

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA**

CARLA DE ALBUQUERQUE

Dissertação de Mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em ciências.

(Área de Saúde Pública)

**Rio de Janeiro
2007**

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública
Curso de Pós-graduação em Saúde Pública

**Uso da acetilcolinesterase e metalotioneína em peixes na
avaliação do efeito da contaminação na Baía de
Guanabara.**

CARLA DE ALBUQUERQUE

Orientadora: Ana Rosa Linde Arias

FICHA CATALOGRÁFICA

Albuquerque, Carla

Título: Uso da acetilcolinesterase e metalotioneína em peixes na avaliação do efeito da contaminação na Baía de Guanabara

x, 81 pg

Orientador: Ana Rosa Linde Arias

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

Antes de iniciar esta parte, já vou começar a agradecendo a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram e contribuíram com algo durante a minha vida até o presente momento. O espaço é pouco para agradecer a todos vocês.

A minha mãe pela paciência de me agüentar de mal humor neste período e dedicação por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, conversando sempre comigo. E ao meu pai pela amizade, carinho e conselhos valiosos que muito me ajudam.

Aos meus padrinhos que foram uns dos principais responsáveis por meu aprendizado e agradeço a dedicação que sempre tiveram comigo e conversas grandiosas que muito auxiliam minha vida.

Ao meu amado e futuro marido André, pela amizade, dedicação, conselhos, pelo esforço de ter paciência comigo, pois eu abusava, pelos momentos felizes que me proporcionou até agora. Na verdade agradeço principalmente, porque sem ele hoje não estaria aqui defendendo esta tese, neste local, obrigada por confiar em mim e acreditar no meu potencial. Por isso te digo: a beleza das pessoas está na capacidade de amar e encontrar no próximo a continuidade do seu ser, por isso preciso de você para seguir em frente juntos por toda eternidade.

A minha orientadora, Ana Rosa pela dedicação, amizade, apoio e ensinamentos para que pudesse ser desenvolvido este trabalho.

A todos do CESTEJ, em especial aos colegas do meu laboratório, ao Alan, Vanessa, Kizzy, Ione pela atenção, carinho e momentos especiais e agradáveis na bancada, ao Sérgio meu amigo, a Juju pela grandiosa estatística e agradeço em especial.....

.....a amiga Marina pela sincera amizade e companhia de todas as horas, das idas e vindas da UFRJ e das idas de “madrugadas” a Itaipu. Sem ela esses trajetos não seriam possíveis, ou se possíveis seriam um tédio e muito chato, pois não teriam nossas conversas construtivas do caminho. Obrigada por tudo, principalmente pelas grandiosas conversas e conselhos.

Ao Professor Marcelo Vianna pelos grandes conhecimentos que muito me ajudaram para o desenvolvimento da tese.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia e Tecnologia Pesqueira da UFRJ, Demarques, Rodrigo e a todos pela coleta dos peixes, sem eles não seria possível o desenvolvimento

deste trabalho com estas espécies. Agradecendo, principalmente a Amanda que muitas quartas feiras ficava até tarde nos ajudando a dissecar os peixes com maior boa vontade e bom humor, sem ela não seria possível fazer todos os peixes que chegavam neste dia.

Agradeço em especial a Ana Paula que muito me ajudou e conversou comigo sobre muitas coisas que me auxiliaram em diversos pontos da minha tese e da minha vida.

A Kátia e a Juju do INCQS que muito me ajudaram nos experimentos, ficando comigo até a hora de acabarem minhas análises. Obrigada por tudo.

Com 14 anos de convivência não poderia me esquecer dos meus amigos queridos e especiais do CPII, Mariana, Marlene e Mario, que sempre estão ao meu lado me ajudando em todos os momentos da vida, pela enorme contribuição, que mesmo sem saberem, me deram para o desenvolvimento da tese, pelo simples fato de me ouvirem.

Aos meus amigos amados do centro, Raquel, Juju, e Fabrício, pela vindas aqui em casa pra comer brigadeiro que me faziam espairecer a cabeça quando estava estressada e aos conselhos que cada um deles me deram todas as vezes que precisei e não precisei, e agradeço também pelo empréstimo do ouvido quando precisava falar.

A Dani, Ju e Fabio pela amizade e dias que passei com eles, conversando, zoando e me fizeram distrair principalmente neste período de tese, Você sabe né Dani!

A todos os pescadores da Praia de Itaipu, principalmente Sr. Cambuci, pelos peixes coletados e depois separados para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, Ana Carolina, Daniely e Murata, pela companhia e amizade dentro e fora de sala de aula.

INDICE	pg
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	16
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. A importância do ecossistema marinho e sua degradação.	18
1.2. Áreas de estudo	19
1.2.1. Baía de Guanabara	20
1.2.2. Praia de Itaipu.....	23
1.3. Substâncias químicas e sua presença no ambiente marinho	25
1.3.1. Metais	25
1.3.2. Agrotóxicos	26
1.4. Biomarcadores.....	28
1.4.1. Metalotioneína – MT.....	30
1.4.2. Acetilcolinesterase – AChE	31
1.4.3. Índices Brutos.....	32
1.5. Bioindicadores: Peixes	33
1.5.1. <i>Chilomycterus spinosus</i> – Baiacu-de-espinho.....	34
1.5.2. <i>Micropogonias furnieri</i> - Corvina	36
2. OBJETIVOS.....	38
2.1. Objetivo geral.....	38
2.2. Objetivos específicos.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Reagentes	40
3.2. Equipamentos e instrumentos.....	40
3.3. Amostragem	41
3.3.1. Método de coleta na Baía de Guanabara.....	42
3.3.2. Método de coleta na Praia de Itaipu	43

3.4. Determinação da MT por polarografia.....	44
3.5. Curva de Concentração de Substrato (Acetilcolina- ASCh).....	46
3.5.1. Curva Concentração de Substrato para o baiacu-de-espinho.....	46
3.5.2. Curva Concentração de Substrato para as corvinas.....	46
3.6. Análise da atividade enzimática da acetilcolinesterase.....	47
3.6.1. Curva de Inibição da AChE.....	49
3.7. Fator de Condição (FC).....	51
3.8. Índice Somático do Fígado (ISF).....	51
3.9 Análises estatísticas.....	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Parâmetros biológicos.....	52
4.1.1. Parâmetros biológicos dos baiacus-de-espinho.....	52
4.1.2 Parâmetros biológicos das corvinas.....	54
4.2. Influência do sexo nos parâmetros biológicos e nos biomarcadores nas duas espécies coletadas na BG e na PI.....	56
4.2.1. Índice somático do fígado - ISF - nos baiacus-de-espinho e nas corvinas.....	57
4.2.2. Fator de condição - FC - no baiacu-de-espinho e na corvina separados por sexo.....	59
4.2.3. Influência do sexo na atividade colinesterásica – AchE - dos baiacus-de-espinho e das corvinas.....	61
4.2.4 Influência do sexo na Metalotioneína – MT - dos baiacus-de-espinho e das corvinas.....	63
4.3. Análise dos parâmetros biológicos das espécies coletadas na BG e na PI.....	65
4.3.1 Análise do ISF e do FC dos baiacus-de-espinho e das corvinas coletados na BG e na PI.....	65
4.4. Análise dos biomarcadores nas espécies coletadas na BG e na PI.....	68
4.4.1. Níveis de MT nos baiacus-de-espinho e nas corvinas coletados na BG e na PI.....	68
4.4.2. Atividade da AChE nos baiacus-de-espinho e nas corvinas coletados na BG e na PI.....	69
5. DISCUSSÃO.....	72
5.1 Análise dos parâmetros biológicos nas espécies.....	73
5.2. Influência do sexo nos índices brutos.....	74
5.2.1 Influência do sexo no ISF dos baiacus-de-espinho e das corvinas.....	75
5.2.2. Influência do sexo no FC dos baiacus-de-espinho e das corvinas.....	76
5.2.3 Influência do sexo na AChE dos baiacus-de-espinho e das corvinas.....	76
5.2.4 Influência do sexo na MT dos baiacus-de-espinho e das corvinas.....	77
5.3. FC e ISF na avaliação dos efeitos da contaminação da BG e da PI nos baiacus-de-espinho e nas corvinas.....	78

5.4. Efeitos da contaminação ambiental utilizando biomarcadores específicos	80
5.4.1. Avaliação do efeito da contaminação na BG e na PI utilizando MT em baiacus-de- espinho e em corvinas.	80
5.4.2. Avaliação do efeito da contaminação na BG e na PI utilizando AChE em baiacu-de- espinho e em corvinas.	82
6. CONCLUSÃO	85
7. REFERÊNCIAS	87

RESUMO

A Baía de Guanabara – BG – é um dos mais importantes sistemas estuarinos do Brasil, com uma grave condição de degradação ambiental. A BG apresenta uma complexa situação de poluição por diversas substâncias entre as quais se destacam os metais e os inseticidas. A simples medida destes poluentes não mostra o efeito real que estes exercem sobre a biota. Os biomarcadores são capazes de mostrar a presença de poluentes e/ou a magnitude da resposta do organismo exposto, por isso foram utilizados dois biomarcadores específicos neste estudo. A Metalotioneína – MT como biomarcador da exposição a metais, e a acetilcolinesterase – AChE - como biomarcador de exposição a organofosforados e carbamatos. Também foram utilizados índices brutos como ferramentas complementares dos efeitos da contaminação, o fator de condição - FC – que fornece informações sobre a condição geral de saúde do organismo e o índice somático do fígado – ISF - que fornece informação sobre possíveis desordens no fígado. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da contaminação na BG utilizando MT e AChE como biomarcadores específicos e FC e ISF como índices brutos. Também foram analisadas a relação dos parâmetros biológicos - sexo e maturidade sexual - das espécies em estudo com os biomarcadores e índices brutos para verificar se há influência desses parâmetros. Tanto *Chilomycterus spinosus* – baiacu-de-espinho quanto a *Micropogonias furnieri* - corvina foram escolhidas pela sua significância ecológica e comercial respectivamente, sendo ambas coletadas na BG e na Praia de Itaipu – PI, que foi selecionada como região controle. A quantificação dos níveis MT se deu por Polarografia de Pulso Diferencial. E a análise da atividade da AChE foi por espectrofotometria, por meio da reação de Ellman. Os resultados mostram que o sexo e a maturação sexual de ambas as espécies não influencia significativamente nos valores dos biomarcadores específicos e nos índices brutos, e desta maneira os sexos puderam ser agrupados. O FC apresentou valores significativamente maiores na região controle para as duas espécies, o que indica que os peixes dessa região apresentaram melhores condições gerais de saúde que dos da BG, mostrando-se como um bom índice bruto de avaliação dos efeitos contaminação. Isso difere do ISF que não se mostrou uma boa ferramenta de avaliação, pois os valores encontrados, em contra do esperado, nas duas espécies, foram maiores na região controle que na BG. Já nas análises dos biomarcadores específicos, os níveis de MT de ambas as espécies foram significativamente maiores na BG que na região controle, mostrando uma indução nos níveis desta proteína ocasionado pelo efeito que a contaminação por metais vem causando na biota da BG. A AChE possui uma atividade significativamente menor nas duas espécies coletadas na região da BG. Isso mostra uma inibição por agentes anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos) na biota marinha desta região. Este trabalho mostrou que o uso dos biomarcadores específicos - Mt e Ache - e do FC nas duas espécies de peixes permitiu avaliar os efeitos diferenciados de uma situação complexa de poluição na BG.

Palavras chaves: Biomarcadores, Metalotioneína, acetilcolinesterase, Fator de condição, Índice somático do fígado, peixes, Baía de Guanabara,

ABSTRACT

Guanabara Bay – BG – is one of the most important Brazilian estuarine systems, currently under a condition of severe environmental degradation. BG has a complex situation caused by many pollutants, among them metal and pesticides. The simple measurement of these pollutants does not reflect the real effect that they exert over the biota. Biomarkers are able to show presence of pollutants and/or the magnitude of the response to exposed organisms. Therefore, this study uses two specific biomarkers, metallothionein – MT- as a biomarker for metal exposure and Acetylcholinesterase – AChE - as a biomarker for pesticides exposure (Organophosphorade - Carbamates). It also uses gross indexes as complementary tools, the Condition Factor CF – that provides information on the health status of the organisms and the Somatic liver index ISF- provides information over possible liver disorders. Hence this investigation aims at assessing the pollution effects in BG by using MT and Ache as biomarkers in two fish species. It also utilizes also the gross indexes CF and ISF on this assessment. It was investigated the relation among biological parameters, sex and sexual maturity, and the biomarkers and gross indexes. *Chilomycterus spinosus* – baiacu-de-espinho e *Micropogonias furnieri* - corvina, were selected for their ecological and commercial significance. They were collected at BG and Itaipu Beach, selected as the control region. Mt quantifications was carried out by Differential Pulse polarography and the activity of AChE by spectrometry using the Ellman reaction. Results show that sex and sexual maturity does not significantly influence the values of the specific biomarkers and gross indexes, therefore animals from different sex were aggregated. CF showed significantly higher values for the two fish species at the control region, indicating that fishes from that region had better health status than fishes from BG. This gross index, CF, has proven therefore to be a good index to assess the effects of pollution. However ISF did not show as an appropriate tool, since the values found in the two species were significantly higher at the control region than BG, against the expected. When analyzing the specific biomarkers, it was found that, in both fish species, levels of MT were significantly higher at BG, showing a induction caused by the effect that metal pollution is causing in the biota of this region, Regarding AChE, it was found significant less activity in both fish species at BG, showing an inhibition caused by anticholinesterasic agent (Organophosphorade - Carbamates) in the biota of BG. In summary, this work shows that specific biomarkers, MT and AChE, and CF in this fish species allowed the assessment of the differential effects of the complex polluted situation of BG.

Keywords: Biomarkers, Metallothionein Acetylcholinesterase, Condition Factor, Somatic Liver Index, Fish, Guanabara Bay,

LISTA DE ABREVIATURAS

AchE	Acetilcolinesterase
ASCh	Acetilcolina
BG	Baia de Guanabara
° C	Graus Celsius
Cd	Cádmio
CESTEH	Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
Cm	Centímetros
Co	Cobalto
Cr	Cromo
CT	Comprimento total
Cu	Cobre
DTNB	5'5 – Ditio-bis (2 – Acido nitrobenzóico)
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas
FC	Fator de Condição
Fe	Ferro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
G	Gravidades
H+	Prótons
H ₂ O	Água
Hab	Habitantes
Hg	Mercúrio
ISF	Índice Somático do fígado
kDa	Kilodalts
Kg	Quilogramas
Km	Quilômetros
m	Metros
M	Molar
MeHg	Metilmercúrio
Mg	miligrama
Min	minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
Mn	Manganês
MPS	Material Particulado em Suspensão
MTs	Metalotioneínas
n	Numero de exemplares de amostras
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanôgrama
Ni	Níquel

nm	Nanômetro
OF	Organofosforado
OMS	Organização mundial de saúde
p.u	Peso úmido
PAHs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Pb	Chumbo
pH	Potencial de hidrogênio
ptn	Proteína
s	Segundos
SH	Sulfidrina
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
µL	Microlitro
µmol	Micromol
V	Volts
vol.	Volume
Zn	Zinco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de espécimes coletadas no total por localidade.....	41
Tabela 2: Dados gerais dos parâmetros biológicos dos <i>Chilomycterus spinosus</i> – baiacu de espinho . Peso, (CT) comprimento total, (ISF) índice somático do fígado, (FC) fator de condição. Valores expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo e N: numero de espécimes analisados.....	53
Tabela 3: Dados gerais dos parâmetros biológicos dos <i>Micropogonias furnieri</i> - Corvina. Peso, (CT) comprimento total, (ISF) índice somático do fígado, (FC) fator de condição. Valores expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo e N: numero de espécimes analisados	55
Tabela 4: Dados dos comprimentos das corvinas jovens e adultas coletadas na Praia de Itaipu...56	
Tabela 5: Dados gerais do índice somático do fígado (ISF) dos <i>Chilomycterus spinosus</i> – Baiacu de espinho – e das <i>Micropogonias furnieri</i> - Corvina, separados por macho (M); fêmea (F); e não identificados (NI). Os valores estão expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo de cada parâmetro avaliado. N: numero de espécimes analisados	58
Tabela 6: Dados gerais do fator de condição (FC) dos <i>Chilomycterus spinosus</i> – Baiacu de espinho – e das <i>Micropogonias furnieri</i> - Corvina, separados por macho (M); fêmea (F); e não identificados (NI). Os valores estão expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo de cada parâmetro avaliado. N: numero de espécimes analisados	60
Tabela 7: Dados gerais das análises de Acetilcolinesterase (AChE) obtidas nos <i>Chilomycterus spinosus</i> – Baiacu de espinho – e nas <i>Micropogonias furnieri</i> - Corvina , separados por macho (M); fêmea (F); e não identificados (NI).). Os valores estão expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo de cada parâmetro avaliado.....	62
Tabela 8: Dados gerais das análises de Metalotioneína (MT) obtidos nos <i>Chilomycterus spinosus</i> – Baiacu de espinho – e nas <i>Micropogonias furnieri</i> - Corvina , separados por macho (M); fêmea (F); e não identificados (NI).). Os valores estão expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo de cada parâmetro avaliado.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto por satélite da Baía de Guanabara	21
Figura 2: Foto por satélite da Baía de Guanabara com destaque na Praia de Itaipu.	24
Figura 3: Estrutura básica de um organofosforado – OF.	28
Figura 4: Estrutura tridimensional da Metalotioneína.....	31
Figura 5: Estrutura tridimensional da Acetilcolinesterase – AChE.	32
Figura 6: Espécie estudada: <i>Chilomycterus spinosus</i> – baiacu-de-espinho.	35
Figura 7: Espécie estudada: <i>Micropogonias furnieri</i> – Corvina.....	37
Figura 8: Mapa da Baía de Guanabara onde foram feitos os arrastos.....	42
Figura 9: Arrasto de praia, realizada, pelos pescadores da colônia Z-7 na PI	43
Figura 10: Polarógrafo Metrohm PGASTAT.....	44
Figura 11: Voltamogramas da curva-padrão de MT purificada realizada com as seguintes concentrações entre $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. (i/A) - corrente, em amperes; (E/V) - potencial, em volts . Da esquerda para a direita, o primeiro pico representa a redução do cobalto (Co^{2+}), o seguinte representa a redução do complexo enxofre-cobalto (RS_2Co) e o último representa a evolução catalítica do hidrogênio (Cat).....	45
Figura 12: Espectrofotômetro Shimadzu UV-1601	48
Figura 13: Curva de de L-cisteína realizadas com as seguintes concentrações de $0\mu\text{moles}$, $10\mu\text{moles}$, $25\mu\text{moles}$, $50\mu\text{moles}$, $100\mu\text{moles}$, $150\mu\text{moles}$, $250\mu\text{moles}$ e $500\mu\text{moles}$	49
Figura 14: Curva de inibição da acetilcolinesterase utilizando.....	50
Figura 15: Curva de inibição da acaetilcolinesterase utilizando organofosforado – Paraoxon em corvina.	50
Figura 16: Valores relativos ao ISF dos baiacus-de-espinho coletados na BG e na PI.....	65
Figura 17: Valores relativos ao ISF da corvina coletadas na BG e na PI	66
Figura 18: Valores relativos ao FC dos baiacus-de-espinho coletados na BG e na PI.	67
Figura 19: Valores relativos ao FC das corvinas coletadas na BG e na PI	67

Figura 20: Níveis de metalotioneínas no fígado dos baiacus-de-espinho coletados na BG e na PI68

Figura 21: Níveis de metalotioneínas nos fígados de corvinas coletadas na BG e na PI.....69

Figura 22: Valores obtidos na análise de acetilcolinesterase dosados no músculo dos baiacus-de-espinho coletados BG e na PI. 70

Figura 23: Valores obtidos na análise de acetilcolinesterase dosados no músculo de corvinas coletadas na BG e na PI.....71

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância do ecossistema marinho e sua degradação.

Os recursos hídricos são utilizados em todo o mundo com distintas finalidades, dentre as quais se destacam o abastecimento de água, a geração de energia, a harmonia paisagística, a irrigação, a navegação, a aqüicultura, e o homem, em particular, depende da água doce estocada em rios, lagoas e baías para sobreviver, ^{1,2} sendo o seu desenvolvimento ligado diretamente ao uso destes recursos. Entretanto, estes vêm sendo intensamente contaminados pela ação do homem, decorrente do despejo de rejeitos no ambiente prejudicando dessa forma a biota marinha e os fatores abióticos. ^{3,4}

Os fatores responsáveis pelas alterações na biota e na qualidade da água podem ser decorrentes da contaminação por substâncias químicas orgânicas e inorgânicas provenientes de fontes que podem ser de origem pontual, como lançamentos de esgotos urbanos e industriais; ou difusa como deposição de resíduos sólidos, uso de agrotóxicos na agricultura e a queima de combustíveis fósseis. Dentre as substâncias químicas inorgânicas que podem contaminar o ecossistema aquático, destacam-se os metais, que possuem propriedades de bioacumulação e biomagnificação; os anticolinesterásicos, que são substâncias pertencentes ao grupo dos inseticidas amplamente utilizados na agricultura que causam sérios problemas toxicológicos nos organismos aquáticos. ^{2,5,6}

A grande quantidade destes poluentes encontrados em corpos d'água vem aumentando gradativamente por todo o mundo concomitantemente com o desenvolvimento de modernização das grandes cidades. ^{7,8} A biota marinha costeira vem sofrendo com esta crescente contribuição de agentes químicos oriundos principalmente de corpos dulciaquícolas continentais. Estes rios

recebem doses diárias de dejetos antropogênicos e o receptor final destes compostos químicos tóxicos é o ambiente marinho,^{9,10,11} sendo, muitas vezes, o destino final de muitos peixes o consumo humano.¹²

Os peixes representam uma das principais fontes de proteína da alimentação humana⁵ sendo encontrados na grande maioria dos ecossistemas aquáticos, onde desempenham um importante papel na cadeia alimentar.¹³ Os principais peixes afetados pelo despejo indiscriminado de dejetos são os predadores, pois se alimentam de praticamente todos os níveis da cadeia trófica, tornando-os mais susceptíveis à contaminação pela capacidade que possuem alguns poluentes de serem biomagnificados.^{14,15}

Os efeitos destes agentes químicos podem ser mensurados objetivando um diagnóstico simples e eficiente, detectando os efeitos destes poluentes sob a biota. Para fornecer estes dados, tem sido recomendada a incorporação da análise de biomarcadores em programas que busquem avaliar a exposição e as alterações causados por contaminantes em ambientes marinhos.^{7,11} Essas alterações comportamentais nos organismos são sempre precedidas por danos moleculares e celulares aos organismos expostos.

Assim sendo, a análise do impacto de xenobióticos através de ferramentas valiosas como os biomarcadores de exposição e efeito tem possibilitado a avaliação da qualidade dos ecossistemas aquáticos através de respostas bioquímicas relacionadas ao potencial tóxico dos contaminantes nos organismos expostos.^{16,17}

1.2. Áreas de estudo

As duas áreas escolhidas para este estudo, foram a Baía de Guanabara - BG e a praia de Itaipu - PI, localizados no Estado do Rio de Janeiro.

1.2.1. Baía de Guanabara

1.2.1.1. Caracterização da Baía de Guanabara

A BG com sua bacia hidrográfica, representa um estuário muito importante no contexto das cidades que ocupam sua orla, pois verifica-se que o uso das águas desse complexo são utilizadas tanto para o abastecimento público e industrial, pesca, navegação, atividades portuárias, quanto para recreação, estética e preservação da fauna e flora.¹⁸

A baía localiza-se entre as latitudes 22° 40' e 23° 00' Sul e longitude 43° 00' e 43° 20' Oeste, possuindo um espelho de água com aproximadamente 381 Km² de área, incluindo 59Km² de ilhas. Das 188 ilhas que existiam em 1500, hoje só restam 127. A baía é um estuário onde deságuam cerca de 35 rios com alta contribuição de efluentes domésticos brutos ou parcialmente tratados.^{18,19,20}

A profundidade média da BG atualmente é de 7,6 metros, apresentando 3 metros, aproximadamente, na região de fundo da baía. Entre a Ilha do Governador e a linha imaginária entre as pontas do Calabouço e Gragoatá, é de 8,3 metros profundos.¹⁹ O canal central da baía prolonga-se desde a entrada da barra até as proximidades das ilhas Nhanquetá e Paquetá, sendo os locais mais profundos da baía, o estreitamento entre as pontas de São João e de Santa Cruz, ultrapassando 50 metros.²¹ A bacia hidrográfica abrange 16 municípios do estado do Rio de Janeiro, sendo 10 integralmente – Duque de Caxias, Mesquita, São João de Meriti, Belford Roxo, Nilópolis, São Gonçalo, Magé, Guapimirim, Itaboraí, Tanguá, - e seis municípios parcialmente - Rio de Janeiro, Niterói, Nova Iguaçu, Cachoeiras de Macacu, Rio Bonito e Petrópolis. Destes 16 municípios, apenas 7 deles possuem limites nas margens da baía, os quais são o Rio de Janeiro, Duque de Caxias, Magé, Guapimirim, Itaboraí, Niterói, São Gonçalo.¹⁸

A densidade populacional de alguns destes municípios atinge os mais altos índices de ocupação do País. Principalmente em Belford Roxo (5.354 hab/km^2), Nioópolis (8.082 hab/km^2) e São João de Meriti (12.427 hab/km^2). Isso faz, também, com que a contribuição de efluentes industriais e domésticos seja alta, pois estas concentrações populacionais já ultrapassam, por si só, a capacidade de suporte do meio ambiente natural da bacia ²¹ (Figura 1). Tais interferências no ambiente natural causam sérias alterações no sistema de circulação de águas, reduzindo a capacidade de autodepuração da baía e causando danos à vida aquática.

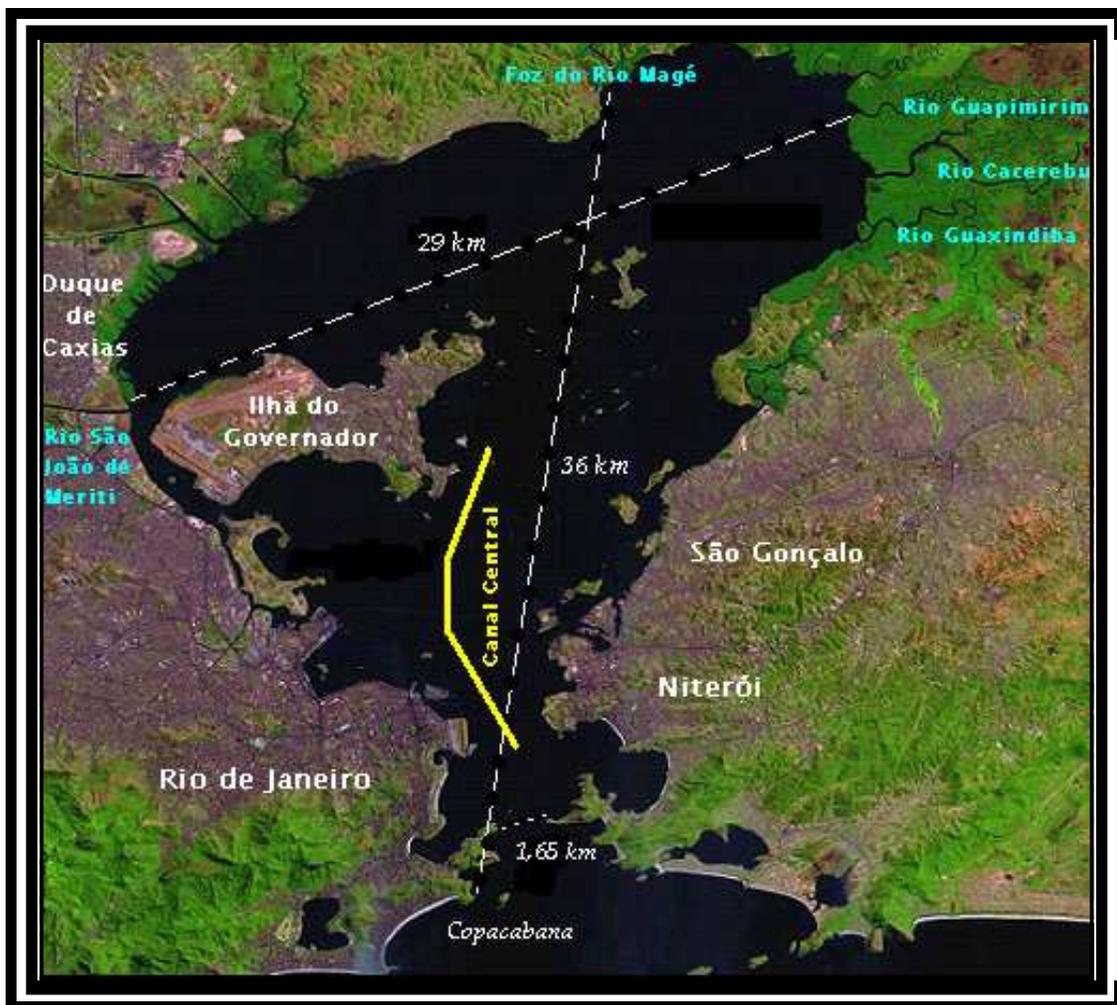


Figura 1: Foto por satélite da Baía de Guanabara

Fonte: elaboração própria, a partir da imagem de satélite Landsat –TM542 de AMADOR, 1997.

1.2.1.1.1 Degradação do estuário e ecossistemas periféricos

A Baía constitui o maior e mais importante sistema estuarino da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, que vem sendo constantemente degradada pela contribuição de efluentes domésticos e industriais, se intensificando, principalmente a partir das décadas de 50-60, com o elevado crescimento urbano.¹⁸ O processo desordenado de urbanização e o desenvolvimento industrial promoveram a ocupação da bacia contribuinte à BG.

Com aproximadamente 14.000 indústrias instaladas, e 7,6 milhões de habitantes ocupando a região, aumentou-se significativamente a contaminação do ecossistema marinho com a utilização de produtos tóxicos, como metais, uso freqüente de organofosforados e os PAHs.^{20, 21,23}

Os inúmeros despejos destas substâncias produzem não só diversos efeitos nos organismos marinhos, afetando de forma considerável estes ecossistemas, como também trazem conseqüências a saúde da população que consome os organismos que vivem neste ambiente, como por exemplo, peixes e crustáceos.^{18,21,24}

Monitorar o ecossistema estuarino da BG é de grande importância, pois esta baía possui é uma região que possui uma situação complexa de poluição. Pois são estimados que 64 toneladas de carga orgânica e sete toneladas de óleo são despejadas por dia neste estuário, contendo 0,3 tonelada de metais como chumbo (Pb), cromo (Cr) , zinco (Zn) e mercúrio (Hg). E as principais responsáveis por este despejo de carga poluente são as indústrias alimentícias e químicas, especialmente as petroquímicas.²⁰

A intensa urbanização ocorrida a partir da década de 50, os grandes aterros e a instalações de inúmeras indústrias são considerados por AMADOR 1997 como marco no processo de poluição e degradação neste estuário, tendo inúmeras conseqüências não só para biota marinha

como para a população residente ou não residente da BG, além da mudança na dinâmica das águas.²¹

1.2.2 Praia de Itaipu

O município de Niterói, localizado no Estado do Rio de Janeiro, possui um trecho de litoral banhado pelo Oceano Atlântico onde se destacam quatro das mais importantes praias do município: Praia de Icaraí, Piratininga, Camboinhas, e a Praia de Itaipu. Esta última encontra-se no bairro de Itaipu, localizado na Região Oceânica de Niterói que possui cerca de 11.136 habitantes, o que corresponde a 2,55% do total deste município.²⁵

A importância desta praia não está relacionada apenas às suas belezas naturais, mas principalmente por ser pouco afetada pela poluição, característica que é assegurada por estar fora da BG.^{26,27} Além disso, destaca-se também por apresentar condições ideais para o banho de mar e para a prática de esportes.²⁷

A PI se localiza no extremo sudeste e apresenta uma extensão de 800 metros. Ela está localizada entre a latitude -22.9666667 e longitude -43.0666667 encontra-se inserida entre pontais rochosos que delimitam sua extensão espacial e fazem suas águas serem normalmente tranquilas exceto sob os períodos de ressaca.^{28,29} (Figura 2)

A enseada de Itaipu é composta pelas Ilhas do Pai, Mãe e Menina, que possibilitam uma praia mansa fora da BG, por conseguinte, apresentam águas límpidas sendo muito procurada pela população de Niterói e de municípios próximos.²⁹ Como já dito anteriormente, a localização da PI fora da baía, assegura que esta praia seja menos afetada por poluentes, por isso ela foi escolhida como região controle em comparação a BG.



Figura 2: Foto por satélite da Baía de Guanabara com destaque na Praia de Itaipu.

Fonte: elaboração própria, a partir da imagem de satélite obtida: <http://www.wikimapia.org>

1.3. Substâncias químicas e sua presença no ambiente marinho

1.3.1. Metais

Na literatura o metal, assim como qualquer outra substância ou matéria, é formado por elementos químicos sendo geralmente descrito como um aglomerado de átomos com caráter metálico em que os elétrons da camada de valência fluem livremente¹⁰⁰

Alguns metais, como Cd, Pb e Hg, estão geralmente associados a problemas de poluição e contaminação do meio ambiente.³¹ Estas substâncias não são biodegradáveis e participam do ciclo ecológico global no qual a água tem papel principal de transporte destes elementos.

Na água, os metais podem estar presentes nas formas particulada - em suspensão ou sedimento de fundo -, ou dissolvida, sendo constantemente redistribuídos entre estas fases durante seu transporte³² e, dependendo de sua forma química, podem ser acumulados em organismos vivos. As concentrações dos metais na forma dissolvida são baixas, estando estes elementos preferencialmente associados ao material particulado em suspensão (MPS) e ao sedimento de fundo.³³ Os MPS são constituídos de materiais orgânicos e inorgânicos originados de processos naturais e de atividades antrópicas.^{34,35} As partículas inorgânicas consistem principalmente de argilas e vários precipitados como óxidos e hidróxidos de ferro (Fe) e manganês (Mn), sendo responsáveis pelo carregamento de metais em corpos d'água. Neste transporte os metais associados às partículas do MPS podem ser depositados no sedimento de fundo tornando-se potencialmente biodisponíveis aos organismos aquáticos de fundo.^{2,34,35} Deste modo, quando os metais estão disponíveis no ecossistema, eles têm a capacidade de bioacumular-se e de biomagnificar-se.^{36,37}

Em virtude disso, as análises de água e sedimento apesar de serem importantes para a avaliação da contaminação ambiental por metais, elas ainda não podem fornecer dados reais sobre

a disponibilidade e os efeitos reais dos metais nos organismos. Assim sendo, a análise de biomarcadores na biota constitui uma importante ferramenta em programas de monitoramento ambiental, pois avalia o efeito real da contaminação.²

1.3.2. Agrotóxicos

Na literatura existem diversas definições para os agrotóxicos, entretanto, talvez a mais completa e utilizada seja da Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas – FAO, define agrotóxicos como sendo “*Substâncias ou misturas utilizadas com o objetivo de prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças não só animal como também vegetal, além de espécies indesejáveis que causem danos ou que de alguma forma interfiram durante a produção, processamento, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos relacionados a agricultura, madeira e seus derivados, rações ou ainda substâncias que possam ser administradas em animais para controle de insetos ou outras pragas. Inclui-se ainda substâncias utilizadas como reguladoras de crescimento de plantas, desfolhantes, agentes para prevenir a queda prematura de frutas e substâncias aplicadas a plantação, antes e/ou depois da colheita, para prevenir deterioração durante a estocagem e/ou transporte.*”³⁸

A classificação dos agrotóxicos pode ser feita de distintas maneiras, dentre elas: de acordo com sua estrutura química, organismo alvo, toxicidade e etc, baseando-se na distinção dos que podem causar maior ou menor risco a saúde.³⁹

Embora a classificação por toxicidade seja a mais comum, uma forma corriqueira de classificação dos agrotóxicos é a que se baseia no organismo alvo da substância. Segundo este parâmetro são classificados como inseticidas, herbicidas, fungicidas dentre outros e quanto a sua estrutura química são classificados como: Organoclorados, Piretróides, Organofosforados,

Carbamatos, etc.³⁸ Uma outra classificação dos agrotóxicos é quanto seu efeito biológico, exemplo: anticoagulantes (ex.: warfarina), anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos), etc sendo os organofosforados os inseticidas mais usados tanto na agricultura quanto no meio urbano.⁴⁰

1.3.2.1 Organofosforados

Os organofosforados – OFs - são compostos derivados do ácido fosfórico e a nomenclatura mais comum baseia-se nos átomos e radicais que se ligam ao átomo central de fósforo.³⁸ Figura 3. Eles foram desenvolvidos na Alemanha em 1930 como substituto da nicotina e de potenciais agentes químicos de guerra devido a sua característica de baixa persistência no ambiente, sendo portanto, uma das principais classes de inseticidas mais utilizadas em todo o mundo⁴⁰.

Embora estes compostos tenham uma rápida degradação no ambiente, eles geralmente não têm um alvo específico, mas podem formar metabólitos altamente tóxicos e persistentes com elevada toxicidade aguda para muitas espécies de invertebrados e vertebrados. Desta forma muitos organismos terrestres e aquáticos podem ser afetados por estas substâncias.^{40,41}

O uso do OF é bastante amplo. Na agricultura, por exemplo, o clorpirifós e terbufós são os dois principais mais utilizados para controle de insetos em frutas e vegetais, colheitas de grãos. Já o mais comum para uso doméstico e em jardins são o diazinon e clorpirifós. E para uso industrial, comercial, se destaca novamente o clorpirifós e o malation.⁴⁰

A toxicidade destes inseticidas nos organismos se dá pela inibição de um grupo de enzimas conhecidas como colinesterases, especialmente a acetilcolinesterase - AChE -, presente no sistema nervoso e nos músculos.^{40,41} Quando esta enzima fica inativa pela sua ligação com os

OFs há um acúmulo de neurotransmissores - acetilcolina - na fenda sináptica o que desencadeia uma série de efeitos.³⁸ Por isso para se avaliar os efeitos que estes compostos estão causando na biota, é de grande valia a utilização da AChE como indicadora de efeito da contaminação por OF.

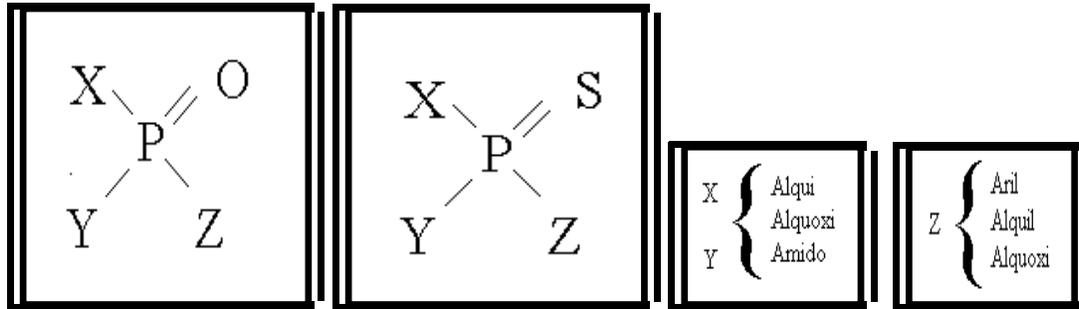


Figura 3: Estrutura básica de um organofosforado – OF.

Fonte: Adaptação do CASARETT, 1996.

1.4. Biomarcadores

Nas duas últimas décadas, a evolução da ciência possibilitou uma melhor compreensão dos efeitos causados pelos xenobióticos ao meio ambiente e à sua biota através do desenvolvimento e aperfeiçoamento de indicadores biológicos.⁴² Estes indicadores biológicos ou biomarcadores são capazes de indicar eventos que precedem os efeitos irreversíveis de contaminantes ao ambiente e/ou aos organismos, permitindo, por meio de análises relativamente simples, fornecer uma indicação geral prévia de contaminação.^{42, 43}

Os biomarcadores são medidas de fluidos corporais, células e tecidos, ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, compartimentais ou energéticos a presença de poluentes ou a magnitude da resposta do animal exposto.⁴⁴

Existem biomarcadores moleculares, celulares e ao nível animal completo. Uma das características mais importantes para o uso destes é a possibilidade de identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos permitindo a detecção do efeito da exposição.¹⁰³ Vários parâmetros bioquímicos tem sido testados em peixes com relação as suas respostas a substancias tóxicas.⁵⁵ Entre eles, os moleculares que representam aspectos comuns entre organismos de diferentes espécies com a vantagem de poderem ser aplicados a uma ampla variedade de organismos vivos.¹⁰¹

São utilizados em muitos organismos vertebrados e invertebrados os biomarcadores moleculares entre eles é bastante conhecido não só a Metalotioneina que é induzida pela exposição a metais; como também a acetilcolinesterase que é inibida com a presença de OFs e carbamatos.¹⁰²

A utilização de uma bateria de biomarcadores, em diferentes níveis de organização, pode ser uma ótica inovadora e eficiente no que diz respeito à avaliação da poluição sendo de grande importância por descrever o efeito real dos contaminantes sobre os organismos do ecossistema ao invés de apenas quantificar a poluição em componentes abióticos. Ambas avaliações podem e devem ser utilizados em conjunto, porém ao utilizar apenas o monitoramento ambiental convencional corre-se o risco de subestimar ou superestimar a contaminação da biota.^{11, 44}

Diversos biomarcadores vêm sendo utilizados para avaliar os efeitos da contaminação ambiental por xenobióticos em organismos, como a metalotioneina.

1.4.1. Metalotioneína – MT

Metalotioneínas - MTs compreendem uma família de proteínas que são induzidas pela exposição a metais.⁴⁴ (figura 4) São caracterizadas pelo baixo peso molecular (6-7 kDa) e por conter um grande grupo de resíduos de cisteína (20) que servem como ligantes para os metais.⁴⁵

Sabe-se que essas proteínas possuem uma elevada afinidade por íons metálicos dos grupos IB e IIB da tabela periódica. Os íons metálicos dessas famílias se unem aos grupos de cisteína – SH das MTs.^{44,50}

A função biológica das MTs envolve detoxificação e a homeostase de metais; representando uma resposta específica de exposição aos metais como Cu, Zn, Cd e Hg.^{45,46}

Alem disso, a MT é uma proteína altamente conservada,^{56,57} e foram descritas primeiramente em espécies aquáticas, por Olafson e Thompson (1974) em peixes marinhos *Sebastes seboides* e posteriormente em outras espécies como a carpa, *Cyprinus carpio*⁴⁸ e truta, *Oncorhynchus mykiss*.^{17, 49} Os níveis da MT, ao serem induzidos por íons metálicos, podem variar segundo a espécie, tecido e condições experimentais.¹⁷

Muitos estudos vêm sendo feitos nos últimos anos acerca da utilização das dessas proteínas como biomarcadores específicos de contaminação por metais em vários organismos, principalmente em peixes ósseos.^{7,51,52,53}

A análise das MTs como biomarcadores específicos pode elucidar muitas questões sobre o efeito de metais em organismos, pois é uma proteína importante na detoxificação de metais estando presente tanto em vertebrados quanto em invertebrados.⁵⁵

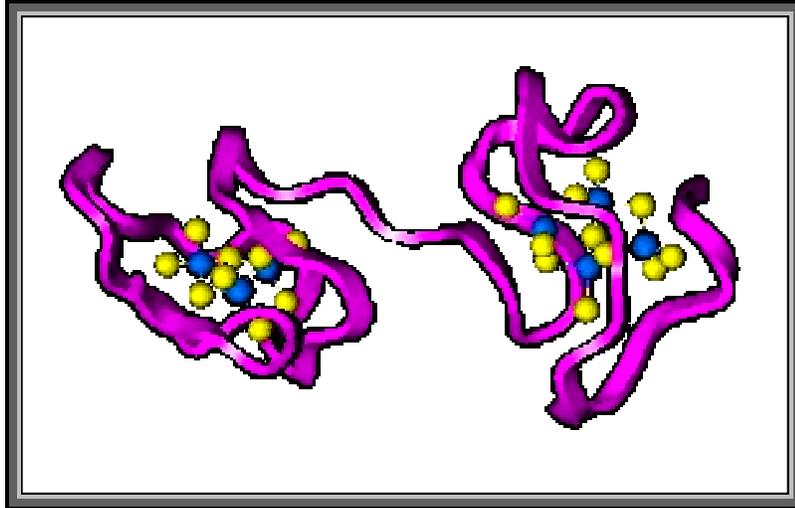


Figura 4: Estrutura da Metalotioneína animal. Os círculos representam as moléculas de cisteínas ligadas aos metais.

Fonte: Isart & Vasak, 2002

1.4.2. Acetilcolinesterase – AChE

A Acetilcolinesterase (AChE) – figura 5 - é uma enzima que atua na hidrólise da acetilcolina (um éster neurotransmissor, atuante nas sinapses nervosas) tendo como produtos deste processo o ácido acético e colina.^{11,58} Este processo evita a propagação contínua do impulso nervoso, que pode acarretar efeitos comportamentais como hiperatividade, asfixia e morte.⁵⁹

A AChE é sensível a exposição a organofosforados e carbamatos, sendo a dosagem da sua atividade frequentemente utilizada como biomarcador de efeito para a verificação dos efeitos primários da contaminação em diversos organismos, incluindo peixes, e na avaliação da qualidade das águas.^{11,60,61,62}

Assim sendo, o uso da AChE no tecido muscular e nervoso de peixes tem sido bastante utilizado, para avaliar os efeitos da contaminação marinha, pois esta enzima tem ampla disponibilidade e grande quantidade nestes tecidos.^{63,64} Porém a utilização destas enzimas em músculos é mais acessível em comparação ao tecido nervoso.⁶⁵ Além disso, esta enzima irá variar sua atividade não só de espécie para espécie mas também em diferentes locais (poluído ou não poluído) para uma mesma espécie de peixe.¹¹

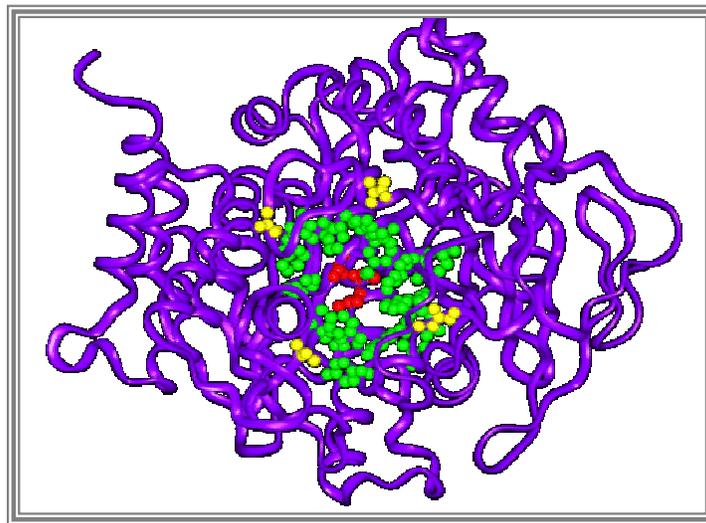


Figura 5: Estrutura da Acetilcolinesterase – AChE.

Fonte: Isart & Vasak, 2002

1.4.3. Índices Brutos

Os índices brutos, são parâmetros biológicos capazes de indicar interferências ocasionadas por diversos fatores ambientais a animais, além disso, podem fornecer informações sobre reservas de energia e a habilidade dos animais de tolerar estresses ambientais.⁵⁵ Dessa forma pode-se citar dois exemplos, o chamado fator de condição - FC - e o índice somático do fígado -

ISF - Estes índices são calculados através de relações efetuadas entre características individuais dos animais.⁶⁶

O FC é a relação entre o tamanho do animal e o seu peso. Este fator avalia a condição geral do organismo e a capacidade do animal tolerar agentes tóxicos ou outras interferências no ambiente que o afetem.⁶⁷ Além disso, pode ser afetado pela limitação de disponibilidade de alimento ou qualquer outro fator que interfira no ser vivo, capaz de fazer alguma alteração fisiológica ou morfológica.⁶⁸

O ISF é a relação entre o peso do fígado e o peso total do animal. Este parâmetro identifica as possíveis desordens do fígado ou condições que imponham um maior gasto energético ao organismo.⁶⁷ Existe uma hipótese de que animais expostos a poluentes químicos possuem um fígado maior em comparação com animais de localidades controle, com este aumento se dando tanto por aumento do tamanho das células hepáticas ou por aumento do número de células hepáticas.^{11,55}

Apesar destes parâmetros não serem muito sensíveis, eles podem servir como um auxílio aos biomarcadores como por exemplo. – MT e AchE - para indicar efeitos de contaminação. São gerais e não específicos, porém seu baixo custo, facilidade e rapidez ainda fazem destas análises uma ferramenta valiosa na avaliação de risco e do impacto ambiental.¹¹

1.5. Bioindicadores: Peixes

Bioindicadores são organismos que reagem a alterações ambientais com a modificação de suas funções vitais normais e/ou da sua composição química, refletindo o atual quadro ambiental.

⁶⁹ Os peixes são intensamente utilizados como bioindicadores em avaliações de contaminação ambiental, pois pertencem a um alto nível trófico. Segundo USEPA (2000), é importante levar

em consideração alguns fatores para a utilização de peixes como bioindicadores: (1) que populações e espécimes de peixes devam ser sedentárias e representativas na área estudada, (2) que as espécies de peixes devam acumular os poluentes sem perder a vida, abrangendo indivíduos muitos sensíveis aos mais tolerantes, (3) que representem comunidades persistentes pela rápida recuperação após a ocorrência de distúrbios naturais, (4) que devam ser de fácil amostragem e resistentes quanto à sobrevivência no laboratório, (5) que a comparação de resultados possa ser feita com a área controle em vários períodos de tempo, (6) que muitas espécies possuam vida longa (de 2 a 10 anos ou mais), podendo refletir a qualidade da água por longo tempo, (7) que por habitar continuamente os ambientes aquáticos, integrem a história química, física e biológica das águas, e (8) como a taxonomia dos peixes é bem estabelecida, faz com que biólogos especializados procedam à identificação em laboratório ou no campo. Mediante esses fatores, foram coletas duas espécies de peixes para o desenvolvimento deste estudo, onde serão descritas a seguir.⁶⁹

1.5.1. *Chilomycterus spinosus* – Baiacu-de-espinho

Os *Chilomycterus spinosus* são peixes ósseos pertencentes a família Diodontidae, onde a mesma possui 6 gêneros e 19 espécies, todos exclusivamente marinhos. Estes peixes habitam regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo conhecidos, no Brasil, popularmente como baiacu-de-espinho (figura 6) cuja a origem é indígena (Tupi guarani) significando baixo ou gordo com espinhos. Além disso, estes animais são facilmente reconhecidos por terem sua morfologia diferenciada, como a forma do corpo e presença de espinhos ósseos além de possuir a capacidade de inflar o ventre com ar ou água para defender-se ou assustar o inimigo e também por, em algumas espécies, possuir toxinas que podem provocar danos a saúde, até a morte.^{70,71}

Na costa brasileira existem aproximadamente 17 espécies de baiacus, como por exemplo o *Chilomycterus spinosus* (Linnaeus, 1758) que caracteriza-se por ser uma espécie bentônica, a qual vive em regiões de fundo, alcançando até um intervalo de profundidades de 190m. Podem atingir, em média, um tamanho entorno de 25cm. Apesar destes peixes não possuírem valor comercial direto, eles podem interferir diretamente com os grupos explorados comercialmente, como por exemplo, a competição por alimentos.^{71,72}

Além disso, sua utilização para avaliação da contaminação ambiental na BG é de extrema importância, não só por serem abundantes na região estudada, mas também por serem peixes bentônicos e estarem em constante contato com o substrato e dessa forma com inúmeras substâncias tóxicas que se sedimentam.^{71, 73, 74}



Figura 6: Espécie estudada: *Chilomycterus spinosus* – baiacu-de-espinho.

1.5.2. *Micropogonias furnieri* - Corvina

A *Micropogonias furnieri* (Demarest, 1823), figura 7, vulgarmente chamada de corvina é um peixe pertencente a família Scianídeos. Possuem corpo comprido, com coloração prateada, estrias amarelas nos flancos e pretas no dorso. Além disso, possui temperatura corpórea um grau acima da temperatura do meio, pois são peixes pecilotérmicos, ou seja, variam a temperatura corporal de acordo com a da água.^{74,75,77}

As corvinas variam seu comprimento total entre 19,0 a 61,0 cm. A maioria dos machos atingem a maturidade sexual por volta de 25,0 cm e as fêmeas de 27,5cm.⁷⁶ Assim sendo, pode-se considerar que os espécimes atingem a maturidade sexual por volta de 28 cm em ambos os sexos, garantindo que sejam considerados adultos. Abaixo destes parâmetros a visualização do sexo fica mais difícil.⁸⁰

Estas espécies podem ser encontradas em toda a faixa litorânea brasileira, nas regiões costeiras, vivendo em locais com fundo arenoso.^{80,83} sendo peixes bentófago que se alimenta no fundo do mar de organismos vivos ou mortos, basicamente moluscos, pequenos peixes, macro e micro crustáceos e poliquetas.⁸¹ Isso mostra a importância destes peixes serem bioindicadoras pois estão em constante contato com o fundo e assim em contato com substâncias que se sedimentam causando danos na biota e no ambiente.^{81,83}

Além disso, as corvinas apresentam três períodos de desova ao longo do ano, sendo não só uma espécie bastante consumida na alimentação humana, como também com um elevado valor comercial.^{81,83}



Figura 7: Espécie estudada: *Micropogonias furnieri* – Corvina

Fonte: www.fishbase.org.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da contaminação da Baía de Guanabara (BG) utilizando biomarcadores específicos - metalotioneína e acetilcolinesterase - e índices brutos - FC e ISF - em duas espécies de peixe: *Chilomycterus spinosus* – baiacu-de-espinho – e *Micropogonias furnieri* - corvina.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Analisar a atividade da AChE e os níveis de MT relacionando-os com parâmetros biológicos nos baiacus-de-espinho e nas corvinas.
- ✓ Analisar os índices brutos, ISF e FC, relacionando-os com os parâmetros biológicos nos baiacus-de-espinho e nas corvinas.
- ✓ Analisar o potencial do ISF e do FC como índices brutos para a avaliação dos efeitos da contaminação da BG nos baiacus-de-espinho e nas corvinas.
- ✓ Avaliar o potencial da atividade enzimática da AchE e dos níveis de MT como biomarcadores, da contaminação da Baía de Guanabara, nos baiacus-de-espinho e nas corvinas.
- ✓ Caracterizar os efeitos da contaminação da Baía de Guanabara utilizando os biomarcadores e os nos baiacus-de-espinho e nas corvinas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

- Fosfato de sódio.
- Acido 5,5' – ditiobis – 2 – nitrobenzoico (DTNB).
- Acetilcolina.
- Hidróxido de Sódio a 25%.
- TRIS- Hidroximetil aminometano.
- Cloreto de Hexamina cobalto.
- Sacarose.
- Cloreto de Amônia.
- Hidróxido de Amônia.
- Cloreto de sódio.
- Metalotioneína purificada de fígado de coelho.
- Ácidos nítrico, perclórico, sulfúrico.
- Demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Equipamentos e instrumentos

- Balança de precisão Sartorius e/ou balança analítica Mettler.
- Homonizador Ultra Turrax IKA T18.
- Centrífuga refrigerada Hitachi CR21E.
- Banho-Maria Chemipur.
- Polarógrafo Metrohm PGASTAT.

- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1601
- Vortex.
- Phmetro.
- Pipetas de volumes 5 ul a 5000 ul

3.3. Amostragem

As espécies de peixes obtidos para a realização deste estudo foram o *Chilomycterus spinosus* – baiacu-de-espinho – e a *Micropogonias furnieri* - corvina – coletadas tanto na BG quanto na PI.

Após as identificações dos espécimes, foram realizadas a quantificação da MT e a dosagem da atividade da AChE no Laboratório de Ecotoxicologia, do Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (ESNP), na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Na tabela seguinte, são mostradas os números de espécimes coletos nas duas áreas de estudo.

Tabela 1: Número de espécimes coletadas no total por localidade

Espécies	Baia de Guanabara	Praia de Itaipu
Baiacu	84	35
Corvina	98	30

3.3.1. Método de coleta na Baía de Guanabara

As coletas realizadas na BG ocorreram em parceria com o Laboratório de Biologia e Tecnologia Pesqueira da UFRJ. Os arrastos na BG foram feitos entre os períodos de junho de 2005 a dezembro de 2006. (Figura 8). O arrasto baseou-se na utilização de uma rede considerada padrão com malha de 20 mm e 16 mm no ensacador e ambas as portas pesando aproximadamente 20 kg. Foi estipulado um esforço de coleta de 30 minutos por arrasto sendo o início e fim da coleta marcados com o auxílio de um GPS e anotados seus respectivos horários.⁹⁹

Após as coletas, os peixes foram conservados em gelo a 4°C apenas pelo breve tempo do deslocamento do campo para o laboratório na UFRJ. Ao chegar no laboratório as amostras foram imediatamente identificados, medidos, pesados, tiveram sexo definidos e posteriormente retirados as amostras de músculo e fígado de baiacu e corvina. Em seguida, as amostras foram imediatamente congeladas a -20 ° C para as análises posteriores.

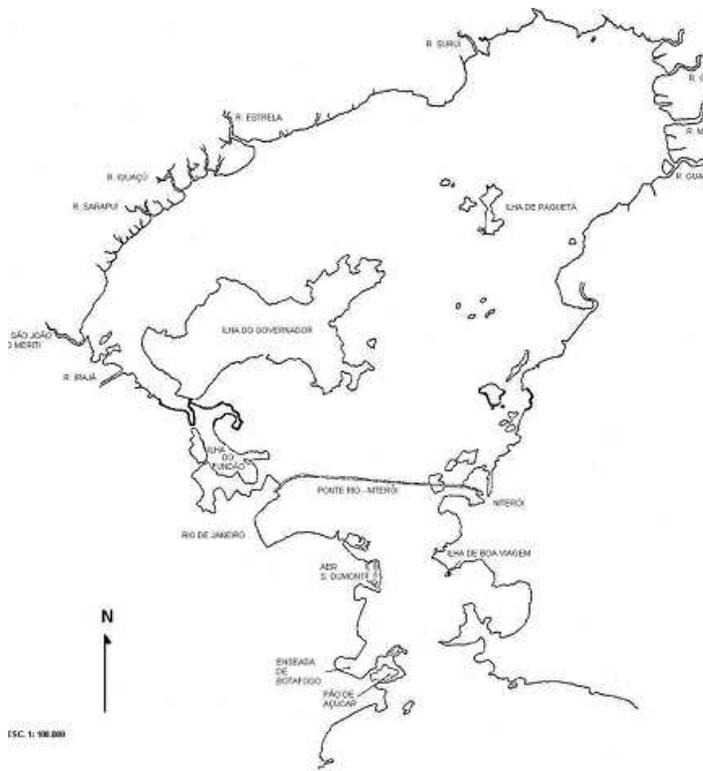


Figura 8: Mapa da Baía de Guanabara onde foram feitos os arrastos.

3.3.2. Método de coleta na Praia de Itaipu

As coletas das espécies foram realizadas no período de agosto a dezembro de 2006, feitas pelos pescadores da colônia Z-7 da PI onde o arrasto de praia baseava-se no lançamento da rede ao mar para a coleta dos peixes. Figura 9.

Uma vez coletados, os organismos eram transportados ao laboratório, onde foram imediatamente identificados, medidos, pesados, feito a sexagem e posteriormente retirado as amostras de músculo e fígado do baiacu-de-espinho e da corvina. Em seguida, as amostras foram imediatamente congeladas a -20°C para as análises posteriores



Figura 9: Arrasto de praia, realizada, pelos pescadores da colônia Z-7 na PI

3.4. Determinação da MT por voltametria

A metodologia utilizada para estas análises é realizada eletroquimicamente onde a quantificação da MT se dá por Voltametria de Pulso Diferencial (*Diferencial Pulse Voltametric - DPV*) utilizando um eletrodo de gota pendente de mercúrio (*Hanging Mercury Drop Electrode - HMDE*) (fig 10), a 4°C, por meio da reação de Brdi□ka.



Figura 10: Polarógrafo Metrohm PGASTAT

Para as análises, as amostras de fígados foram preparadas adicionando 3 vezes o volume de seu peso em solução tampão TRIS-Sacarose 0,02M e 0,5M respectivamente / pH 8,6 para serem homogenizadas. Este homogenizado foi centrifugado por 20min, 30.000g a 4°C. Retirou-se, então, 100□L do sobrenadante para diluir em 900□L de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%. A solução foi aquecida a 70°C por 10min e novamente centrifugada nas mesmas condições.

Finda esta etapa, as amostras estão prontas para leitura a ser realizada no polarógrafo em modo *scan* utilizando uma faixa de potencial de -0,9 a -1,7V; amplitude do pulso de voltagem a 0,025V; taxa de scan de 0,005 V.s⁻¹ com tempo de 0,5s; tempo de purga 10s; tempo de deposição 1s e tempo de equilíbrio 10s.

No momento da quantificação, em uma cuba com 10mL de solução contendo Cloreto de Hexaminocobalto 0,6mM / pH 9,5; Cloreto de Amônia 1M e Hidróxido de Amônia 1M, adicionou-se 10µL de amostra, tudo mantido a 4°C. A reação ocorrida no momento da determinação voltamétrica (Brdicka) se baseia dos grupamentos sulfidril (SH) das MTs, mediante ligação do enxofre (S) com o cobalto (Co), liberando prótons (H⁺). A liberação de H⁺ é representada pelo terceiro pico (Cat), que ocorre entre -1,45 e -1,48V, sendo este pico correspondente a presença de MTs. Figura 11.⁸⁴

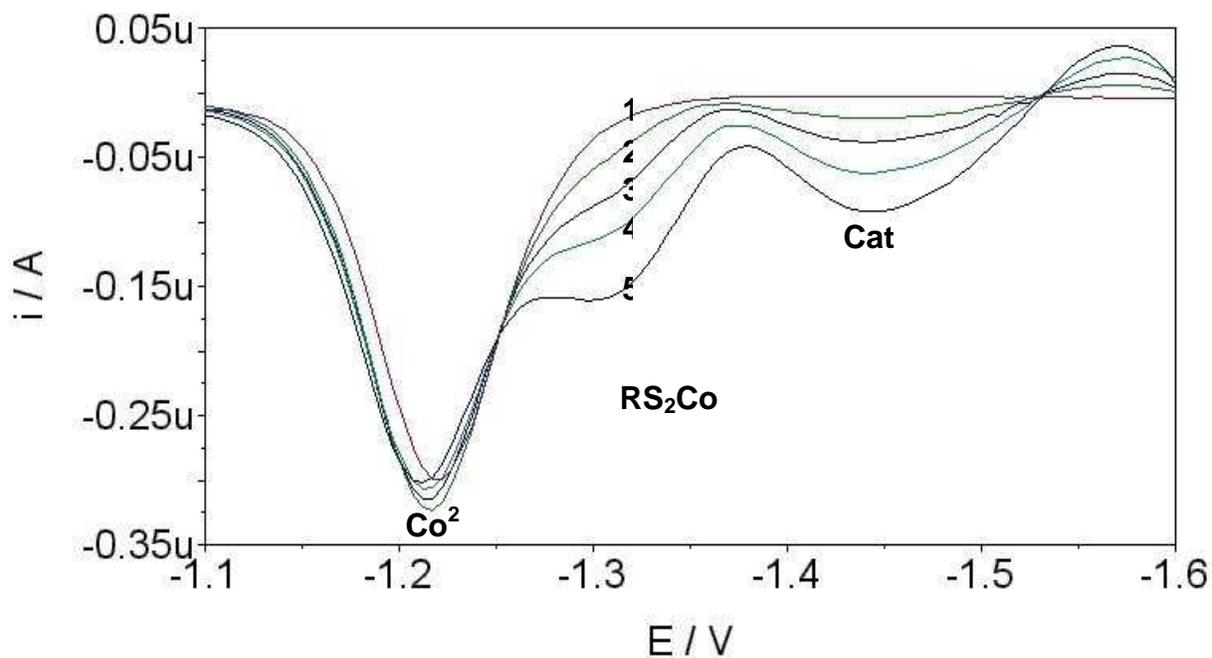


Figura 11: Voltamogramas da curva-padrão de MT purificada realizada com as seguintes concentrações entre 0,01 µg.mL⁻¹ a 0,25 µg.mL⁻¹. (i/A) - corrente, em amperes; (E/V) - potencial, em volts. Da esquerda para a direita, o primeiro pico representa a redução do cobalto (Co²⁺), o seguinte representa a redução do complexo enxofre-cobalto (RS₂Co) e o último representa a evolução catalítica do hidrogênio (Cat).

3.5. Curva de Concentração de Substrato (Acetilcolina- ASCh)

Foram realizadas curvas de concentração de substrato para averiguar o quantitativo mais adequado à análise da atividade da AChE. Para a confecção destas, foi elaborado um pool contendo 10 amostras de músculo de cada espécie, buscando-se reproduzir as condições de aplicação para todos os espécimes.

3.5.1. Curva de Concentração de Substrato para o baiacu-de-espinho.

Os pontos de concentração de ASCh utilizadas para a confecção da curva do baiacu-de-espinho foram: 0,5mM; 10mM; 15mM; 20mM; 30mM; 35mM; 40mM, onde foram utilizados 4ml de tampão fosfato de sódio (0,12mM, Ph: 7,6), 1ml de DTNB, 1ml de ASCh e 15 ul de amostra de pool.

3.5.2. Curva Concentração de Substrato para as corvinas.

Os pontos de concentração de ASCh utilizadas para a confecção da curva da corvina foram: 0,1mM; 0,25mM; 0,5mM; 1mM; 1,5mM; 3mM; 10mM, 20mM, 30mM onde foram utilizados 2ml de tampão fosfato de sódio (0,12mM, Ph: 7,6), 500ul de DTNB, 500ul de ASCh e 25 ul de amostra de pool.

O resultado das curvas de substrato que demonstraram melhor performance para a determinação enzimática foram os seguintes: baiacu-de-espinho: 35 mM e da corvina: 3mM. Estes resultados apontam também a essencialidade da utilização da quantidade de ASCh adequada para uma leitura mais precisa da atividade de AChE.

3.6. Análise da atividade enzimática da acetilcolinesterase

O procedimento de análise das atividades de AChE seguiram o método descrito por Oliveira- Silva *et al.* (2000), com modificações. As mesmas são quantificadas com base na reação descrita por Ellman (1961), que consiste na reação do DTNB com os grupamentos SH da molécula AChE, resultando na coloração, sendo esta reação responsável pela variação dos valores de absorvâncias (ou da densidade óptica).

As amostras de músculo foram pesadas e homogeneizadas com uma solução tampão de fosfato de sódio 0,12M, pH 7,6 em proporção 6:1 com relação ao peso das porções retiradas. As amostras foram centrifugadas a 9000G por 20 minutos a 8°C. Durante a centrifugação, foram preparados tubos de ensaio tanto para amostras de músculo do baiacu-de-espinho quanto para as corvinas. Assim sendo, os tubos para análises das amostras de músculos de baiacu-de-espinho continha 4 ml de solução tampão; 1000µl de DNTB 2mM e para a leitura, são adicionados a estes tubos de ensaio 1000 µl de substrato acetiltiocolina 35mM e 15 µl do homogenizado. Já para as amostras de músculo de corvina os tubos eram preparados com 2 ml de solução tampão; 500µl de DNTB 2mM e para a leitura, são adicionados a estes tubos de ensaio 500 µl de substrato acetilcolina 3mM e 25 µl do homogenizado.

As atividades enzimáticas foram determinadas em espectrofotômetro (Figura 12) no modo cinético em $\lambda = 412$ nm, sendo obtida ao final de dois minutos de reação, a absorvância por minuto. Os valores de absorvância foram convertidos em atividade enzimática, expressos em $\mu\text{moles}/\text{min}.\text{mL}^{-1}$, através de cálculo de regressão linear utilizando uma curva padrão de L-cisteína, com concentrações de 0µmoles, 10µmoles, 25µmoles, 50µmoles, 100µmoles,

150 μ moles, 250 μ moles e 500 μ moles. Figura 13. As atividades de AchE foram correlacionadas com concentração de proteína do músculo.



Figura 12: Espectrofotômetro Shimadzu UV-1601

A determinação da concentração de proteína das amostras de músculo, foram diluídas de 1:10 em solução tampão fosfato de sódio 0,12M pH 7,6. Aos tubos de ensaio relativos as amostras, foram adicionados 4,3ml de H₂O destilada, 200 μ l de NaOH a 25% e 200 μ l de amostra diluída a 10%. Em seguida, foi adicionado 300 μ l de Folin, em cada tubo, levando-os posteriormente ao vortex por 30 seg. Transcorrido um período de 5 min a partir do primeiro tubo, foi iniciada a leitura da absorvância em espectrofotômetro $\lambda=660$ nm. As absorvâncias obtidas foram convertidas em concentração de proteína em mg/ml utilizando-se uma curva padrão de albumina. Os valores de atividade de AchE foram divididos pela concentração de proteína, sendo obtida a atividade específica da enzima expressa em μ moles.min⁻¹.mg⁻¹ de ptn. ⁸⁵

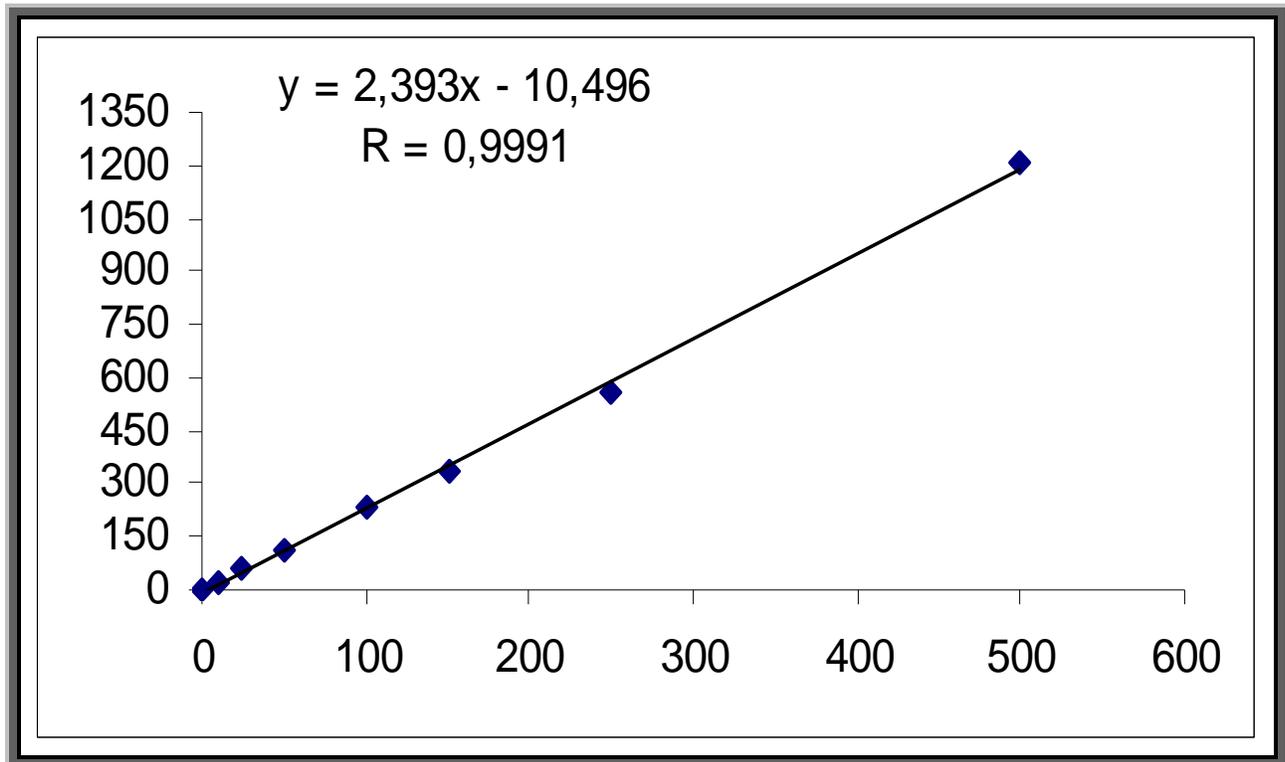


Figura 13: Curva analítica para L-cisteína obtida com as seguintes concentrações de 0μmoles, 10μmoles, 25μmoles, 50μmoles, 100μmoles, 150μmoles, 250μmoles e 500μmoles

3.6.1. Curva de Inibição da AChE.

Foram realizadas curvas de inibição, tanto para as amostras de músculo dos baiacus-de-espinho quanto para as corvinas, para verificar o grau de inibição da AChE mediante a presença de um organofosforado – Paraoxon -. Para a confecção das curvas foi utilizado o paraoxon a 10mM, onde os pontos de concentração do anticolinesterásico utilizado nas duas espécies foram 0 ng/ml; 0,2 ng/ml; 0,5 ng/ml; 1 ng/ml; 2 ng/ml; 2,5 ng/ml; 4 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml; 20 ng/ml; 30 ng/ml; 50 ng/ml.

As curvas obtidas podem ser visualizadas nas figuras 14 e 15 para o baiacu-de-espinho e a corvina respectivamente, onde pode-se verificar que a inibição da enzima foi aumentando

gradativamente conforme a concentração do organosfosforado aumentava, chegando a uma faixa de estabilidade. Isso mostra que o inseticida tem um potencial significativo de inibir a AChE.

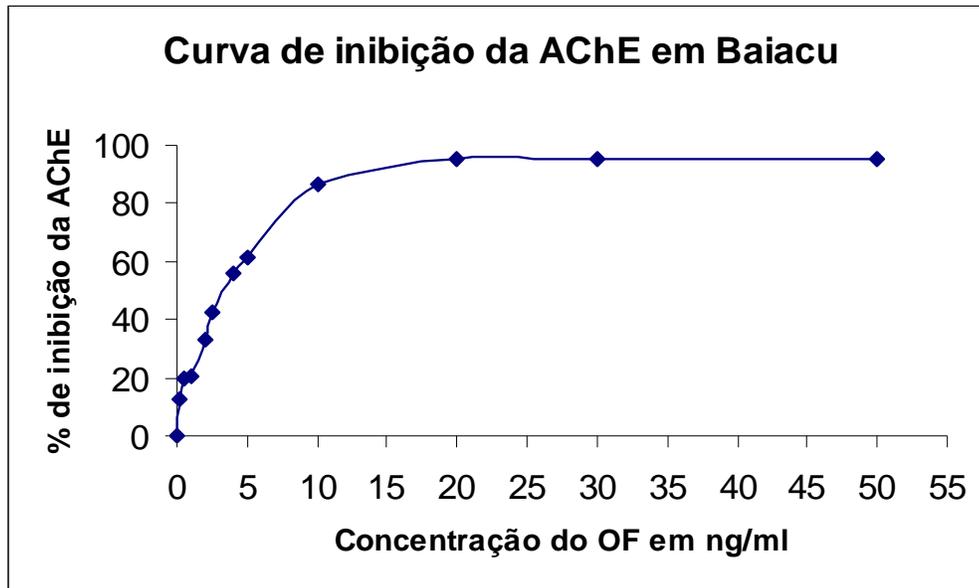


Figura 14: Curva de inibição da acetilcolinesterase por Paraoxon em baiacu-de-espinho

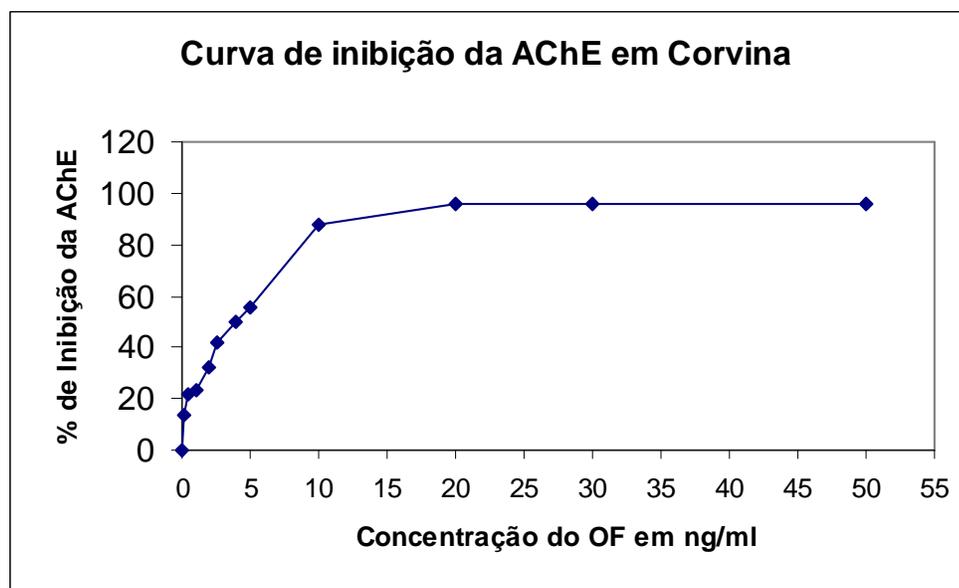


Figura 15: Curva de inibição da acaetilcolinesterase por Paraoxon em corvina.

3.7. Fator de Condição (FC)

O FC foi avaliado segundo Bagenal & Tesch (1978 *apud*. Deviller *et al.*, 2005) utilizando a seguinte fórmula:

$$FC = \left(\frac{Peso_{Peixe}}{(Comprimento_{Peixe})^3} \right) \times 100$$

O peso do peixe foi utilizado em gramas (g) e o comprimento do mesmo foi utilizado em centímetros (cm).

3.8. Índice Somático do Fígado (ISF)

O ISF foi alcançado baseando-se na fórmula descrita por Sloff *et al.* (1983 *apud*. Deviller *et al.*, 2005). A equação utilizada foi a seguinte:

$$ISF = \left(\frac{Peso_{Fígado}}{Peso_{Peixe}} \right) \times 100$$

Tanto o peso do fígado quanto o peso do peixe foram utilizados em gramas (g)

3.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados obtidos foram elaboradas no programa SPSS 6.0 e Statistics. Foram feitas correlações e posteriormente realizados teste-t e Anova para análises específicas.

4. RESULTADOS

As duas espécies de peixes alvo deste estudo foram *Chilomycterus spinosus*, baiacu-de-espinho e a *Micropogonias furnieri* - corvina, coletados na região da BG e na PI que foi considerada como região controle já que esta área é menos poluída.

4.1. Parâmetros biológicos.

4.1.1. Parâmetros biológicos dos baiacus-de-espinho.

Na tabela 2 são descritos os valores das médias, do erro padrão e os valores máximo e mínimo de cada parâmetro biológico que abrange peso, comprimento, ISF e FC dos baiacus-de-espinho coletados nas duas localidades.

A média dos pesos dos baiacus-de-espinho foram maiores na PI (206,97 g) que na BG (141,25 g), ocorrendo esta mesma relação com o comprimento, onde são maiores na PI (13,85 cm) e menores na BG (12,25 cm). Aplicando o teste-t, observa-se que estas médias do peso e do comprimento foram diferentes significativamente de uma região para outra com $p < 0,05$.

Como existem poucos trabalhos relacionados aos baiacus-de-espinho, não foi possível identificar em que tamanho estas espécies amadurecem, ou seja, a partir de que comprimento poderíamos separá-los em jovens e adultos. Assim sendo, como no nosso estudo todos os espécimes coletados nas duas localidades possuem comprimentos próximos, BG (12,259 cm) e em PI (13,857 cm), não tendo diferença significativa, $p > 0,05$, estas espécies não foram separados em jovens e adultos, diferindo das corvinas.

Em relação ao ISF do baiacu-de-espinho, a tabela 2 também mostra que as médias foram maiores na PI (7,20) que na BG (6,66). Observa-se da mesma forma que a média do FC é maior

na PI (5,92) quando comparado a BG (5,14). Através da aplicação do teste-t constatou-se diferença significativa, com $p < 0,05$, de uma região para a outra nas médias do FC e do ISF.

Tabela 2: Dados gerais dos parâmetros biológicos dos *Chilomycterus spinosus* – baiacu de espinho. Peso, (CT) comprimento total, (ISF) índice somático do fígado, (FC) fator de condição. Valores expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo e N: numero de espécimes analisados

Espécies	Localidade		Peso (g)	CT (cm)	ISF*	FC
<i>Chilomycterus spinosus</i> Baiacu-de-espinho	Baia de Guanabara N = 84	Media	141,25 ^a	12,25 ^a	6,66 ^a	5,14 ^a
		Erro padrão ±	8,672	0,320	0,366	0,146
		Valor máximo	398,00	23,10	12,03	8,94
		Valor mínimo	24,05	7,50	0,05	0,06
	Praia de Itaipu N = 35		Peso (g)	CT (cm)	ISF	FC
		Media	206,97 ^a	13,85 ^a	7,20 ^a	5,92 ^a
		Erro padrão ±	19,955	0,728	0,888	0,116
		Valor máximo	424,30	27,00	21,80	9,21
	Valor mínimo	46,90	9,00	0,080	3,60	

^a Valores diferente significativamente segundo o teste t, $p < 0,05$

* N analisado: 48

4.1.2 Parâmetros biológicos das corvinas.

Na tabela 3 são descritos os valores das médias, do erro padrão e os valores máximos e mínimos de cada parâmetro biológico das corvinas coletadas na BG e na PI.

Esta tabela mostra que tanto o peso quanto o comprimento dos espécimes são maiores significativamente, $p < 0,005$, na PI (277,50 g) e (30,45 cm) respectivamente, que a região da BG (29,42 g) e (14,21 cm) respectivamente.

Em relação aos outros parâmetros biológicos mencionados na tabela observa-se que a média tanto do ISF (1,089) quanto do FC (1,08) na região da PI são maiores que na BG (0,53) e (0,92) respectivamente. Através da aplicação do teste-t mostra que houve uma diferença significativa entre as regiões com $p < 0,05$.

Tabela 3: Dados gerais dos parâmetros biológicos dos *Micropogonias furnieri* - Corvina. Peso, (CT) comprimento total, (ISF) índice somático do fígado, (FC) fator de condição. Valores expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo e N: numero de espécimes analisados

Espécies	Localidade		Peso (g)	CT (cm)	ISF*	FC
<i>Micropogonias furnieri</i> Corvina.	Baia de Guanabara N = 98	Media	29,42 ^a	14,21 ^a	0,53 ^a	0,92 ^a
		Erro padrão ±	2,042	0,348	0,058	0,009
		Valor máximo	112,60	31,00	1,84	1,40
		Valor mínimo	2,90	6,70	0,50	0,70
	Praia de Itaipu N = 30		Peso (g)	CT (cm)	ISF	FC
		Media	277,50 ^a	30,45 ^a	1,089 ^a	1,084 ^a
		Erro padrão ±	26,199	0,912	0,096	0,033
		Valor máximo	479,70	39,00	2,20	1,40
		Valor mínimo	136,30	22,50	0,04	0,76

^a Valores diferente significativamente segundo o teste t, $p < 0,05$

* N analisado: 47

Vale ressaltar que houve uma grande diferença entre os comprimentos desta espécie coletadas na BG das coletadas na PI. Assim sendo, na região de Itaipu, como os espécimes eram significativamente maiores, foram divididas também em jovem e adultos, ou seja, os jovens são caracterizados por serem menores que 28 centímetros e os adultos por serem maiores ⁷⁵,

observando que não há diferença estatisticamente significativa entre eles. Essa relação pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4: Dados dos comprimentos das corvinas jovens e adultas coletadas na Praia de Itaipu.

Espécies	Localidade			ISF	FC	MT	AChE
<i>Micropogonias furnieri</i> Corvina	Praia de Itaipu	CT < 28 cm	Média	0,95 ^a	1,10 ^a	0,41 ^a	1,40 ^a
			Erro padrão	0,056	0,023	0,012	0,023
		CT > 28 cm	Média	1,50 ^a	1,11 ^a	0,38 ^a	1,30 ^a
			Erro padrão	0,065	0,056	0,012	0,423

^a Valores estatisticamente iguais segundo o teste t, $p > 0,05$

4.2. Influência do sexo nos parâmetros biológicos e nos biomarcadores nas duas espécies coletadas na BG e na PI.

As duas espécies em estudo foram separadas por sexo, onde foram observadas macroscopicamente suas gônadas, sendo que algumas não foi possível identificar por estarem ainda no período de maturação. Dessa forma, as tabelas que se seguem mostram a quantidade de espécimes de baiacu-de-espinho e corvinas, identificadas e não identificadas, que foram coletadas na BG e na PI com suas respectivas médias dos parâmetros biológicos.

4.2.1. Índice somático do fígado - ISF - nos baiacus-de-espinho e nas corvinas.

Na tabela 5 são mostrados os valores referentes às médias, erro padrão e valores máximos e mínimos do ISF dos baiacus-de-espinho e das corvinas coletadas nas duas áreas em estudo. Além disso, estão descritos também o número de espécimes coletados para cada sexo observado.

Observa-se que a média do ISF dos baiacus fêmeas são maiores (6,9) que dos machos (6,59) coletados na BG, o mesmo ocorre na região de Itaipu, onde as fêmeas tem um ISF maior (9,19) que dos machos (9,16 g).

Já em relação as médias do ISF das corvinas fêmeas são menores (0,3) que dos machos (0,6 g) na região da BG. O mesmo não ocorre na PI, onde as fêmeas possuem uma média maior (1,22 g) que dos machos (0,95).

Apesar desta diferença existir, ao aplicar o teste Anova, não houve diferença significativa, $p > 0,05$, entre as médias do ISF dos sexos identificados e não identificados, de ambas as espécies, nas regiões.

Tabela 5: Dados gerais do índice somático do fígado (ISF) dos *Chilomycterus spinosus* – Baiacu de espinho – e das *Micropogonias furnieri* - Corvina, separados por macho (M); fêmea (F); e não identificados (NI). Os valores estão expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo de cada parâmetro avaliado. N: numero de espécimes analisados

ISF							
		<i>Chilomycterus spinosus</i> Baiacu de espinho			<i>Micropogonias furnieri</i> Corvina		
Localidade		M	F	NI	M	F	NI
Baia de Guanabara	N	17	27	4	10	10	27
	Média	^a 6,59	^a 6,9	^a 4,8	^a 0,6	^a 0,3	^a 0,5
	Erro padrão ±	0,66	0,4	1,5	0,01	0,09	0,07
	Valor máximo	9,55	12,	8,4	1,49	1,02	1,84
	Valor mínimo	0,05	3,0	1,4	0,18	0,05	0,17
	Praia de Itaipu	N	8	16	11	15	15
Media		^a 9,16	^a 9,19	^a 3,0	^a 0,95	^a 1,22	-
Erro padrão ±		2,26	1,2	0,3	0,13	0,13	-
Valor máximo		21,8	17,1	4,5	2,10	2,20	-
Valor mínimo		2,39	0,78	0,0	0,00	0,56	-

^aValores estatisticamente iguais na mesma região segundo o teste Sheffer – anova $p > 0,05$

4.2.2. Fator de condição - FC - no baiacu-de-espinho e na corvina separados por sexo

Na tabela 6 estão descritos valores referentes as médias, erro padrão e valores máximos e mínimo do FC dos baiacus-de-espinho e das corvinas coletadas nas duas áreas em estudo. Além disso, também podem ser observados para cada sexo, o número de espécimes coletado.

A média do FC dos baiacus fêmeas são menores (4,4) que as do macho (5,6) na BG, não ocorrendo o mesmo na PI, onde as fêmeas tem uma média maior (5,9) que as do macho (5,7). Em relação as médias do FC das corvinas fêmeas destaca-se uma média maior (0,92) que as dos machos (0,90) na BG, ocorrendo o mesmo para a região de Itaipu (1,10) e (1,06) respectivamente.

Ao aplicar o teste anova, observa-se que estas diferenças entre as médias do FC dos sexos identificados e não identificados, em ambas as espécies, na BG e na PI, não são diferenças significativas com $p > 0,05$.

Tabela 6: Dados gerais do fator de condição (FC) dos *Chilomycterus spinosus* – Baiacu de espinho – e das *Micropogonias furnieri* - Corvina, separados por macho (M); fêmea (F); e não identificados (NI). Os valores estão expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo de cada parâmetro avaliado. N: numero de espécimes analisados

FC							
		<i>Chilomycterus spinosus</i> Baiacu de espinho			<i>Micropogonias furnieri</i> Corvina		
Localidade		M	F	NI	M	F	NI
Baia de Guanabara	N	30	40	14	10	10	78
	Média	^a 5,6	^a 4,4	^a 6,2	^a 0,90	^a 0,92	^a 0,9
	Erro padrão ±	0,2	0,2	0,2	0,07	0,02	0,08
	Valor máximo	7,9	8,9	7,7	1,40	1,10	1,10
	Valor mínimo	1,0	1,0	4,1	0,70	0,87	0,70
Praia de Itaipu	N	8	16	11	15	15	0
	Media	^a 5,7	^a 5,9	^a 5,6	^a 1,06	^a 1,10	-
	Erro padrão ±	0,5	0,1	0,2	0,05	0,03	-
	Valor máximo	9,2	5,7	7,1	1,40	1,32	-
	Valor mínimo	4,1	3,6	4,4	0,76	0,80	-

^aValores estatisticamente iguais na mesma região segundo o teste Sheffer – anova $p > 0,05$

4.2.3. Influência do sexo na atividade colinesterásica – AchE - dos baiacus-de-espinho e das corvinas.

Na tabela 7 estão descritos valores referentes as médias, erro padrão e valores máximos e mínimo da atividade AchE dos baiacus-de-espinho e das corvinas coletadas nas duas áreas em estudo. Além disso, também podem ser observados para cada sexo, o número de espécimes coletados.

A média da atividade colinesterásica dos baiacus fêmeas são maiores ($1,29 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$) que as do macho ($1,13 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$) na região da BG, ocorrendo o mesmo na região da PI, onde a fêmea possui uma atividade maior ($1,39 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$) que os machos ($1,30 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$).

Em relação as corvinas observa-se que as médias da atividade colinesterásica das fêmeas são maiores ($1,34 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$) que as dos machos ($1,09 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$) na região da BG, ocorrendo o mesmo com a PI, onde as fêmeas possuem uma média maior ($1,37 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$) que os machos ($1,16 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$).

Ao aplicar o teste anova, observa-se que não houve diferença significativa entre as médias de AchE nos machos, fêmeas e não identificados na região da BG. O mesmo ocorre na PI, com $p > 0,05$

Tabela 7: Dados gerais das análises de Acetilcolinesterase (AChE) obtidas nos *Chilomycterus spinosus* – Baiacu de espinho – e nas *Micropogonias furnieri* - Corvina, separados por macho (M); fêmea (F); e não identificados (NI). Os valores estão expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo de cada parâmetro avaliado.

AChE							
		<i>Chilomycterus spinosus</i> Baiacu de espinho			<i>Micropogonias furnieri</i> Corvina		
Localidade		M	F	NI	M	F	NI
Baia de Guanabara	N	38	13	30	10	10	76
	Média	^a 1,13	^a 1,29	^a 1,15	^a 1,09	^a 1,34	^a 0,74
	Erro padrão ±	0,05	0,18	0,07	0,31	0,29	0,52
	Valor máximo	1,74	3,24	2,04	3,23	2,72	2,57
	Valor mínimo	0,54	0,64	0,64	0,37	0,10	0,17
Praia de Itaipu	N	8	16	8	15	15	0
	Media	^a 1,30	^a 1,39	^a 1,86	^a 1,16	^a 1,37	-
	Erro padrão ±	0,184	0,13	0,3	0,09	0,09	-
	Valor máximo	2,02	2,62	3,15	1,79	2,00	-
	Valor mínimo	0,58	0,81	1,04	0,65	0,79	-

^a Valores estatisticamente iguais na mesma região segundo o teste Sheffer – anova $p > 0,05$

4.2.4 Influência do sexo na Metalotioneína – MT - dos baiacus-de-espinho e das corvinas.

Na tabela 8 estão descritos valores referentes às médias, erro padrão e valores máximo e mínimo dos níveis de MT dos baiacus-de-espinho e das corvinas coletadas nas duas áreas em estudo. Além disso, também podem ser observados para cada sexo, o número de espécimes coletado

A média dos níveis de MT dos baiacus-de-espinho são maiores nas fêmeas (2,41 mg / g de fígado) que nos machos (2,27 mg / g de fígado) coletados na BG, o mesmo ocorre na PI, onde as fêmeas possuem níveis maiores (1,38 mg / g de fígado) que os machos (0,98 mg / g de fígado).

Já as corvinas fêmeas possuem níveis de MT menores (0,90 mg / g de fígado) que os níveis de MT dos machos (1,29 mg / g de fígado) coletados na região da BG, ocorrendo o mesmo na PI, onde as fêmeas têm níveis menores (0,38 mg / g de fígado) que os machos (0,41 mg / g de fígado)

Ao aplicar o teste anova, observa-se que não houve diferença significativa entre as médias de MT dos machos, fêmeas e não identificados na região da BG. O mesmo ocorre na PI com $p > 0,05$

Tabela 8: Dados gerais das análises de Metalotioneína (MT) obtidos nos *Chilomycterus spinosus* – Baiacu de espinho – e nas *Micropogonias furnieri* - Corvina, separados por macho (M); fêmea (F); e não identificados (NI). Os valores estão expressos em média, erro padrão (máximo-mínimo), valores máximo e mínimo de cada parâmetro avaliado.

MT							
		<i>Chilomycterus spinosus</i> Baiacu de espinho			<i>Micropogonias furnieri</i> Corvina		
Localidade		M	F	NI	M	F	NI
Baia de Guanabara	N	35	13	26	8	10	26
	Média	^a 2,27	^a 2,41	^a 2,40	^a 1,29	^a 0,90	^a 1,0
	Erro padrão ±	0,12	0,24	0,11	0,27	0,92	0,08
	Valor máximo	3,88	3,87	3,88	2,70	1,59	2,19
	Valor mínimo	1,47	1,63	1,47	0,37	0,53	0,18
Praia de Itaipu	N	8	16	11	15	15	0
	Media	^a 0,98	^a 1,38	^a 0,91	^a 0,41	^a 0,38	-
	Erro padrão ±	0,150	0,13	0,12	0,03	0,024	-
	Valor máximo	1,56	2,50	1,60	0,63	0,57	-
	Valor mínimo	0,19	0,49	0,48	0,24	0,17	-

^a Valores estatisticamente iguais na mesma região segundo o teste Sheffer – anova $p > 0,05$

4.3. Análise dos parâmetros biológicos das espécies coletadas na BG e na PI

4.3.1 Análise do ISF e do FC dos baiacus-de-espinho e das corvinas coletados na BG e na PI.

Os valores relativos ao ISF dos baiacus-de-espinho e das corvinas são mostrados nas figuras 16 e 17 respectivamente, onde ambas as espécies foram coletadas na BG e na PI cuja região é considerada menos afetada por substâncias nocivas ao ecossistema e ao meio ambiente.

Observa-se que na figura 17 a média do ISF dos baiacus são maiores que na região da PI (7,204) que na região da BG (6,668). Ao aplicar o teste-t observa-se que esta diferença entre as médias é significativa de uma região para a outra. $p < 0,005$

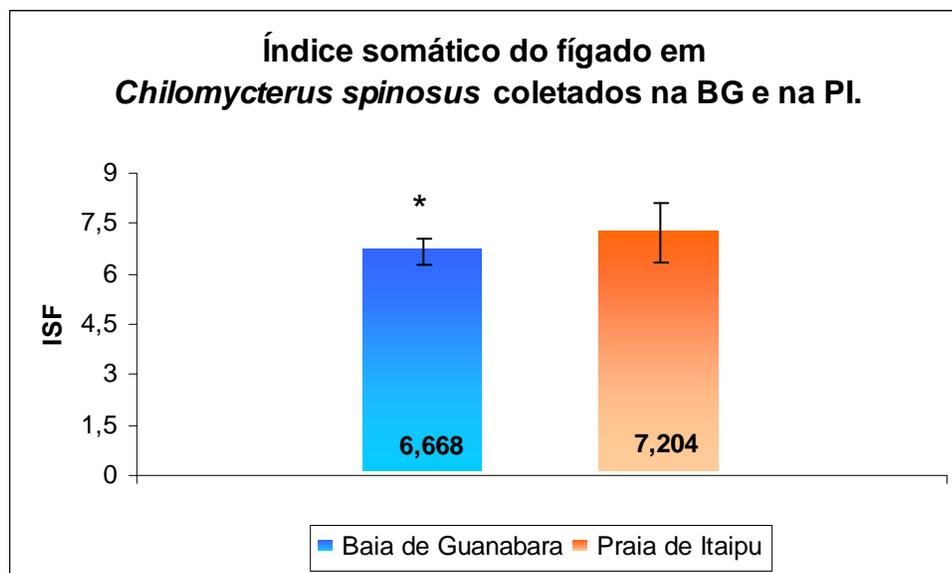


Figura 16: Valores relativos ao ISF dos baiacus-de-espinho coletados na BG e na PI.

* Valores estatisticamente diferentes de uma região para a outra segundo o teste teste-t $p < 0,05$

Já na figura 17 pode-se observar que a média do ISF das corvinas na região de Itaipu é maior (1,089) que na região da BG (0,536). Ao aplicar o teste-t observa-se que esta diferença entre as médias é significativa de uma região para a outra. $p < 0,005$

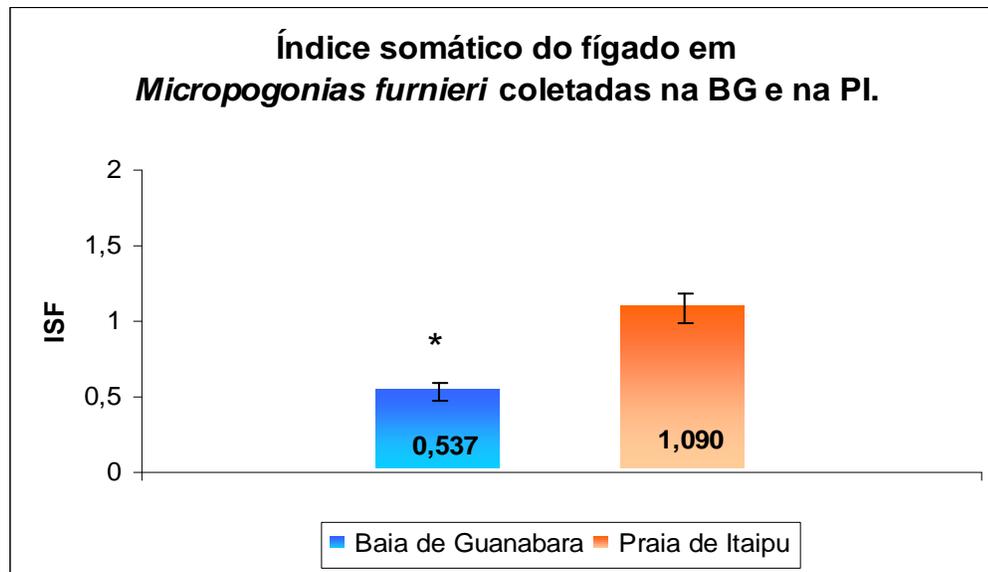


Figura 17: Valores relativos ao ISF da corvina coletadas na BG e na PI

* Valores estatisticamente diferentes de uma região para a outra segundo o teste teste-t $p < 0,05$

Na figura 18 são mostradas as médias do FC dos baiacus-de-espinho coletados nas áreas em estudo. Observa-se que a media do FC na PI (5,926) é maior que na BG (5,144). Ao aplicar o teste-t observa-se que esta diferença entre as médias é significativa de uma região para a outra. $p < 0,005$

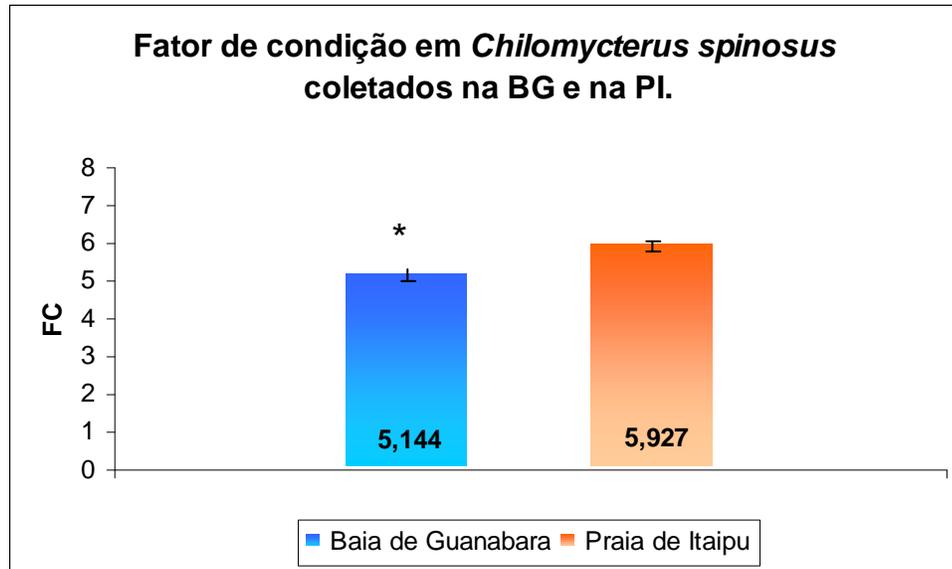


Figura 18: Valores relativos ao FC dos baiacus-de-espinho coletados na BG e na PI.

* Valores estatisticamente diferentes de uma região para a outra segundo o teste teste-t $p < 0,05$

Na figura 19 as médias do FC das corvinas coletadas na PI (1,084) são maiores que na BG (0,927). O teste-t mostra que esta diferença entre as médias é significativa de uma região para a outra. $p < 0,005$.

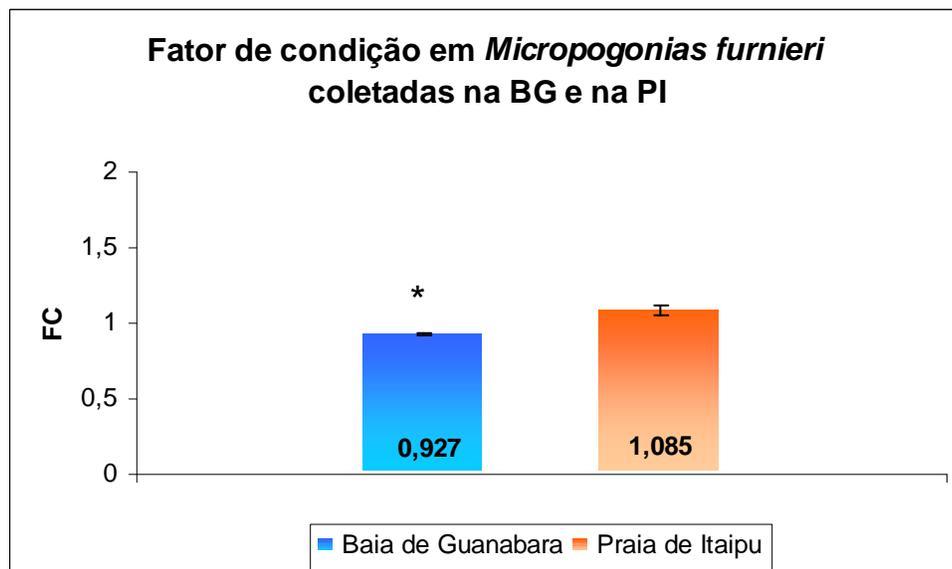


Figura 19: Valores relativos ao FC das corvinas coletadas na BG e na PI

* Valores estatisticamente diferentes de uma região para a outra segundo o teste teste-t $p < 0,05$

4.4. Análise dos biomarcadores nas espécies coletadas na BG e na PI

4.4.1. Níveis de MT nos baiacus-de-espinhoe nas corvinas coletados na BG e na PI.

Na figura 20 podem ser observados os resultados obtidos da quantificação da MT no fígado dos baiacus-de-espinho coletados nas regiões em estudo, ressaltando níveis distintos desta proteína. Estes níveis são maiores na BG (2,34 mg / g de fígado) do que a PI (1,15 mg / g de fígado). Ao aplicar o teste-t observa-se que esta diferença entre as médias é significativa de uma região para a outra. $p < 0,005$

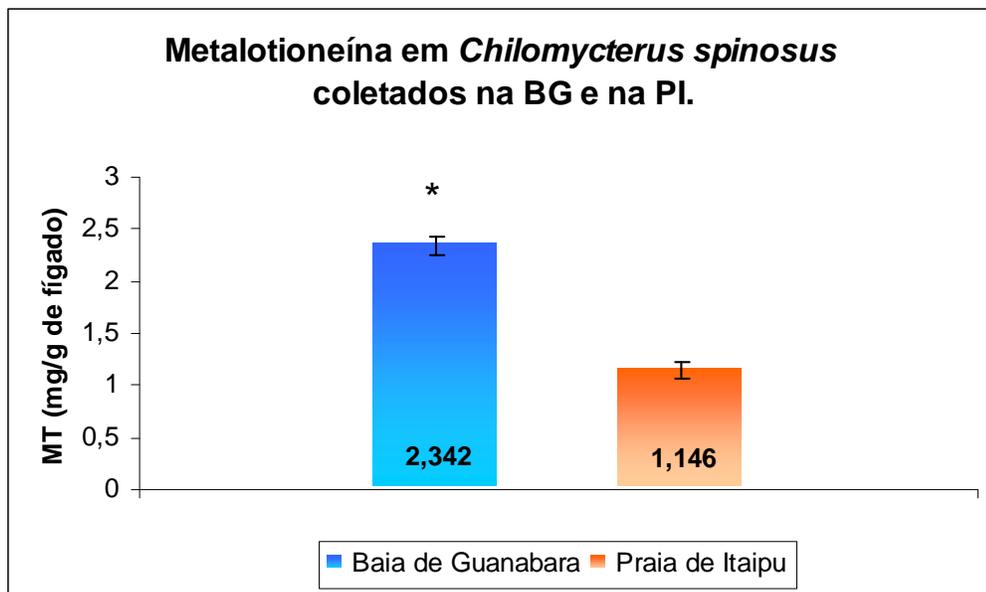


Figura 20: Níveis de metalotioneínas no fígado dos baiacus-de-espinho coletados na BG e na PI

* Valores estatisticamente diferentes de uma região para a outra segundo o teste teste-t $p < 0,05$

Na figura 21 observa-se que os níveis de MT quantificadas no fígado das corvinas da BG (1,07 mg / g de fígado) são maiores que das coletadas na PI (0,40 mg / g de fígado). Ao aplicar o teste-t observa-se que esta diferença entre as médias é significativa de uma região para a outra. $p < 0,005$

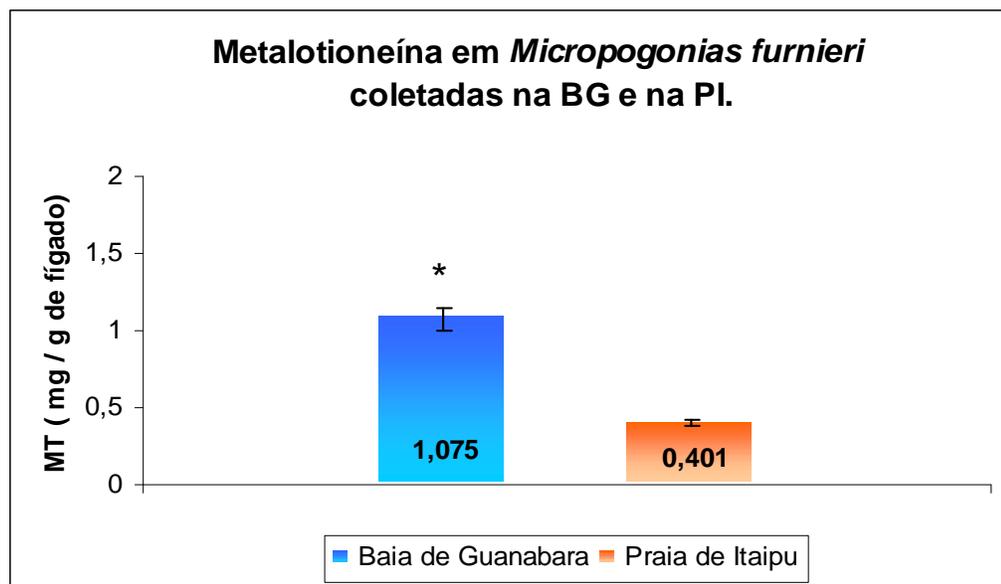


Figura 21: Níveis de metalotioneínas nos fígados de corvinas coletadas na BG e na PI.

* Valores estatisticamente diferentes de uma região para a outra segundo o teste teste-t $p < 0,05$

4.4.2. Atividade da AChE nos baiacus-de-espinho nas corvinas coletados na BG e na PI.

A figura 22 mostra que os valores obtidos da atividade colinesterásica dosada nos músculos do baiacu-de-espinho é menor na BG ($1,169 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$) que dos coletados na

PI ($1,49 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$). Ao aplicar o teste-t observa-se que esta diferença entre as médias é significativa de uma região para a outra. $p < 0,005$

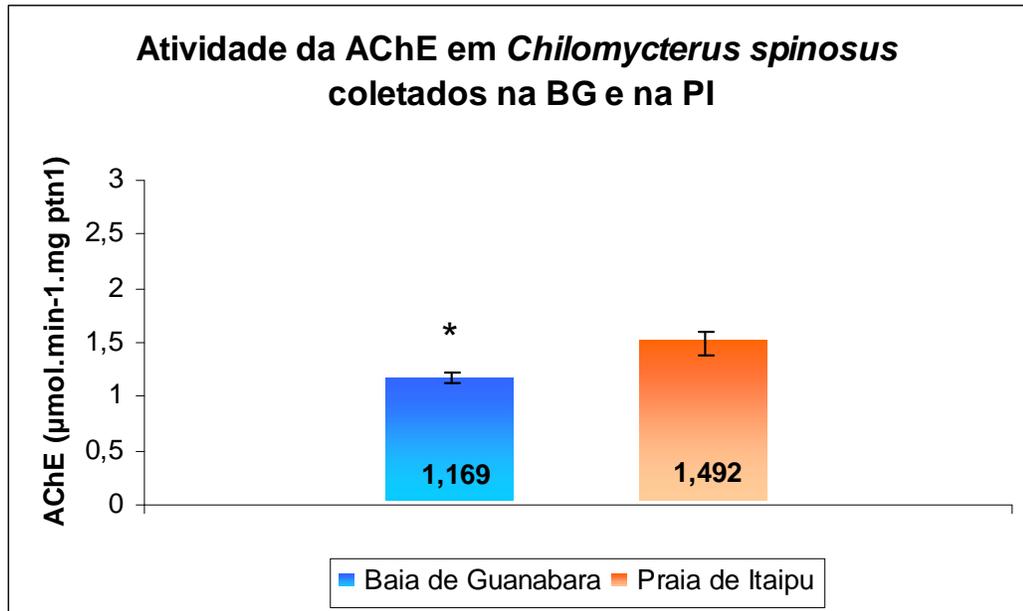


Figura 22: Valores obtidos na análise de acetilcolinesterase dosados no músculo dos baiacus-de-espinho coletados BG e na PI.

* Valores estatisticamente diferentes de uma região para a outra segundo o teste teste-t $p < 0,05$

Na figura 23 observa-se a atividade desta enzima dosada em pedaços de músculos das corvinas coletadas nas duas regiões em estudo, mostrando que a média da atividade da AChE nesta espécie na BG ($0,84 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$) são menores das espécimes da PI ($1,25 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$). Ao aplicar o teste-t observa-se que esta diferença entre as médias é significativa de uma região para a outra. $p < 0,005$

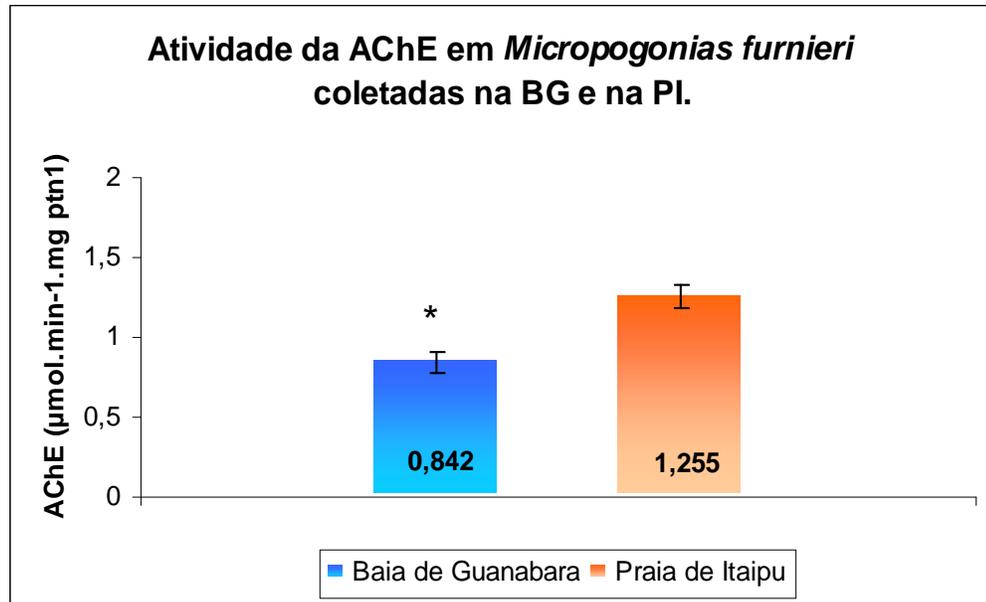


Figura 23: Valores obtidos na análise de acetilcolinesterase dosados no músculo de corvinas coletadas na BG e na PI.

* Valores estatisticamente diferentes de uma região para a outra segundo o teste teste-t $p < 0,05$

5. DISCUSSÃO

A BG é um grande estuário que vem sendo contaminada diariamente por inúmeras substâncias tóxicas que causam impactos significativos não só no meio ambiente como também e principalmente na biota. Por ser um estuário de grande importância, não só ecológica como também social, existe um grande interesse, em avaliar a situação complexa que a BG se encontra, referente aos efeitos da contaminação no ambiente e na população, por ser um ambiente com diversos tipos e muitas formas de poluição^{19,20}

O reflexo do comprometimento ambiental de um ecossistema aquático pode ser evidenciado utilizando peixes como uma espécie potencial de estudo devido a seu alto nível trófico e a sua grande importância na dieta alimentar do ser humano.^{18,78} Estas características a fazem espécie alvo para pesquisas de avaliação de impactos no ambiente e avaliação de risco.

Nestas espécies alvos podem ser analisados marcadores biológicos, biomarcadores, que reflita o efeito do poluente nos organismos. Tais biomarcadores devem apresentar algumas características básicas como relevância toxicológica e que reflitam o efeito real da contaminação nos organismos⁸⁷. Assim sendo, neste estudo foram utilizadas dois biomarcadores específicos: a AChE, que é um enzima inibida pela presença de inseticidas anticolinesterásicos, como OFs e carbamatos; e as MTs, proteínas que são induzidas com a presença de metais no ambiente,^{11,59} e utilizados índices brutos como o ISF, cujo parâmetro reflete as possíveis desordens do fígado e o FC, que indica o estado geral dos organismos.

Para avaliar o potencial desses biomarcadores específicos e dos índices brutos foram coletadas duas espécies de peixes da BG e da PI: o baiacu-de-espinho e a corvina, a primeira com uma grande importância ecológica e abundante na BG e a segunda por ter um significativo valor

comercial, estando inserida na dieta alimentar do homem, sendo ambas com alto nível predatório.

70,71

Entretanto, tanto os biomarcadores específicos quanto os índices brutos podem estar relacionados com os parâmetros biológicos e/ou fisiológicos do peixe, por isso neste estudo eles também foram relacionados aos parâmetros biológicos - peso, comprimento, sexo e maturação sexual - a fim de investigar as influências que esses parâmetros têm nos biomarcadores e nos índices brutos.

5.1 Análise dos parâmetros biológicos nas espécies

As análises dos parâmetros biológicos dos baiacus-de-espinho podem ser observadas na tabela 2, onde se mostra que os espécimes coletados na BG são significativamente menores tanto em peso quanto em comprimento, dos coletados na PI. ($p < 0,005$). Isto pode ser devido ao fato da baía ser um grande estuário de desenvolvimento para muitas espécies deixando-a quando atingem determinada maturação, e os baiacus-de-espinho podem ter esse comportamento, por isso o fato de serem maiores significativamente na PI. Outro fator que pode ter influenciado esta diferença é também o método de pesca que pode interferir no processo de coleta das amostras apresentando assim, diferentes distribuições de comprimento, de taxas de crescimento e de estruturas de idade

76

Os métodos de pesca foram diferentes de uma região para a outra, onde na BG foi por meio de arrastos sendo utilizadas redes padrões com duração de 30 minutos por arrasto⁹⁹ e na PI foi o arrasto de praia que consistia em lançar redes ao mar deixando por alguns minutos e posteriormente os pescadores as recolhiam com as espécies. Apesar do peso e do comprimento dos baiacus-de-espinho terem uma diferença significativa, suas médias estão próximas e acredita-

se que esta diferença não interfira nas análises de AChE, MT, FC e ISF. Como não existem estudos descrevendo a relação do comprimento com a maturação sexual dos baiacus-de-espinho não foi possível analisar a sua relação com os biomarcadores específicos nestas espécies.

Apesar das corvinas serem bem maiores que os baiacus-de-espinho, as corvinas seguem a mesma tendência que eles, onde os espécimes coletados na BG são significativamente menores das coletadas na PI ($p < 0,005$). Também isso pode ser devido ao fato destas espécies se reproduzirem e desenvolverem na baía e quando atingem um estágio de maturação elas migram para o oceano já com um tamanho maior, por isso que as coletadas na região controle são maiores, não descartando a influência do método de pesca como dito anteriormente.

Como foram encontradas diferenças significativas no comprimento das corvinas e já que há estudos destas espécies relacionando seu comprimento com a maturação sexual ⁷⁶, os espécimes de corvinas foram divididos em duas categorias segundo o comprimento, considerando-se maior de 28 cm, maduras sexualmente e menores de 28cm, imaturas. Isso foi feito, para verificar se esta diferença de comprimento interferiria nas análises dos biomarcadores específicos – AChE e MT - e dos índices brutos - FC e ISF.

Segundo esta separação observa-se que não houve diferença significativa entre os espécimes madura e imaturas sexualmente nas análises de AChE, da MT, do FC e do ISF. Isto parece indicar que a maturação sexual não interfere nos resultados dos parâmetros a cima referidos.

5.2. Influência do sexo nos índices brutos

O sexo tanto das corvinas quanto dos baiacus-de-espinho coletados na BG e na PI foi identificado observando macroscopicamente suas gônadas, no entanto não foi possível identificar o sexo em todos os espécimes coletadas no estuário, já que em alguns exemplares suas gônadas

não estavam desenvolvidas completamente. Dessa forma, o sexo foi separado em macho, fêmea e amostras não identificadas. Em relação as corvinas de Itaipu, todas elas foram identificadas, uma vez que suas gônadas estavam bem desenvolvidas. Assim sendo, para verificar se o sexo influencia significativamente nos índices brutos e nos biomarcadores específicos foram feitas análises desses parâmetros nas duas espécies verificando a sua relação com sexo.

5.2.1 Influência do sexo no ISF dos baiacus-de-espinho e das corvinas.

O ISF indica se o peixe está sofrendo alguma condição que imponha um maior gasto energético ⁸⁸. Este índice é muito utilizado como uma ferramenta bastante importante na avaliação ambiental, pois indica possíveis desordens no fígado, órgão que tem uma função detoxificadora. ⁵⁵

Segundo Power 2000 este índice pode ser influenciado por fatores fisiológicos, inclusive a reprodução, já que os hormônios produzidos nesta fase podem influenciar de alguma forma neste parâmetro.

Muitos autores relatam que o ISF pode estar relacionado ao sexo, onde as fêmeas possuem este índice maior quando comparado aos machos, pois na época de reprodução, a produção de hormônios influencia de alguma forma o ISF ⁸⁹. Porém neste trabalho apesar de ter sido encontrado uma média maior do ISF nas corvinas e baiacus-de-espinho fêmeas coletadas na BG e na PI, exceto para as corvinas fêmeas da PI, esta diferença encontrada não foi significativa, ($p > 0,05$) mostrando que não há influência do sexo, acreditando-se que não irá haver interferência, se os sexos forem agrupados.

5.2.2. Influência do sexo no FC dos baiacus-de-espinho e das corvinas.

O fator de condição – FC - é um índice muito utilizado em estudos de biologia pesqueira, pois indica o estado geral de saúde, a reserva energética do peixe frente ao meio em que vive.⁹⁰ Esse índice é bastante utilizado em pesquisas, pois serve como uma ferramenta na avaliação ambiental, uma vez que seu uso implica alterações de bem estar das populações de peixes.^{90,91}

Assim sendo, foram feitas análises do FC nas espécies estudadas separando o sexo de cada espécime para verificar se o sexo influencia de alguma forma este índice.

O bserva-se então, que os baiacus-de-espinho fêmeas possuem um FC menor relacionado aos machos da região da BG, e quando se observa o sexo dos espécimes de Itaipu, nota-se que ocorre o oposto. Em relação ao FC das corvinas fêmeas coletadas na BG nota-se que estes valores são maiores comparando-as com os machos, ocorrendo o mesmo na região de Itaipu.

Segundo Lizama 2002 o sexo pode influenciar no FC, quando as espécies estão em período de reprodução ou no desenvolvimento da maturação das gônadas, porem neste trabalho, apesar de existir uma diferença entre as médias dos sexos identificados e não identificados de uma mesma região, esta diferença encontrada não foi significativa, ($p > 0,05$) mostrando que não há influência do sexo, acreditando-se que não irá haver interferência, se os sexos forem agrupados.

5.2.3 Influência do sexo na AChE dos baiacus-de-espinho e das corvinas.

A AChE é uma enzima bastante sensível a exposição a inseticidas OFs e carbamatos, sendo sua atividade inibida com a presença destes ou de seus metabólitos. Isso faz com que esta enzima seja utilizada como biomarcador de efeito para a verificação dos efeitos primários da contaminação nos organismos aquáticos e na avaliação da qualidade das águas.^{11,62} Muitos

estudos mostram que o sexo das espécies podem alterar o comportamento desta enzima, onde alguns hormônios produzidos pelas fêmeas podem influenciar a atividade enzimática.⁹³

Apesar de ter sido encontrada uma média maior da AChE nas corvinas e nos baiacus-de-espinho fêmeas coletadas na BG e na PI, indo de acordo com muitos estudos onde mostram que fêmeas podem ter sua atividade alterada mediante alguns hormônios, estas diferenças de sexo não são significativas ($p > 0,005$). Isso mostra que neste estudo o sexo não influencia a AChE, acreditando-se que não irá haver interferência nas análises posteriores, se os sexos forem agrupados.

5.2.4 Influência do sexo na MT dos baiacus-de-espinho e das corvinas.

As MTs são caracterizadas por serem induzidas pela presença de metais, onde sua função biológica envolve detoxificação e a homeostase de metais; representando uma resposta específica de exposição aos metais como Cu, Zn, Cd e Hg, etc.^{44,45}

Muitos estudos vêm sendo feitos nos últimos anos acerca da utilização das MTs como biomarcadores de contaminação por metais em vários organismos, principalmente em peixes ósseos.^{7,53, 54}

Vários estudos como os de Rotchel, J.M 2001 mostram que a presença desta proteína é influenciada pelo sexo, principalmente quando a fêmea está em período de maturação, onde a mesma será induzida pela presença de zinco no organismo. Sendo assim, foram feitas análises nas espécies estudadas separando-as por sexo para verificar se realmente o sexo influencia na MT.

Ao comparar as médias da MT dos baiacus-de-espinho macho com as médias das fêmeas da BG, observa-se que as fêmeas possuem uma média maior que os machos, da mesma forma ocorre com os espécimes coletados na PI.

Em relação as corvinas observa-se que estas proteínas foram mais induzidas nos machos que nas fêmeas, procedendo da mesma maneira em Itaipu.

As diferenças de médias entre os sexos de uma mesma região para ambas as espécies, não são estaticamente significativas ($p > 0,005$). Isso mostra que neste estudo o sexo não determina os níveis de MTs, acreditando-se que não irá haver interferência nas análises posteriores, se os sexos forem agrupados.

5.3. FC e ISF na avaliação dos efeitos da contaminação da BG e da PI nos baiacus-de-espinho e nas corvinas.

Após ter verificado que o sexo das espécies estudadas e que sua maturação sexual não influenciam de forma significativa nestes índices, os resultados destes parâmetros foram agrupados para verificar a potencialidade dos índices brutos - FC e ISF - na avaliação dos efeitos da contaminação nos baiacus-de-espinho e nas corvinas coletadas na BG e na PI.

Estes dois parâmetros biológicos podem fornecer informações sobre reservas de energia e do stress ambiental nas espécies coletadas na BG e na área controle: PI.⁵⁵ Tanto o FC quanto o índice ISF se calculam através de relações efetuadas entre características individuais dos animais,⁶⁶ o primeiro caracteriza-se pela relação entre o comprimento do animal e o seu peso, avaliando a condição geral do organismo e a capacidade do animal tolerar agentes tóxicos ou outras interferências no ambiente que o afetem.⁶⁷ Já o segundo é a relação entre o peso do fígado e o peso total do animal onde este parâmetro identifica as possíveis desordens do fígado.⁶⁷

Mediante estas informações as análises desses índices brutos podem ser ferramentas valiosas na avaliação de risco e impacto ambiental¹¹, pois eles podem servir como um auxílio aos outros biomarcadores específicos como os utilizados neste trabalho – MT e AChE.

Assim sendo, foram encontrados tanto nas corvinas quanto nos baiacus-de-espinho um ISF maior na PI quando comparados a BG. Esta diferença entre as médias da corvina e dos baiacus-de-espinho, de uma região para a outra, é significativa ($p < 0,005$).

Estes não seriam os resultados esperados, já que se esperaria que os valores do ISF das espécies coletadas na BG fossem maiores, pois se a BG é uma região altamente poluída, este índice indicaria por ser maior, possível alteração que o fígado dos peixes estaria sofrendo devido a exposição aos contaminantes. Mas além deste índice ser influenciado por substâncias nocivas ao organismo, ele pode também estar sendo influenciado por fatores fisiológicos e / ou biológicos.

Cabe destacar que o peso e comprimento de ambas as espécies foram maiores na região da PI, e o tamanho do fígado das espécimes coletadas na PI foram também maiores que os coletados na BG, onde diferentes estados fisiológicos podem influenciar no aumento do tamanho ou no aumento do número das células hepáticas^{11,55} afetando por tanto o ISF. Acredita-se que estas diferenças de médias do ISF entre as espécies da BG e da PI indicam diferentes estados fisiológicos e/ou biológico que estariam interferindo nestas análises e não devido as diferenças de contaminação das regiões em estudo.

Outro índice estudado foi o FC, onde se encontrou um valor maior deste parâmetro na PI quando comparado a BG, nas duas espécies. Como este parâmetro fornece o estado geral de saúde do peixe, e se este índice é maior, isto significa que as espécies estão em condições gerais melhores, com uma boa reserva energética.⁶⁷ Neste estudo, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, pois tanto o baiacu-de-espinho quanto a corvina obtiveram médias maiores do FC na PI que na BG, sendo estas diferenças de médias de uma região para outra significativa ($p < 0,005$).

Assim sendo, observa-se neste trabalho que o FC tem um potencial melhor como índice bruto na avaliação da contaminação que o ISF. Uma vez que os resultados do FC estão indo em

concordância com o grau de contaminação indicando que os peixes em melhores condições gerais são os da região controle, acreditando também que este índice não foi tão influenciado pelo fatores fisiológico e/ou biológicos como o ISF.⁵⁵ Neste trabalho, o FC pode ser uma boa ferramenta nos estudos de pesquisas sobre os efeitos da contaminação nestas regiões.

5.4. Efeitos da contaminação ambiental utilizando biomarcadores específicos

Após ter verificado que o sexo das espécies estudadas e que sua maturação sexual não influenciam de forma significativa nestes índices, os sexos das espécies foram agrupados para agora verificar a potencialidade da MT e da AChE nos baiacus-de-espinho e nas corvinas coletadas na BG e na PI.

5.4.1. Avaliação do efeito da contaminação na BG e na PI utilizando MT em baiacus-de-espinho e em corvinas.

Um dos tipos de poluentes de maior impacto nos ecossistemas são os metais já que possuem alta capacidade de bioacumular-se e por biomagnificar-se.³⁷ Com isso, destacaram-se principalmente pelo risco apresentado ao ser humano através do consumo de alimentos de origem animal, dentre eles, os peixes que representam uma das principais fontes de proteína da alimentação humana.⁵

Os ambientes mais prejudicados são os ecossistemas costeiros, que de uma forma direta ou indireta são os sorvedouros finais desse tipo de contaminantes.² E um dos grandes ecossistemas que estão sendo degradado pelos metais é a BG.^{18,19} Apesar da análise de água e sedimentos serem importantes para a avaliação da contaminação ambiental por metais, elas ainda

não fornece informações sobre os efeitos reais nos organismos. Assim sendo, a análise da biota ou de biomarcadores constituem importantes ferramentas em programas de monitoramento ambiental.²

Sendo assim, foram utilizadas MTs como biomarcadores específicos de exposição a metais já que são proteínas induzidas e responsáveis pela detoxificação e homeostase destes.⁴⁴ Esta proteína tem sido bastante utilizada em vários organismos, principalmente em peixes ósseos na avaliação dos efeitos ambientais ocasionados por metais.^{53,54}

Por esta razão, foi realizada neste estudo uma avaliação dos efeitos da contaminação por metais na BG utilizando a MT em duas espécies: baiacu-de-espinho e a corvina, a fim de avaliar estes efeitos na biota marinha.

Neste trabalho tanto o baiacu-de-espinho quanto as corvinas apresentaram níveis de MTs maiores na BG, mostrando que há um efeito maior da contaminação por metais nesta região do que na região controle. Esses valores de MT nas duas espécies coletadas são diferentes significativamente de uma região para a outra ($p < 0,005$).

Os resultados encontrados neste estudo utilizando MT como biomarcador nos baiacus-de-espinho e corvinas, refletiram o real efeito da contaminação que o ecossistema vem sofrendo com a presença de metais, já que a região mais contaminada, BG, possui níveis mais altos nas duas espécies que na região controle. Isso parece indicar o efeito que a grave contaminação por metais existentes na BG, onde cerca de 0,3 toneladas contendo chumbo, cromo, zinco e mercúrio são lançadas diariamente, exerce sobre a biota desta região e isso estaria refletindo de forma significativa a indução das MTs nestas espécies.^{18,20}

Assim sendo, este trabalho mostra sua importância não só em ser pioneiro no uso da MT como biomarcador na avaliação do efeito real que os metais vem causando na biota marinha da

BG, como também em mostrar que a utilização desta proteína pode servir de ferramenta na avaliação de risco nos ecossistemas aquáticos.

5.4.2. Avaliação do efeito da contaminação na BG e na PI utilizando AChE em baiacu-de-espinho e em corvinas.

Os inseticidas OFs são bastante utilizados, de modo geral, na piscicultura, para o controle de larvas de insetos aquáticos predadores de larvas de peixes e na agricultura para o controle de vetores.^{95,96}

Apesar dos OFs serem compostos degradados rapidamente no ambiente, muitos deles originam produtos tóxicos, persistentes e que inibem a AChE em muitas espécies. Os efeitos tóxicos de alguns OFs e seus metabólitos no sistema nervoso decorre de sua potente capacidade inibitória da AChE, onde estas enzimas possuem atividade hidrolítica sobre ésteres de colina.⁹⁷ Esta propriedade permite que elas sejam responsáveis pela manutenção das concentrações adequadas da acetilcolina, que é liberada pelas terminações nervosas nas sinapses colinérgicas, diminuindo a atividade enzimática de organismos expostos àqueles compostos.^{68,97} Sendo assim, esta enzima pode ser utilizada como biomarcador específico o que a torna uma boa ferramenta na avaliação dos efeitos produzidos pelos OFs em organismos expostos.⁴⁰

Este estudo possibilitou observar que a atividade enzimática tanto das corvinas quanto dos baiacus-de-espinho é menor na BG quando comparada as espécimes coletadas na PI. Estes efeitos podem ter sido ocasionados não só por despejo feito diretamente pelo homem na baía, após o uso de OFs na agricultura, como também indiretos, onde estes inseticidas ou seus metabólitos podem ter sido carregados pelos rios com deságüe na baía.⁶⁷ Estes fatos contribuem para a contaminação dos ecossistemas marinho da BG, onde estes anticolinesterásicos irão inibir

de forma significativa a AChE que por sua vez não desempenhará sua função normal que baseia-se na hidrólise da acetilcolina.

Isso demonstra que os baiacus-de-espinho e as corvinas da BG estão sofrendo mais efeitos da contaminação por OFs, que os espécimes coletados na PI, acreditando-se que por este estuário possuir aproximadamente 14.000 indústrias e 7,6 milhões de habitantes isso tenha contribuído para um aumento significativo da utilização de produtos tóxicos como dos OFs.²⁰ Os resultados encontrados neste estudo utilizando AChE como biomarcador nas duas espécies, refletiram, na biota, os efeitos reais da contaminação por OFs, mostrando que a utilização deste biomarcador específico é de grande importância uma vez que possibilitou demonstrar os efeitos que a poluição da BG está causando.

Este trabalho possibilitou observar que tanto a atividade da AChE quanto o FC utilizados como biomarcadores específicos e índice bruto, respectivamente, possuíram valores maiores na PI que na BG e que a MT obteve níveis maiores na BG que na PI nas duas espécies estudadas. Isso permitiu mostrar que na região da BG, por possuir alto grau de contaminação por metais e OFs, a biota marinha está sofrendo diversos efeitos que podem acarretar desequilíbrio nos ecossistemas.^{21,24} Já o ISF não se mostrou uma boa ferramenta de avaliação sobre os efeitos da contaminação nestas regiões. No ecossistema em estudo as variações dos biomarcadores devido aos fatores abióticos não foram considerados por não serem significativas em comparação aos efeitos da contaminação tão grave, acreditando-se que não teve influências relevantes na avaliação dos efeitos, através dos biomarcadores específicos e dos índices brutos.

Assim sendo a utilização dos biomarcadores específicos e dos índices brutos neste trabalho permitiu avaliar um retrato detalhado dos diferentes efeitos que a contaminação vem causando na biota marinha, sendo possível diferenciar os efeitos de agrotóxicos e metais. O emprego destes marcadores abrange distintos níveis de organização biológica possibilitando o

conhecimento sobre a que nível o poluente está interagindo com o organismo e a que nível este é mais suscetível a ação daquele. Os resultados de trabalhos como este, são essenciais, pois proporciona um conhecimento mais preciso da qualidade ambiental das áreas em estudo, uma vez que permite estabelecer o efeito tóxico real que a contaminação exerce sobre a biota.⁹⁸ Isso permitirá avaliar e caracterizar o estado de saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos, produzindo dados confiáveis que possibilitarão a implementação de medidas adequadas para a sua proteção e/ou recuperação, além de permitir a avaliação dos riscos que tais contaminações conferem a Saúde Pública e na biodiversidade desses ecossistemas.

6. CONCLUSÃO

Nas corvinas, coletadas na BG e na PI, o período de maturação sexual não influencia significativamente os valores dos biomarcadores específicos - MT e AChE e dos índices brutos – FC e ISF.

O sexo dos baiacus-de-espinho e das corvinas coletadas na BG e na PI, não influencia os valores dos biomarcadores específicos – MT e AchE e os valores dos índices brutos - ISF e FC.

O ISF dos baiacus-de-espinho e das corvinas não refletiu os efeitos esperados, uma vez que estes valores foram maiores na região controle que na BG. Acreditando que isso seja devido aos parâmetros fisiológicos que estejam interferindo nos valores deste índice. Assim sendo neste estudo o ISF não se mostrou como um bom índice de avaliação dos efeitos da contaminação.

Os valores do FC mostraram que os baiacus-de-espinho e as corvinas apresentaram melhores condições gerais de saúde na região controle que na BG, indicando-se como uma boa ferramenta de avaliação ambiental, pois foi em concordância com o grau de contaminação das regiões em estudo.

Os níveis de MT, nos baiacus-de-espinho e nas corvinas foram maiores na região da BG que na região controle, mostrando o efeito que a contaminação por metais vem causando na biota da BG.

A atividade da enzima AChE dos baiacus-de-espinho e das corvinas foram maiores na região controle que na BG, mostrando o efeito que a contaminação por agentes anticolinesterásicos vem causando na biota da BG.

O uso dos biomarcadores específicos - MT e Ache - em baiacus-de-espinho e em corvinas permitiu avaliar os efeitos diferenciados da contaminação por metais e agentes anticolinesterásicos em uma situação complexa de poluição, como a da BG.

As duas espécies estudadas: os baiacus-de-espinho e as corvinas se mostraram boas espécies indicadoras, uma vez que o uso dos índices brutos e dos biomarcadores nestes espécimes permitiu avaliar os diferentes efeitos da contaminação na BG.

7. REFERÊNCIAS

1. Sperling, EV. Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos. *Biology* 2 1993; (3):p.6-53
2. Tomazelli, C.A. Estudo comparativo das concentrações de cádmio, chumbo e mercúrio em seis bacias hidrográficas do Estado de São Paulo. ”. [Dissertação de Doutorado] Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
3. White PA, Rasmussen, JB. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutant Research*: 1998; 410: 36-223.
4. Tundisi, JG, Straškraba, M. Theoretical reservoir ecology and its applications. São Carlos: Instituto Internacional de Ecologia, 1999. 858 p.
5. Rotchel, JM, Clarke, KR, Newton, DJ, Bird, DJ. Hepatic Metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Marine Environmental Research* 2001; 52: 151-171.
6. Rossetti. Química Personalizada
<http://www.rossetti.eti.br>. (acessado em 20 de maio de 2006).
7. Cajaraville, MP, Bebianno, JM, Blasco, J, Porte, C, Sarasquete, C, Viarengo, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* 2000; 247: 295-311.
8. Kehrig, HA, Pinto, FN, Moreira, I, Malm, O. Heavy metals and methylmercury in a tropical coastal estuary and a mangrove in Brazil. *Organic Geochemistry* 2003; 34: 661–669.
9. Edwards, JW, Edyvane, KS, Boxall, VA, Hamann, M, Soole, KL. Metal Levels in Seston and Marine Fish Flesh Near Industrial and Metropolitan Centres in South Australia. *Marine Pollution Bulletin* 2001; 42(5): 389-396.

10. Hseu, Z.-Y. Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. *Bioresource Technology* 2004; 95(1): 53-59.
11. Viana, TAP. Bioindicadores e mercúrio em tubarões costeiros pescados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. [Monografia de bacharelado] Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.
12. Linde, AR, Inácio, AF, Viana, TAP. Utilização de bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos. In: 1º Congresso Acadêmico Sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento do Rio de Janeiro – Fundação Getúlio Vargas 2004.
13. Scott, GR, Sloman, KA. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 2004; 68: 369-392.
14. Perttilä, M, Tervo, V, Parmanne, R. Heavy metals in Baltic Herring and Cod. *Marine Pollution Bulletin* 1982; 13(11): 391-393.
15. Marcovecchio, JE, Moreno, VJ, Pérez, A. Metal Accumulation in Tissues of Sharks from the Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Marine Environmental Research* 1991; 31: 263-274.
16. Moraes, LSD, Jordão, QB). Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Revista de Saúde Pública* 2002: 36 (3).
17. Inácio, FA. Metalotioneína e metais em *Geophagus brasiliensis* – acará. [Dissertação de Mestrado]. Fundação Oswaldo Cruz, 2006.
18. Mayr ML, Paranhos R. Baía de Guanabara, qualidade das águas. Fundação Getúlio Vargas 2000.
19. Amador, E. 1997. Baía de Guanabara e ecossistemas periféricos: homem e natureza. Tese de Doutorado. Instituto de Geociências. Universidade Federal do Rio de Janeiro: 539 p.
20. Aspectos da atividade de pesca na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. Governo do Estado do Rio de Janeiro. <http://www.baiadeguanabara.com.br>. (acessado em 21 de janeiro de 2006).

21. Scheffer, M. “Uma avaliação do controle industrial do programa de despoluição da Baía de Guanabara: o caso das 55 industriais prioritárias”. ”. [Dissertação de Mestrado] Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE. Rio de Janeiro 2001.
22. Mapa satélite da baía de Guanabara. <http://www.wikimapia.org/#y=-22874910&x=-43019371&z=12&l=9&m=a&v=1> (acessado em 24 de outubro de 2006)
23. Brito ,XAP, Bruning, AIMR, Moreira, I. Chlorinated pesticides in mussels from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 2002; 44(1):79-81
24. Moreira, I, Bruning, IMRA, Brito, XAP. Chlorinated pesticides in mussels from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Bulletin* 2002; 44: 71-81.
25. Características da Praia de Itaipu, <http://www.nitvista.com> (acessado em 10 de novembro de 2006)
26. Características sobre a Baía de Guanabara http://www.igeo.uerj.br/VICBG-2004/Eixo1/e1_05.htm. (acessado em 10 de setembro de 2006)
27. Carcatrísticas sobre o meio ambiente, <http://www.portosrio.gov.br/supmam/Meio%20Ambiente.pdf>. (acessado em 14 de julho de 2006)
28. Características da Praia de Itaipu, http://www.glosk.com/BR/Praia_de_Itaipu/161673/index_pt.htm. (acessado em 10 de novembro de 2006)
29. Santos, CL. Dinâmica sazonal e os efeitos das ressacas nas praias de Niterói (Rio de Janeiro). ”. [Dissertação de Mestrado] Universidade Federal Fluminense - UFF, 2001.
30. Mapa satélite da baía de Guanabara. <http://www.wikimapia.org/#y=-22874910&x=-43019371&z=12&l=9&m=a&v=1> (acessado em 24 de outubro de 2006)
31. Benjamin, M.N; Honeyman, B.D. Heavy metals. *Global Biogeochemical Cycles* 1992; 379 p.

32. Shi, B, Allen, HE, Grassi, MT. Huizhong, M. Modeling cooper partitioning in surface waters. *Water Resource* 1998; 32: 3756- 3764.
33. Foster, IDL, Charlesworth, SM. Heavy metals in the hydrological cycle: trends and explanation. *Hydrological Processes* 1996; 10: 227-261
34. Soares, HMVM, Boaventura, RAR, Machado, AAS, Esteves, da Costa Silva, JCG. Sediments as monitor os heavy metal contamination in the Ave River basin (Portugal): multivariate analysis of data. *Environmental Pollution* 1999; 105: 311-323.
35. Huggett, DB, Steevens, J.A.; Allgood, J.C.; Lutken, C.B.; Grace, C.A.; Benson, W.H. Mercury in sediment and fish from north Mississipi lakes. *Chemosphere* 2001; 42: 923-929.
36. Baid, C. *Environmetal chemistry*. Ferman and Company, 1995; 484p
37. Tavares, TM, Carvalho, FM. Avaliação de exposição de populações humana a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. *Química Nova* 1992; 15: 147-154.
38. Oliveira – Silva, AL. Levantamento fenotípico da atividade da enzima paraoxonase em populações expostas e não expostas a pesticidas organofosforados, 2000. ”. [Dissertação de Mestrado]. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Publica, Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, Rio de Janeiro, 2003
39. Oliveira-Silva, JJ, Alves, SR, Inácio, AF, Meyer, A, Sarcinelli, PN, Ferreira, MF, Cunha, JC, Moreira, JC. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. *Human Experimental Toxicology* 2000; 19(3): 173-177
40. Fulton, M.H.; Key, P.B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide and exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2000; 20 (1): 37-45.
41. Bocquené, G, Galgani, F, Truquet, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity form several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental* 2002

42. Au, DWT. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* 48: 817-834
43. Walker, MJC, Montemagno, MB, Jenkins. Source water assessment and nonpoint sources of acutely toxic contaminants: A review of research related to survival and transport of *Cryptosporidium parvum*. *Water Resources Research* 1998; 34 (12):3383-3392
44. Linde, AR, Inácio, AF, Novo, LA, Viana, TAP, Albuquerque, C. Utilização de Bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos. *Mundo & Vida*, 2005.
45. Dabrio, M, Rodríguez AR, Bordin, G, Bebianno, MJ, Vasak, M, Nordberg, M. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002; 88: 123–134
46. Viarengo, A, Ponzano, E, Donderob, F, Fabbri, R. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research* 1997; 44 (1)69-84.
47. Olafson RW, Thompson JAJ. Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Marine Biology*, 1974; 28: 83-86
48. Kito, H, Tazawa, T, Ose, Y, Sato, T, Ishikawa, T. Protection by metallothionein against cadmium toxicity. *Comparative Biochemistry Physiology*, 1982; 73:129-134.
49. Ley, HL, Failla ML, Cherry, DS. Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry Physiology*, 1983; 74B:507-513.
50. Romeó M, Cosson, RP, Gnassia-Barelli, M, Risso, C, Stien, X, Lauffarie, M. Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P. *Marine Environment*; 1997; 44: 275-284
51. Ueng, YF, Liu, C, Lai, CF, Meng, LM, Hung, YY, Ueng, TH. Effects of Cadmium and Environmental Pollution on Metallothionein and Cytochrome P450 in Tilapia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1996; 57: 125-131.
52. Burkhardt - Holm, P, Bernet, D, Hogstrand, C. Increase of metallothionein-immunopositive chloride cells in the gills of brown trout and rainbow trout after exposure to sewage treatment plant effluents. *The Histochemical Journal* 1999; 31: 339-346.

53. Schlenk, D, Colley, WC, El-Alfy, A, Kirby, R, Griffin, BR. Effects of the Oxidant Potassium Permanganate on the Expression of Gill Metallothionein mRNA and Its Relationship to Sublethal Whole Animal Endpoints in Channel Catfish. *Toxicological Sciences* 2000; 54: 177-182.
54. Filipovic, V, Raspor, B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. *Water Research* 2003; 37: 3253-3262.
55. Van Der Oost, R, Beyer, J, Vermeulen, NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003; 13: 57-149.
56. Savva, D, LI, B. Characterisation of Two Metallothionein cDNAs from the Shore Crab for use as Biomarkers of Heavy Metal Pollution. *Ecotoxicology* 1999; 8: 485-493.
57. Haq, F, Mahoney, M, Koropatnick, J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* 2003; 533: 211-226.
58. Romani, R, Antognelli, C, Baldracchini, F, de Santis, A, Isani, G, Giovannini, E, Rosi, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions* 2003; 145: 321-329.
59. Roex, EWM, Keijzers, R, Van Gestel, CAM. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology* 2003; 64: 451-460
60. Stien, X, Percic, P, Gnassia-Barelli, M, Romè, M, Lafaurie, M. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution* 1998; 99: 339-345.
61. Sancho, E, Cerón, JJ, Ferrando, MD. Cholinesterase Activity and Hematological Parameters as Biomarkers of Sublethal Molinate Exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2000; 46: 81-86.
62. Lionetto, MG, Caricato, R, Giordano, ME, Pascariello, MF, Marinosci, L, Schettino, T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin* 2003; 46: 324-330.

63. Sturm, A, Assis, SHC, Hansen, PD. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research* 1999; 47: 389-398.
64. Fuente-Rodrigues, G.; Bouchot-Gold, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues os Nile tilapia. *Marine Environmental Research* 2004; 58: 505 – 509.
65. Magnotti, RA, Zaino, JP, McConnel, RS. Pesticide-sensitive fish muscle cholinesterases. *Comparative Biochemistry and physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and endocrinology* 108 (2): 187-194;
66. Ron, VDO, Jonny, B, Nico, PE, Vermeulen. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk Assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003; 13 57_/149.
67. Mayer, FL, Versteeg, DJ, Mckee, MJ, Folmar, LC, Graney, RL, Mccume, DC, Rattner, BA. Metabolic products as biomarkers. In: Huggett, RJ, Kimerly, RA, Mehrle, PM, JR, Bergman, HL. (Eds.), *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Chelsea, USA. 1992
68. ALbertoni, FE, Silva PC, Esteves, de AF. IICrescimento e fator de condição na fase juvenil de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille) e *F. paulensis* (Pérez-Farfante) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) em uma lagoa costeira tropical do Rio de Janeiro. *Brasil Revista Brasileira de Zoologia* 2003; 20: (3).
69. Rodrigues, APC. Avaliação de risco ecológico associado à contaminação mercurial em dois estuários do Estado do Rio de Janeiro: Baía de Guanabara e Baía da Ribeira. [Dissertação de Mestrado]. *Geociências da Universidade Federal Fluminense*; 2006.
70. Nelson, JS. *Fishes of the world*. Third edition.. John Wiley & Sons 1994; 600 p.
71. Rotundo, MM, Zavala-Camin, LA, Dias, JF. Síntese Histórica do conhecimento sobre *Baiacus*. In: *Simpósio Brasileiro de Oceanografia*. Instituto oceanográfico da Universidade de São Paulo - São Paulo – SP; 2002

72. Rotundo, MM, Arakaki, C, Araújo, VG, Zavala-Camin, LA. Aspectos Anatômicos da Locomoção de *Cylichthys spinosus* (Diodontidae, Tetraodontiformes). In: XV Encontro Brasileiro de Ictiologia - "Rumos da Ictiologia Brasileira 2003.
73. Frigolett, E. M. Guia do Meio Ambiente - Litoral de Alagoas
<http://www.frigoletto.com.br>. (acessado em 03 de março de 2006).
74. Apresentação de características de peixes. <http://www.fishbase.org>. (acesso em 08 de fevereiro de 2006)
75. Vazzoler, AEA de M.. "Diversificação fisiológica e morfológica de *Micropogonias furnieri* (Desmarest,1823) ao sul de Cabo Frio, Brasil." Bolm Inst. Oceanography 1971; 20 (2): 1-70
76. Vazzoler, AEA de M. Síntese de conhecimentos sobre a biologia da corvina, *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823), da costa do Brasil. Atlântica, Rio Grande 1991; 13 (1): 55 -74.
77. Vazzoler, G. "Distribuição da fauna de peixes demersais e ecologia dos Sciandae da plataforma continental brasileira entre as latitudes 29° 21'S e 33° 41'". Bulletin. Institute. Oceanography 1975; 24:85-169.
78. Kerig, HA, Moreira, I, Malm, O, Pfeiffer, WC. "Especiação e acumulação de mercúrio pela biota da Baía de Guanabara-RJ". Efeitos de poluentes em organismos marinhos 2001, p. 178.
79. Vieira, LM, Nunes, VS, Campos, RC. Níveis de mercúrio total na carne de peixes como indicadores de contaminação em sistemas aquáticos do Pantanal. In: IV Simpósio sobre Recursos Naturais e sócio-economicos do Pantanal Corumbá/MS 2004.
80. Biblioteca Universitária da PUC. Serviço de Referência.
<http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br>. (acessado em: 05 de janeiro de 2005).
81. Kerig, HA. "Estudo comparativo dos níveis de concentração de mercúrio total em corvinas (*Micropogonias furnieri*) de quatro estuário brasileiros". [Dissertação de Mestrado] Universidade Pontifca Católica – PUC, Rio de Janeiro; 1992

82. Apresentação de características sobre a pesca. [http:// www.pesca.com.br](http://www.pesca.com.br). (acesso em 15 de fevereiro de 2006)
83. Vazzoler, G, Kawakami, E, Zanetti, EM. “Distribuição e abundância de peixes demersais,”; GEDIP/USP/IO 1973; São Paulo. 119 p
84. RASPOR, B. (2001). Elucidation of the mechanism of the Brdička reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 503: 159-162
85. CUNHA, J. B.; LIMA, J. S. AND FARIA, M. V. C. Brain acetylcholinesterase as an in vitro detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. *Water Research*, 25 (7): 835-840, 1991.
86. BAGENAL, T.B., TESCH, F.W., 1978. Methods for assessment of fish production in fresh waters. In: Bagenal, T.B. (Ed.), *Age and Growth*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 101-136.
87. Erk, M, Ivankovic, D, Raspor, B, Pavicic, J. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* 57: 1211-1218
88. Ogata, HY, KU, H. Effects of water velocity on growth performance of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of World Aquaculture Society* 2000; 31:225-231
89. Power, DM, Melo, I. Centro de Ciências do Mar, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8000-810 Faro, Portugal J, Santos, CRA. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *Journal of Fish Biology*. 2000; 56: 374-387.
90. BRAGA, F.M.S. (1986). Estudo sobre fator de condição e relação peso/comprimento para alguns peixes marinhos. *Revista Brasileira de Biologia* 46(2):339-346.
91. Gomiero, LM, Braga, FMS. Relação peso-comprimento e fator de condição para *Cichla ocellaris* e *Cichla monoculus* (Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Volta Grande, rio Grande - MG/SP. *Maringá* 2003; 25 n.1: p. 79-86.

92. Lizama, M de los AP, Ambrosio, AM. Condition factor in nine species of fish of the characidae family in the upper Paraná river floodplain, Brazil. *Brazilian Journal. Biology* 2002; 62(1): 113 -124.
93. Machado MR, Fanta E. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti* Brazilian Archives of Biology and Technology 2003; vol.46 n.3.
94. Silva, HC, Medina, HSG, Fanta, E, Bacila, M. Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisce: Telestei). *Comp. Biochemist. Physiology Oxford* 1993; 105 (2): p.197-201.
95. Noga, EJ. *Fish disease: diagnosis and tratament*. St. Louis, Mosby: North Carolina State University, College of Veterinary Medicine, 1996. 367 p
96. Silva, HC, Medina, HSG, Fanta, E, Bacila, M. Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisce: Telestei). *Comp. Biochemist. Physiology Oxford* 1993; 105 (2): p.197-201.
97. Albuquerque, C. *Uso da acetilcolinesterase em tilápias e acarás como bioindicador de exposição a pesticidas organofosforados em ecossistemas aquáticos*. [Monografia de licenciatura]. Universidade Veiga de Almeida – UVA, Rio de Janeiro, 2004.
98. Amorim, LCA. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2003; 6: supl. 1,
99. Silva-Junior, DR. *Metalotioneína como biomarcador de metal pesado em *Diplectrum radiale* e *D.formosum* (Teleostei: Serranidae) na Baía de Guanabara, RJ*. [Monografia de bacharelado] Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2006
100. Definição sobre metal. [http:// pt.wikipedia.org/wiki/Metal](http://pt.wikipedia.org/wiki/Metal). (acessado em 29 de março de 2007)
101. Lama, PKS, Gray, JS. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Poluution Bulletin* 2003; 46 (2): 182-186
102. Linde, AR, Sanchez-Galan, S, Klein, D, Garcia-Vazquez, E, Summer, KH. Metallothionein and heavy metals in Brown trout (*Salmo trutta*) and european eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study. *Ecotoxicology an Environmental Safety* 1999; 44: 168-173.

103. Linde, AR, Inácio, AF, Albuquerque, C, Novo, LA, Pimenta, TAP. Utilização de biomarcadores como ferramenta de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos.