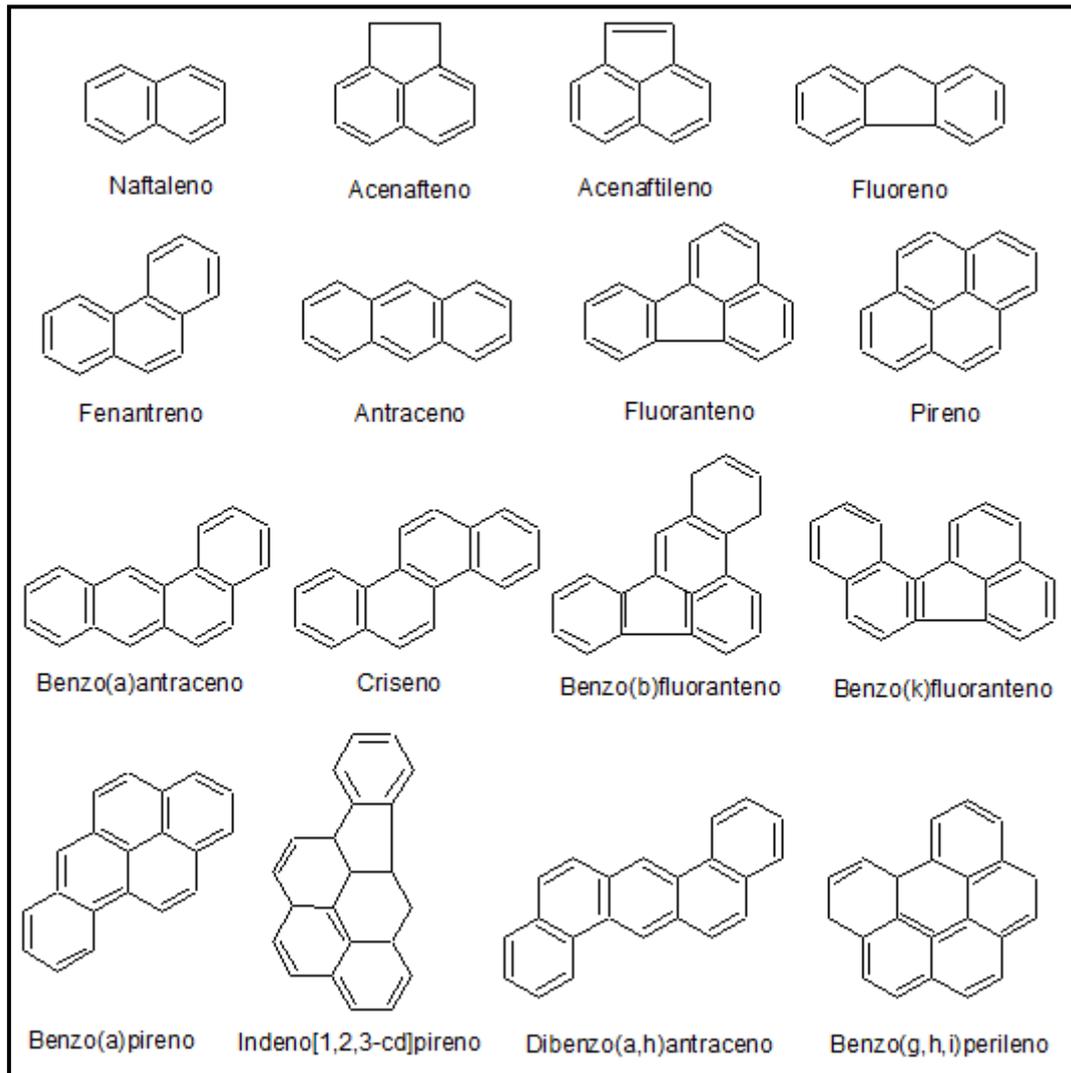


Figura 2. 1 Estruturas dos 16 HPA prioritários pela USEPA

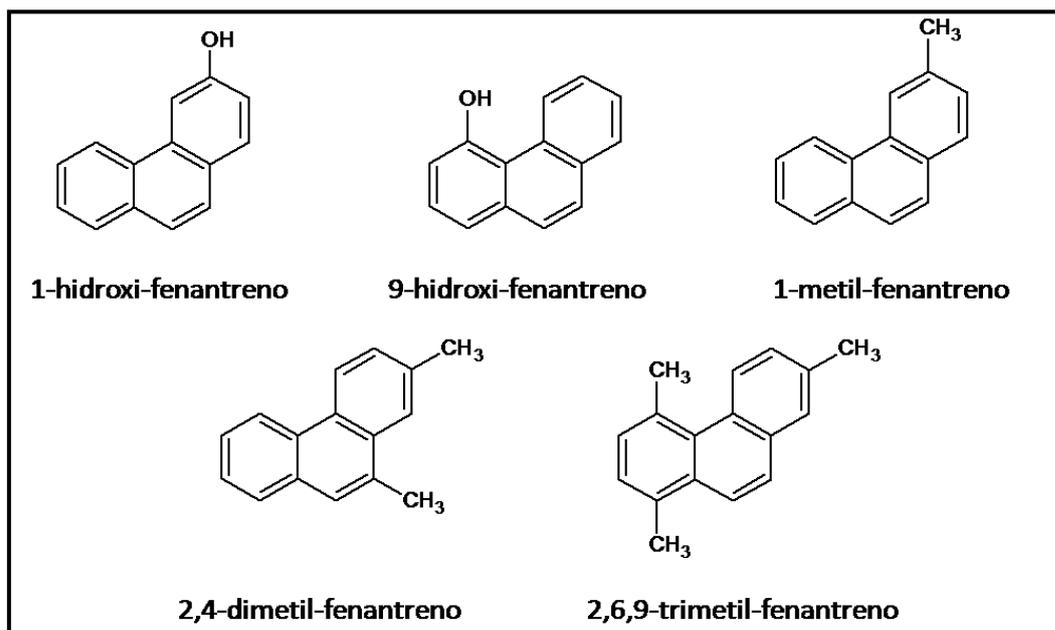


Figura 2. 2 Estruturas de fenantrenos alquilados e metabólitos hidroxilados

As características físico-químicas variam, em geral, de acordo com seu peso molecular. À temperatura ambiente, os HPA são compostos sólidos, e em geral possuem altos pontos de fusão e ebulição, baixa pressão de vapor e baixa solubilidade em água (naftaleno $31 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), que, assim como a resistência à oxidação e redução, tendem a diminuir com o aumento da massa molar, número de anéis aromáticos e grau de alquilação. A volatilidade desses compostos diminui com o aumento do peso molecular, portanto os HPA de menor peso molecular serão mais voláteis e apresentam maiores pressões de vapor (Netto et al, 2000). Como consequência dessas diferenças, HPA de diferentes pesos moleculares apresentam grande variação de comportamento e distribuição no meio ambiente, assim como diferentes efeitos sobre a biota. Seu alto coeficiente de partição octanol-água ($\text{Log } K_{ow} > 4$) demonstra grande afinidade lipofílica, o que dificulta a degradação microbiológica que é limitada pela quantidade de substância dissolvida na água (Johnsen et al, 2005; Netto et al, 2000). Os HPA são compostos não polares e hidrofóbicos, portanto tendem a residir primeiramente na fase oleosa residual, porém eles podem ser absorvidos a outras fases orgânicas, tais como a matéria orgânica do sedimento, onde são comumente encontrados em altas concentrações (Zemanek et al, 1997).

Tabela 2. 1 Propriedades físico-químicas de alguns HPA (adaptado de Netto et al, 2000 e Morrisson, 1999).

Substância	Nº de anéis	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Meia vida de degradação em água subterrânea (hr)	Pressão de vapor (Pa, 25° C)	Log K _{ow}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
Naftaleno	2	128	24 – 6192	36,8	3,37	31
Acenaftileno	3	152	590 – 896	4,14	4,00	16,1
Fluoreno	3	166	1536 – 2880	0,71	4,18	1,9
Fenantreno	3	178	768 – 9600	0,113	4,57	1,1
Antraceno	3	178	2400 – 22080	0,0778	4,54	0,045
Pireno	4	202	10080 – 91200	0,0119	5,18	0,132
Benzo(a)pireno	5	252	2736 – 25440	2,13.10 ⁻⁵	6,04	0,0038

Tabela 2. 2. Propriedades físico-químicas de alguns HPA alquilados (adaptado de Neff, 2002).

Substância	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
1-Metil-naftaleno	142	3,87	28,00
1,4-Dimetil-naftaleno	156	4,37	11,40
2,3- Dimetil-naftaleno	156	4,40	2,50
1,3,5-Trimetil-naftaleno	176	5,00	2,10
1-Metil-fenantreno	192	4,97	1,09

Os HPA são considerados especialmente importantes dentre os poluentes químicos, principalmente pelo fato de alguns se mostrem carcinogênicos em mamíferos (Neff, 1979). Por serem persistentes e estarem presentes em diversos ecossistemas e devido as suas propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (Yin *et al*, 2007, Erustes *et al*, 2001) é de grande interesse o desenvolvimento de métodos analíticos para detecção da presença desses compostos no meio ambiente (Valero-Navarro *et al*, 2007).

As famílias de HPA que se encontram em maior abundância nos produtos de petróleo possuem dois ou três anéis aromáticos fundidos e de um a quatro grupamentos de alquilação. O fenantreno é um HPA de três anéis benzênicos fundidos, considerado dentre os de baixo peso molecular que está presente no meio ambiente urbano como principal componente dos HPA (Hwang & Wade,

2008 *apud* Horng *et al*, 2010). O fenantreno é um poluente considerado tóxico, porém toxicidade aguda é raramente reportada para organismos vivos como resultado da exposição a baixos níveis de um único HPA (Irwin *et al*, 1997).

2.1.1 Fontes dos HPA

As principais fontes desses compostos são: combustão incompleta ou pirólise a altas temperaturas, diagênese de matéria orgânica sedimentada, a baixas temperaturas, para formação de combustível fóssil e biossíntese direta por plantas e bactérias (Neff, 2002, Yunker *et al*, 2002).

Embora os HPA sejam produzidos por processos naturais, as concentrações desses compostos no meio ambiente vêm aumentando devido à intensificação das atividades antropogênicas, também responsáveis pela sua produção. Atividades industriais, incineração industrial e doméstica e a queima de combustível fóssil para geração de energia são grandes emissores de HPA (Neff, 1979).

Os HPA provenientes de fontes antropogênicas podem alcançar o ecossistema aquático através de efluentes industriais e domésticos, escoamento de águas pluviais, deposição de material particulado e acidentes com derramamento de petróleo e derivados nos ambientes aquáticos.

Uma grande variedade de compostos poliaromáticos é sintetizada por organismos, porém a biossíntese direta não é uma fonte quantitativamente importante de HPA no ambiente marinho (Neff, 1979).

Os óleos crus, assim como a maioria dos produtos derivados de petróleo, são misturas extremamente complexas formadas por milhares de compostos orgânicos (Riser-Roberts, 1998), dos quais os hidrocarbonetos são os mais abundantes, representado mais de 75 % da massa do óleo (Neff, 1979, Morrison, 1999). Via de regra os compostos homólogos alquilados estão presentes no petróleo em maiores concentrações do que os HPA parentais (fig. 2.3). Homólogos com dois a cinco alquilas são, normalmente, mais abundantes do que os compostos com apenas uma metila ou com mais de cinco metilas (Neff, 2002).

Portanto, o estudo dos compostos alquilados é de extrema importância para melhor entendermos o mecanismo de contaminação e toxicidade dos HPA de fonte petrogênica.

Os HPA petrogênicos presente no meio ambiente marinho têm diversas origens, entre elas: exsudação natural de óleo, erosão de carvão, xisto, derramamento de óleo e carvão, depósitos de xistos betuminosos, descarte de água de lastro e rejeitos de tanques de óleo e navios, tratados e não tratados, efluente provenientes do refino e óleo, águas de produção de plataformas, termelétricas a carvão e centrais de tratamento de esgoto municipais (Neff, 1979).

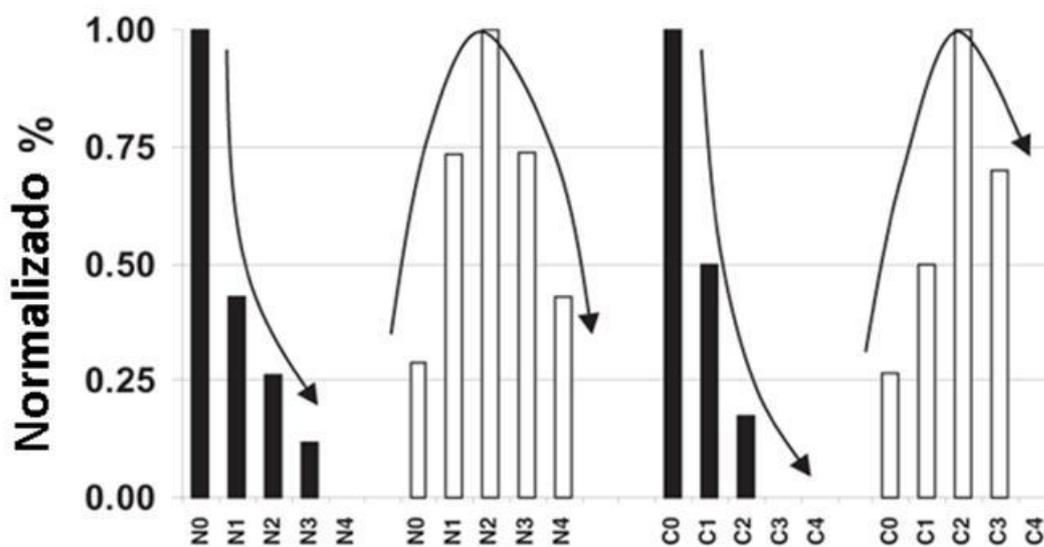


Figura 2. 3 Concentrações relativas dos HPA parentais e alquilados em mistura pirogênica (barras escuras) e em petróleo (barras claras). N-Naftaleno e C-Criseno (Neff, 2002).

2.1.2 Biodisponibilidade, bioacumulação e metabolização dos HPA

A caracterização da exposição de animais marinhos e estuarinos a contaminantes é de extrema importância para os estudos de contaminação ambiental nesses ambientes. Dados de biodisponibilidade, absorção, acumulação e eliminação de contaminantes por animais são necessários para tal caracterização. Os HPA são contaminantes frequentemente encontrados em sedimentos e águas de ambientes marinhos e estuarinos. Altas concentrações de xenobióticos em

animais aquáticos são indicativas de processos eficientes de absorção e acumulação. Como resultados da presença desses contaminantes em tecidos, muitos efeitos toxicológicos podem ser manifestados nos organismos (Newman *et al*, 2002).

A extensão da contaminação dos organismos depende da biodisponibilidade dos xenobióticos nas diversas matrizes (sedimento, água ou alimento) no ecossistema em que vivem. A biodisponibilidade trata da fração do contaminante que se encontra no meio ambiente de forma disponível e a absorção pelos animais dependerá do coeficiente de partição entre as matrizes e os canais de entrada nos organismos.

Todos os seres vivos possuem membranas celulares ou epitélios compostos por camadas de membrana que os separam do meio externo. Tais membranas são formadas por bicamada lipídica, proteínas unilaterais ou trans-membrana e canais com cargas (figura 2.4). Compostos biodisponíveis podem atravessar nos dois sentidos essas membranas de forma passiva, ou serem carregados de acordo com o gradiente físico-químicos ou transporte por sistema enzimático.

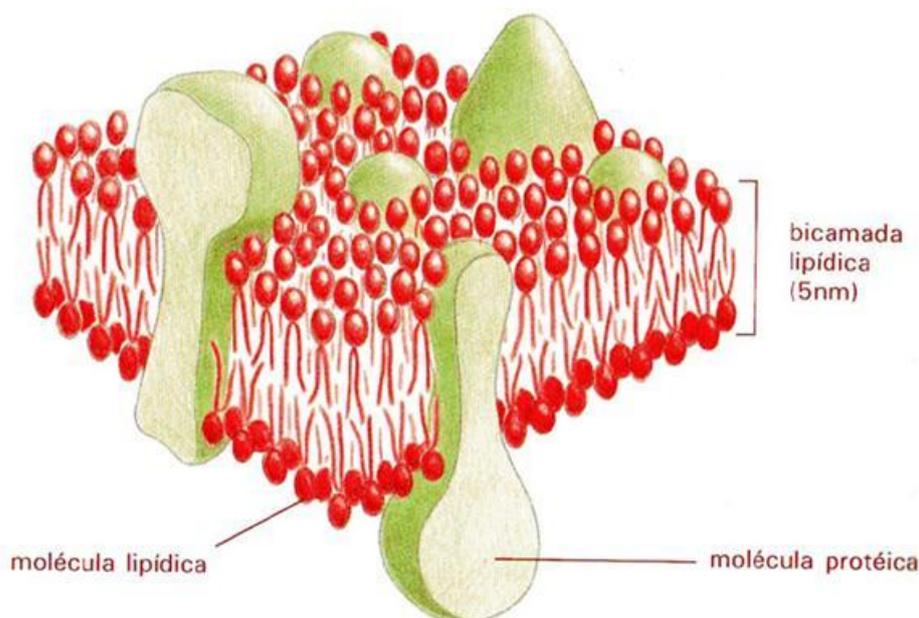


Figura 2. 4 Representação gráfica tridimensional simplificada de membrana celular (Alberts et al, 2004)

Compostos orgânicos, como os HPA, por sua baixa afinidade com a fase aquosa, tendem a formarem ligações fortes com fases orgânica, líquida ou sólida, que esteja disponível, tais como tecido de animais aquáticos, matéria orgânica em partículas de sedimento e colóides orgânicos (material húmico e detritos orgânicos). O coeficiente de partição octano/água (K_{ow}) é um fator que indica a tendência à biodisponibilidade do xenobiótico para um animal, já que a solubilidade de muitos compostos orgânicos não-polares é similar em octanol e em lipídio, portanto ele pode representar o nível de lipofilicidade do composto.

A taxa de absorção do xenobiótico pelo animal é determinada pela hidrofobicidade do composto e o teor de lipídio do organismo. Quanto maior a lipofilicidade apresentada pelo HPA, maior a probabilidade de absorção pelos organismos vivos.

Após a entrada do contaminante, que poderá se dar através das vias digestivas, cutâneas ou respiratórias, o xenobiótico pode ser acumulado no fígado, no caso dos peixes, e no hepatopâncreas ou na glândula digestiva, no caso de moluscos, crustáceos e anelídeos. Os processos de acumulação, biotransformação e eliminação dependerão de fatores como as propriedades físico-químicas do contaminante, a capacidade do sistema enzimático de metabolizar o composto e do teor de lipídio do animal (Newman et al, 2002).

A bioacumulação é a entrada e retenção de um composto biodisponível no organismo a partir de uma ou todas as possíveis fontes externas (comida, ar, água, substrato). Ocorre quando a taxa de absorção do composto pelo organismo excede a taxa de eliminação (Neff, 2002). Ela está fortemente relacionada com o coeficiente de partição K_{ow} do xenobiótico.

Bioconcentração é um caso especial de bioacumulação e é definido pela entrada e retenção de um composto proveniente da água (Neff, 2002). A magnitude da bioconcentração é dada pelo fator de bioconcentração (FBC). O FBC é a razão no equilíbrio da concentração de um composto no tecido de um organismo pela concentração do mesmo composto em solução à qual o organismo encontrou-se exposto. Contaminantes que possuem maior afinidade com alguns tecidos, como lipídios, do que com a água apresentam maiores valores para FBC

(Neff, 2002). Em função da relação entre o Log de K_{ow} e a bioconcentração, é possível prever o equilíbrio do FBC para um composto orgânico não-polar em particular pelo seu Log K_{ow} .

Enquanto a bioconcentração de HPA em organismos marinhos é diretamente proporcional aos respectivos valores de K_{ow} , a bioacumulação destes quando provenientes do sedimento ou alimentação não possui a mesma relação, pois passam por etapas intermediárias antes de sua partição com o tecido lipídico de organismos marinhos. Portanto a biodisponibilidade dos HPA provenientes de sedimento ou alimentação é menor do que a da fração presente na água (Pruell et al., 1987 apud Neff, 2002).

O principal mecanismo de eliminação de um contaminante a partir dos tecidos de um organismo é através da difusão passiva envolvida na partição entre o corpo lipídico e a solução aquosa no exterior. A eliminação de forma passiva pode ser rápida para HPA de baixo peso molecular, porém é muito lenta para os compostos com pesos moleculares maiores, altos K_{ow} e baixa solubilidade em água. Caso não haja metabolismo e processos de excreção ativos, haverá a bioacumulação nos tecidos dos organismos marinhos. No entanto, muitos organismos, para aumentar a taxa de eliminação desses compostos exógenos, são capazes de metabolizar alguns HPA convertendo-os em compostos mais polares e solúveis, produtos que serão mais rapidamente excretados (Neff, 2002). Esta biotransformação pode ser compreendida como um conjunto de alterações químicas que as substâncias sofrem no organismo, geralmente por processos enzimáticos, com o objetivo de formar derivados mais polares, menos tóxicos e mais fáceis de serem eliminados. Porém, nem sempre este processo conduz à diminuição da atividade tóxica do composto (Azevedo e Chasin, 2004).

As enzimas responsáveis pelos processos de biotransformação não apresentam especificidade própria aos tóxicos, e independentemente da substância, o metabolismo do organismo reagirá da mesma maneira por meio, principalmente, de reações de redução e oxidação.

A atividade enzimática pode ser notadamente aumentada quando os animais estão em contato com compostos exógenos, tais como alguns HPA. A indução

enzimática caracteriza-se, principalmente, pelo aumento do conteúdo de isoenzimas específicas do citocromo P450 (CYP) (ou monooxigenase ou oxidase de função mista) e pela ativação da biotransformação de substâncias lipossolúveis (Azevedo e Chasin, 2004). O sistema enzimático CYP está presente no fígado ou em outros tecidos dos organismos vivos. Nos crustáceos a biotransformação de compostos lipofílicos ocorre principalmente no hepatopâncreas. Porém há muitas referências à atividade do CYP em vários diferentes tecidos (Dam *et al*, 2008).

Há varias famílias do CYP, das quais as famílias 1, 2, 3 e 4 são importantes na metabolização dos xenobióticos. A família CYP1 auxilia na quebra e eliminação de muitos HPA acumulados através da bile e urina. Crustáceos normalmente possuem um sistema de CYP ativo, aumentando a velocidade de excreção dos HPA acumulados.

A biotransformação dos HPA em organismos aquáticos por esse sistema de reação enzimática ocorre em duas fases. As reações de fase I, catalisadas pelo sistema de monooxigenases, envolve a introdução de um grupo funcional na molécula de HPA, transformando-a em compostos eletrofílicos e mais reativos, tais com diolepóxidos. Nas reações de fase II os produtos da fase anterior são então conjugados, ligando-se a grupamentos hidrofílicos tais como ácidos glucurônicos e glicurônicos, sulfatos e glutatonas, produzindo um derivado mais solúvel e menos reativo que pode ser excretado rapidamente , (Orbea *et al*, 2002). Onyemauwa *et al* (2009) sugeriram o esquema da figura 2.5, o qual utiliza o fenantreno para ilustrar o principal caminho metabólico dos HPA. A primeira etapa envolve a formação de epóxidos através das enzimas do CYP. Os epóxidos podem se rearranjar espontaneamente em fenóis, congugados de glutatonas , dihidrodiois ou reagir com macromoléculas formando adutos.

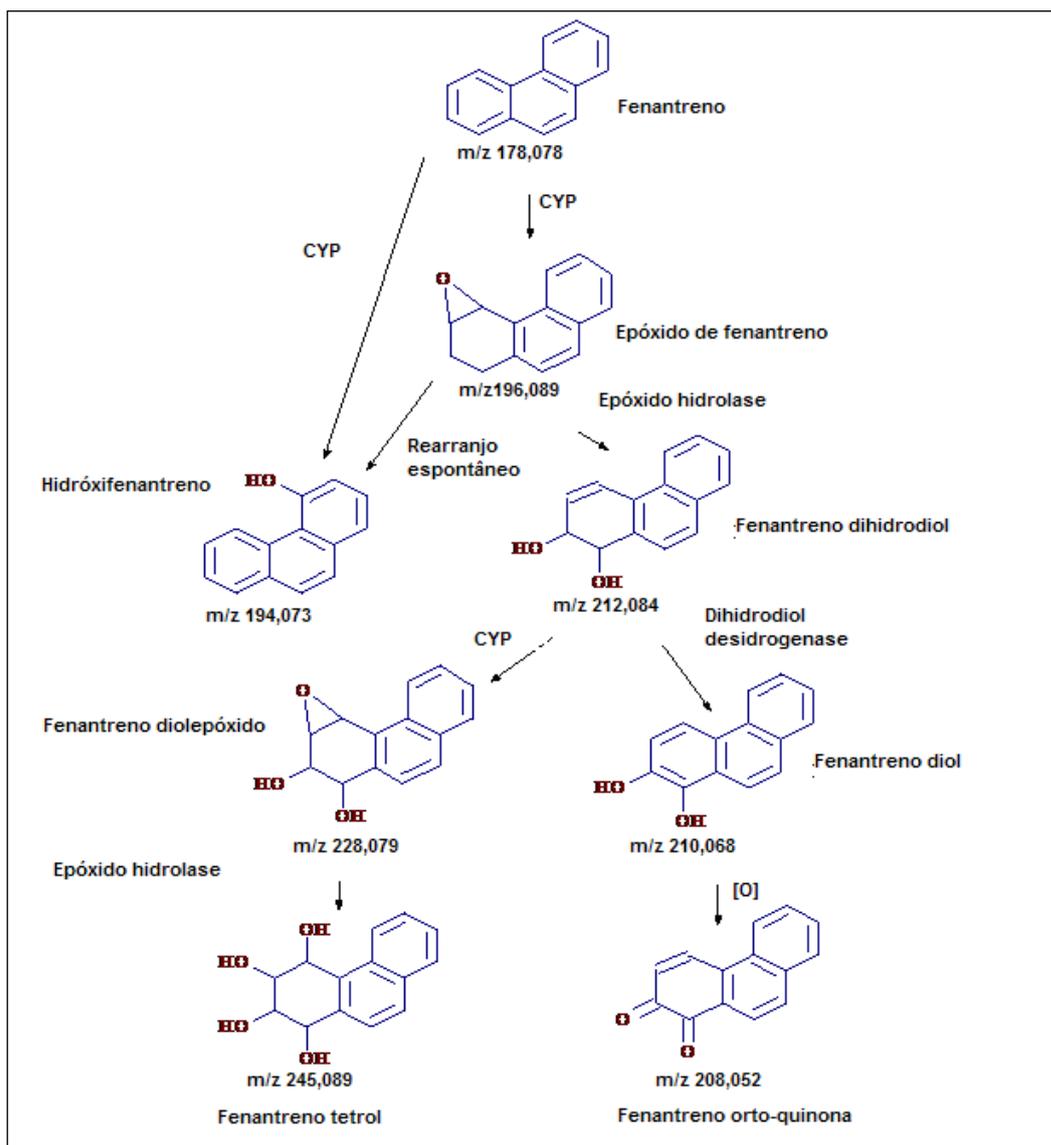


Figura 2. 5 Esquema metabólico de hidrocarbonetos policíclico aromáticos utilizando o fenantreno como modelo (adaptado de Onyemauwa et al, 2009).

Muitos invertebrados possuem altas atividades do sistema epóxido hidrolase e atividades mais baixas no glutathione S-transferase do que nos peixes, sugerindo que os conjugados de glutathione e sulfatase sejam mais importantes nos invertebrados (Neff, 1979). A principal rota de eliminação dos HPA metabolizados é através da urina (Onyemauwa *et al*, 2009).

2.1.3 Toxicidade dos HPA

OS HPA têm sido largamente estudados (Francioni et al, 2005; Dungan et al, 2005; Nudi et al, 2007; Meniconi, 2007; Umbuzeiro et al, 2006; Luo et al, 2006; Farias et al, 2008; Bellas et al, 2008, Nudi et al, 2010) devido aos seus efeitos toxicológicos nas espécies aquáticas e em humanos (Lipiatou et al, 1997). Vários componentes do grupo dos HPA são capazes de reagir com o DNA, tornando-se potenciais carcinógenos e eficientes mutágenos (Cresteil & P. Lesca, 1983, Topinka *et al*, 1998, Netto et al, 2000).

Compostos de diferentes pesos moleculares apresentam efeitos bastante diferenciados sobre o sistema biológico. Compostos de baixo peso molecular (2-3 anéis) apresentam alta toxicidade para organismos aquáticos, porém a maioria dos HPA carcinogênicos possui alto peso molecular (Neff, 1979).

A toxicidade desses compostos está principalmente relacionada a sua propriedade lipofílica, que permite que os HPA sejam incorporados à dupla camada de fosfolipídios da membrana celular, o que pode resultar numa mudança da estrutura da membrana, interferindo no funcionamento da célula (Stroomberg, 2002). Porém, para exercer tais efeitos há necessidade de ativação dos HPA pela metabolização (fig. 2.6). Ao sofrerem o mecanismo de biotransformação de fase I, os HPA se tornam eletrofílicos e mais reativos, como citado anteriormente, podendo se associar e causar danos a substratos endógenos como proteínas, membranas e o DNA (Orbea *et al*, 2002).

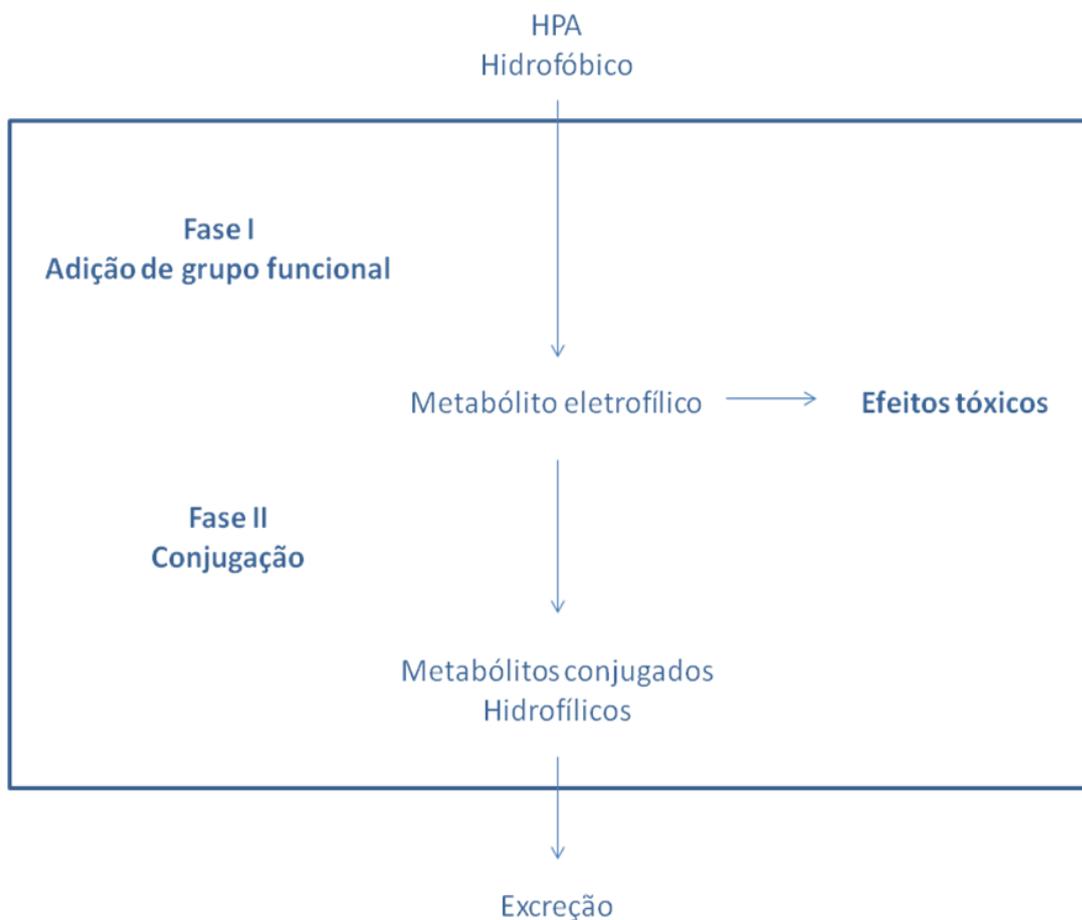


Figura 2. 6 Modelo de processo de biotransformação de HPA com etapas de ativação e conjugação do composto.

Alguns HPA, como benzo(a)pireno, fenantreno e criseno, possuem uma região côncava, conhecida como região de baía, formada pelas ramificações na sequência de anéis benzênicos (fig. 2.7). Compostos que possuem essa região são considerados carcinogênicos mais potentes, pois tal organização dos átomos de carbono fornece um alto grau de reatividade bioquímica (Baird, 2002).

Diolepóxidos formados na região de baía dos HPA são resistentes às reações de hidrólise pela enzima epóxido hidrolase devido ao seu bloqueio estérico. Tal resistência à hidrólise pode explicar o potencial carcinogênico do benzo(a)pireno-7,8-diolepóxido e diolepóxidos de outros HPA que possuem a região de baía (Onyemauwa *et al*, 2009).

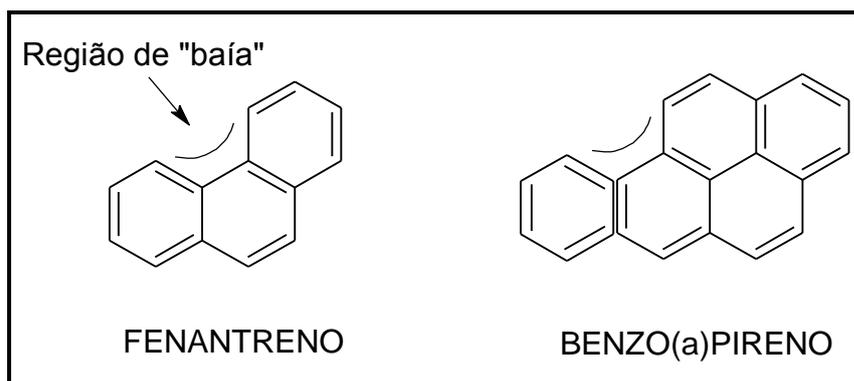


Figura 2. 7 Estruturas Fenantreno e Benzo(a)Pireno com representação da região concôva (Baía).

2.2. Ferramentas analíticas

Análises em fluídos biológicos têm sido utilizadas em diversos estudos com o objetivo de avaliar a contaminação por exposição a poluentes, tais como os HPA, através de diferentes métodos analíticos (Tabela 2.3). Dentre os métodos mais utilizados para determinação de metabólitos nessas matrizes está a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM) que envolve etapas de hidrólise para desconjugar os metabólitos e a etapa de derivatização, para tornar os compostos voláteis.

A cromatografia líquida com detector de fluorescência (CLAE/F) é, também, muito utilizada na determinação de metabólitos em diversos fluídos biológicos (Nudi *et al*, 2010, Nudi, 2005, Stroomberg *et al*, 2004, Aas *et al*, 1998), sendo importante como um método de varredura inicial desses compostos. Nessa técnica, pela qual se determina a concentração individual dos metabólitos (método semi-quantitativo), a grande vantagem é envolver apenas as etapas de preparação e hidrólise da amostra, tornando-o um método mais fácil e rápido de ser executado. A limitação deste método está no fato de que ele só possibilita identificar uma família de metabólicos de aromáticos por análise, enquanto que o método de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (CLAE/EM) possui uma maior seletividade, permitindo a identificação e determinação simultânea dos diversos conjugados de HPA. O método de CLAE/EM é uma combinação excelente envolvendo a qualidades de separação da

cromatografia líquida com a seletividade do espectrômetro de massas, sendo uma poderosa ferramenta para análises qualitativa e quantitativa de compostos polares e não-voláteis (Ariese *et al*, 1997), que necessitam da etapa de derivatização para serem analisados por CG/EM. A utilização de CLAE/EM permite determinar ambos os metabólitos, conjugados e não conjugados, por várias técnicas de ionização, tais como electrospray (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI), termospray (PTS), partículas e feixe (PB). Hoje, ESI e APCI são as técnicas mais utilizadas (Voyksner, 1994 apud Ariese, 2005; Willoughby *et al.*, 1998, apud Ariese, 2005) e há um grande crescimento em estudos que reportam a determinação de metabólitos de HPA por CLAE/EM (Onyemauwa *et al*, 2009, Smith *et al*, 2009, Ferrari *et al*, 2002, Pérez & Barceló, 2001).

Nudi *et al* (2007) mostraram que a análise de HPA em hepatopâncreas de *Ucides cordatus* por CG/EM é uma excelente ferramenta para diagnóstico ambiental, quando comparada à determinação de concentrações desses compostos em sedimento, por mostrar a capacidade de bioacumulação dessas substâncias em caranguejos provenientes de áreas contaminadas. Visto que os crustáceos são capazes de metabolizar e excretar os HPA, é de grande importância a complementação do estudo sobre a formação de metabólitos em urina e da concentração de HPA em hepatopâncreas a fim de obter uma avaliação mais completa sobre a ação de biotransformação no metabolismo destes organismos.

Após avaliar a concentração de HPA em tecidos de bivalves, Camus e colaboradores (2003) observaram correlação entre os altos níveis desses compostos no tecido muscular dos organismos com o sedimento ao qual foram expostos, através da avaliação do dano na membrana celular (biomarcador biológico).

Tabela 2. 3. Métodos utilizados para detecção de HPA e seus metabólitos em diferentes matrizes ambientais e biológicas.

Grupo	Espécie	Matriz	Compostos analisados	Métodos	Autor
Crustáceos	<i>Ucides cordatus</i>	Urina	Metabólitos de pireno	CLAE/F	Nudi <i>et al</i> (2010)
Crustáceos	<i>Ucides cordatus</i>	Hepatopâncreas	HPA	CG/EM	
Crustáceos	<i>Ucides cordatus</i>	Hepatopâncreas	HPA	CG/EM	Nudi <i>et al</i> (2007)
Crustáceos	<i>Macrophthalm ushirtipes</i>	Urina	Metabólitos de HPA	CLAE/F	Koenig <i>et al</i> (2008)
Crustáceos	<i>Carcinus maenas</i>	Urina	Metabólitos de pireno	CG/EM	Watson <i>et al</i> (2004)
Crustáceos	<i>Carcinus maenas</i>	Hemolinfa	Metabólitos de pireno	CG/EM	
Crustáceos	Diversas espécies	Água	Metabólitos de pireno	CLAE/EM	Ikenaka <i>et al</i> (2007)
Bivalve	<i>Perna perna</i>	Tecido mole	HPA	CG/EM	Francioni <i>et al</i> (2007)
Peixe	Diversas espécies	Músculo	HPA	CG/EM	Hellou <i>et al</i> (2006)
Peixe	<i>Carassius auratus</i>	Músculo	Fenantreno	CLAE/F	Sun <i>et al</i> (2006)
Peixe	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Bile	Benzo(a)pireno e metabólitos	CLAE/EM	Zhu <i>et al</i> (2008)
Crustáceo	<i>Carcinus maenas</i>	Urina	Metabólitos de fenantreno	Espectrofluorimetria	(2001)
Peixe	<i>Gadus morhua</i>	Bile	Metabólitos de pireno	CLAE/F	Aas <i>et al</i> (1998)

2.3. Ensaio do micronúcleo

A formação de micronúcleo (MN) tem sido extensivamente utilizada em epidemiologia molecular como biomarcador de danos microssomiais e instabilidade genômica de organismos marinhos expostos a uma variedade de compostos tóxicos e poluentes genotóxicos (Casini *et al*, 2006, Knopper *et al*, 2005, Fossi *et al*, 2000, Wedderburn *et al*, 1998, Venier *et al*, 1997, Burgeot *et al*, 1995), principalmente por se tratar de um marcador biológico de rápido acesso e de fácil avaliação. Acredita-se que o MN, que aparecem em células com

alterações microssomiais, são relevantes para a carcinogênese (Iarmarcovai *et al*, 2008). O MN consiste de uma pequena massa nuclear, constituída de fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucléico) que não foram incluídos no núcleo principal. São formados durante fase de mitose ou meiose (divisão celular). Assim sendo, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico. Os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular (Fenech *et al*. 1997).

Oliveira e colaboradores (2007) mostraram o potencial genotóxico do fenantreno ao avaliar a formação de aberrações celulares em peixes da espécie *Liza aurata* que se encontraram maiores na presença desses compostos.

2.4. *Ucides cordatus*

Os invertebrados constituem 95% de todas as espécies animais (Ruppert *et al*, 1996), eles representam o maior componente em todos os ecossistemas. Por se tratar de populações freqüentemente numerosas, sua amostragem pode ser realizada sem que a dinâmica de sua população seja afetada significativamente (Fossi, 2000). A compreensão da bioquímica dos invertebrados é de extrema importância para interpretação das respostas às atividades humanas conforme expressa por biomarcadores (Depledge, 1994).

Os crustáceos são espécies extremamente importantes para áreas costeiras e estuarinas, as quais sofrem com freqüência impactos naturais ou antropogênicos, de poluentes como os HPA (Dam *et al*, 2008).

A espécie escolhida para o desenvolvimento deste trabalho foi o *Ucides cordatus*, por ser vastamente encontrado em manguezais brasileiros, assim como no Rio de Janeiro e comercializado pela população que vive nessas áreas. O gênero *Ucides* do filo Arthropoda, faz parte da família *Gegarcinidae*, que por sua vez está inserido na ordem decapoda e super-ordem Eucarina (Ruppert, 1996).

Possuem um exoesqueleto de quitina endurecido pelo acúmulo de carbonato de cálcio. As espécies podem ser marinhas, de águas salobras ou espécies de água doce. Seus órgãos vitais, tais como, coração, cérebro, estômago e brânquias, estão situados no cefalotórax, onde fica o hepatopâncreas, órgão responsável pela secreção de enzimas digestivas e por armazenar substâncias úteis para seu metabolismo (Nascimento, 1993).

Os caranguejos da espécie *Ucides cordatus* vivem grande parte do ano entocados em galerias individuais no sedimento de, no máximo, 1 metro de profundidade (Nord, 1994 apud Alves & Nishida, 2002). Portanto possuem grande interação com o sedimento desses ecossistemas.

O ciclo de vida desse crustáceo é composto de três principais fases: a ecdise (muda), o acasalamento (andada) e a desova. A ecdise constitui a etapa de crescimento do *Ucides cordatus*, ocorrendo, geralmente, uma vez por ano em indivíduos adultos, sendo mais freqüente em jovens.

Os caranguejos *Ucides cordatus* vivem em manguezais, na parte sob influência das marés. Durante a maré alta, estes animais permanecem em suas tocas (galerias) e, na maré baixa, saem em busca de alimentos. A maioria dos caranguejos é onívora se alimentando de vegetais, animais e matéria orgânica em decomposição. O *Ucides cordatus* alimenta-se provavelmente de fungos que crescem nas folhas do mangue ao serem transportadas para o interior das tocas (Nudi, 2005). Sua distribuição geográfica estende-se, no Atlântico Ocidental, da Flórida nos EUA ao sul do Brasil.