

# **AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO E DE PARÂMETROS CITOGÊNICOS EM DIVERSAS ESPÉCIES DE PEIXES DA BAÍA DA RIBEIRA, ANGRA DOS REIS, RJ - BRASIL**

**Alinne dos Santos Ramos**

Bolsista de Iniciação Científica, Controle Ambiental, CEFET

**Zuleica Carmen Castilhos**

Orientadora, Farmacêutica, D. Sc.

**Ana Paula de Castro Rodrigues**

Co-orientadora, Bióloga

## **Resumo**

Foi avaliada a contaminação por mercúrio em tecido muscular, sangue total, plasma e hemácias das espécies *C. spixii*, *G. genidens*, *S. luniscutis*, *H. steindachneri* e *M. furnieri*, oriundos da Baía da Ribeira. Para avaliar efeitos citogenéticos dos animais coletados foi realizado o teste do micronúcleo. As concentrações de HgT no músculo em *H. steindachneri* foram próximas ao limite estabelecido pela OMS (500 ng/g). Já bagres e corvinas apresentaram níveis mais baixos (entre 100 e 200 ng/g). A forte correlação entre a concentração de HgT no músculo e HgT no sangue de *S. luniscutis* possibilitou a derivação de uma equação, que poderá ser utilizada para prever teores de Hg no músculo a partir do HgT no sangue, o que permitiria a monitorização sistemática, sem o sacrifício do animal, inclusive em áreas de proteção ambiental. O teste de micronúcleo sugeriu que os espécimes de bagres coletados na Baía da Ribeira são menos expostos a diversos tipos de stress, apresentando menor frequência de micronúcleo do que na Baía de Guanabara.

## **1. Introdução**

O mercúrio é um metal pesado que além do seu estado elementar, se apresenta nos estados  $Hg^{+1}$  e  $Hg^{+2}$ . Pode ser proveniente de fontes naturais e de fontes antropogênicas, incluindo a agricultura, a extração mineral e as atividades industriais. Em um ecossistema aquático, o mercúrio participa de múltiplas reações, uma delas é a metilação, que é a transformação de  $Hg^{+2}$  em metilmercúrio (MeHg), entrando dessa forma na cadeia alimentar. Na cadeia trófica, o MeHg apresenta biomagnificação, caracterizado pela transferência de MeHg acumulado no primeiro nível trófico (os produtores) para os consumidores, sendo que quanto mais longa for a cadeia, maior será a concentração acumulada pelo consumidor final (Cabana et al., 1994). Desta forma, os maiores teores de MeHg são encontrados em peixes que estão no topo da cadeia trófica, como os peixes carnívoros. Além disso, a ingestão de peixes é a principal via de exposição de MeHg ao seres humanos, sendo este um reconhecido agente neurotóxico, em especial, sobre o sistema nervoso central de fetos humanos (ação teratogênica). O MeHg possui afinidade por músculo e pelas hemácias dos peixes, onde ele representa cerca de 90% do mercúrio total.

Atualmente há uma grande dificuldade de se encontrar áreas não contaminadas por efluentes industriais e domésticos. Estudos em áreas livres ou parcialmente livres desses tipos de fontes são necessários para

estabelecer valores referenciais de qualidade ambiental e de parâmetros fisiológicos e bioquímicos dos organismos vivos que neles habitam.

No estado do Rio de Janeiro, a Baía da Ribeira pode ser considerada como área de referência, devido aos baixos níveis de metais pesados encontrados em sedimentos, tais como Ni, Cu, Cr, Mn, Zn e Hg (Cardoso et al., 2001; Lacerda et al., 1981 e 1984), caracterizando-na como uma área não contaminada por fontes antropogênicas desses metais. A região recebe aporte de águas fluviais provenientes da Serra do Mar, formando estuários e manguezais. Apesar da presença da Central Nuclear do Brasil e do estaleiro Velrome. Sedimentos coletados na Baía da Ribeira apresentaram teores médios de HgT de 28  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Cardoso et al., 2001), estando abaixo dos teores considerados de base na Baía de Guanabara, de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Wasserman et al., 1999) e ordens de grandeza abaixo dos maiores teores de HgT em sedimentos deste estuário. Segundo Andreatta et al (2002), na região da Baía da Ribeira foram encontradas 52 famílias de peixes, dentre elas Ariidae, Haemulidae e Sciaenidae.

Os bagres marinhos da família Ariidae são peixes de importância comercial relativamente alta e tem como habitat em vida adulta, as águas salinas. As espécies *Genidens genidens* (Valenciennes, 1840), *Cathorops spixii* (Agassiz, 1829) e *Sciadeichtys luniscutis* (Valenciennes, 1840) apresentam hábito alimentar variado, ingerindo desde moluscos a pequenos peixes (Santos, 1982).

Dos Scianidae, *Micropogonias furnieri*, vulgarmente conhecida como “corvina”, é umas das espécies mais empregadas na dieta alimentar das populações costeiras (Kehrig, 1992). É representante dos peixes carnívoros, alimentando-se de pequenos peixes e crustáceos, não realizando migrações sazonais, quando jovens, permanecendo no estuário (Szpilman, 1995).

*Haemulon steindachneri*, conhecida vulgarmente como cocoroca, pertence à família Haemulidae. É um peixe carnívoro, alimentando-se de vermes, moluscos, crustáceos e peixes pequenos ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

Para avaliação de risco ecológico é necessário considerar a saúde dos peixes coletados. Alguns exemplos são a utilização de hemogramas e a visualização de células sanguíneas para a análise de deformações nucleares. Essas deformações podem ser ou não transmitidas para outras gerações. Uma das alterações em células nucleadas de mais fácil investigação é a presença de micronúcleos. Estes são corpúsculos formados por cromossomos que se encontram dispersos no citoplasma por não terem sido ligados ao fuso durante a divisão celular (Rodrigues & Castilhos, 2003), sendo chamados de micronúcleos. Pode haver também a formação de núcleos bilobados, que indicam um início de alterações no metabolismo celular.

## 2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral identificar e avaliar o risco ecológico na região da Baía da Ribeira tendo como objetivos específicos:

- I – Avaliar a contaminação mercurial nas matrizes sangue e músculo de diversas espécies de peixes e com diversos hábitos alimentares;
- II – Investigar as possíveis correlações entre o teor médio de HgT no músculo e o teor médio de HgT no sangue, buscando uma nova metodologia para avaliar contaminação, que evite o sacrifício do animal;

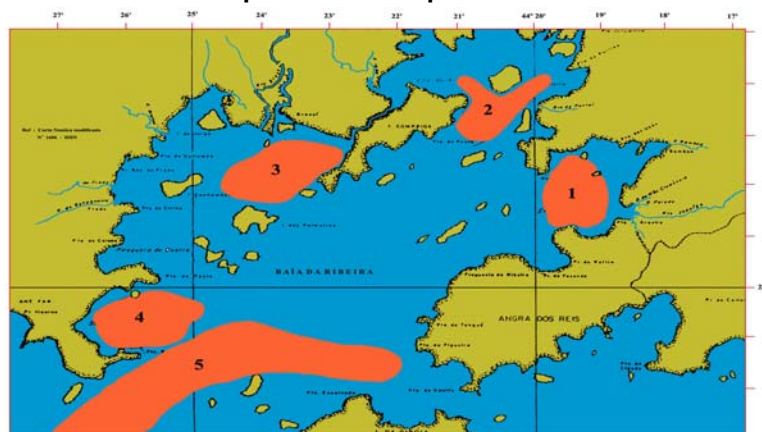
III – Avaliar efeitos genotóxicos através do teste de micronúcleo e núcleo bilobado em hemácias, comparando com resultados anteriores em espécimes de *Netuma barba* da Baía de Guanabara.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Coleta dos Peixes

A Baía da Ribeira está localizada entre as latitudes 22°55' e 23°02' S e longitudes 44°18' a 44°26' W, na porção oeste da Baía de Ilha Grande, no município de Angra dos Reis, conforme mostrado na Figura 1. Em 8 coletas de campo, realizadas entre os meses de Setembro de 2003 e Março de 2005 foram coletados 92 peixes de 5 espécies: 27 espécimes de *Genidens genidens*, 7 espécimes de *Cathorops spixii*, 20 espécimes de *Sciadeichtys luniscutis*, 12 espécimes de *Haemulon steindachneri* e 26 espécimes de *Micropogonias furnieri* provenientes de 5 estações (Figura 1). A estação 1 localiza-se na Enseada da Japuíba, a nordeste da Baía de Ribeira, possuindo um extenso manguezal; a estação 2 localiza-se na Enseada do Ariró e Imbu, a estação 3 está a oeste, na Enseada do Bracuí, próximo ao Rio Bracuí, onde se encontra o porto de Bracuí, e conta com a presença de manguezal; a estação 4, Saco Piraquara de Fora, a sudoeste da Baía da Ribeira e a estação 5, ao sul, no canal de entrada da baía, com profundidade média de 20m.

**Figura 1: Mapa da Baía da Ribeira, ilustrando as cinco estações onde foram realizados os arrastos para coleta de peixes de fundo.**



#### 3.2. Coleta do Sangue

As amostras foram retiradas por punção venosa caudal ou por punção cardíaca, utilizando-se seringas de 1 ou 3 mL contendo EDTA (anticoagulante). Após a punção, as amostras foram acondicionadas em eppendorfs e refrigeradas. Para cada amostra foram preparados 3 esfregaços em lâmina lisa com sangue ainda fresco.

#### 3.3. Análise de Hg Total

A metodologia para determinação de Hg total em peixes foi descrita em detalhes em Castilhos (2001) e será brevemente apresentada. Foram pesados aproximadamente 0,5 g de amostra em um balão volumétrico de 50 mL, sendo adicionados 2mL de  $\text{NHO}_3\text{-HClO}_4$  (1:1), 5mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 1mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Essa mistura foi aquecida em placa quente a 230° a 250°C por 20 minutos. Depois de resfriada, a solução foi avolumada para 50mL com água

destilada. Uma alíquota de 5mL desta amostra foi introduzida no Automatical Mercury Analyzer Hg 3500, que consiste em um espectrofotômetro de absorção atômica acoplado com um acessório de geração de vapor frio. Amostras certificadas (DORM 1) asseguraram acuracidade acima de 90% e a precisão aceita foi acima de 90%. Para as análises de mercúrio total nas hemácias e no plasma, o sangue foi centrifugado a uma rotação de 6000 rpm por 20 minutos, onde se verificou uma melhor separação plasma/hemácias.

### 3.4. Teste do Micronúcleo

Para o teste de micronúcleo e núcleo bilobado foram feitos esfregaços de sangue fresco em lâminas lisas durante as coletas. As lâminas foram fixadas em metanol e coradas em Giemsa para a visualização no microscópio óptico. Foram contadas 1000 células por amostra. As análises foram realizadas no Laboratório de Hematologia, da Faculdade de Veterinária – UFF.

### 3.5. Tratamento Estatístico dos Dados

Para a análise estatística dos dados alométricos e de HgT nas diferentes matrizes foi utilizado o programa SPSS. Foram investigadas correlações entre os dados utilizando o teste de Spearman. O nível de significância aceito no presente trabalho foi de  $p < 0,05$ .

Para a análise de eventos raros foi utilizado o teste estatístico para citogenética proposto por Pereira et al (1991). A fórmula utilizada para o teste está descrita abaixo:

$$(n_1/n)^{x_1} (n_2/n)^{x_2}$$

onde:

$n_1$  e  $n_2$  = número de células contadas em cada área

$n$  = número total de células contadas nas duas áreas ( $n_1 + n_2$ )

$x_1$  e  $x_2$  = número de eventos encontrados em cada área

## 4. Resultados e Discussões

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios encontrados para os parâmetros alométricos e concentrações de mercúrio no músculo e no sangue de todas as espécies estudadas.

Dentre as espécies estudadas, as maiores concentrações de mercúrio foram encontradas na espécie *H. steindachneri*, que apresentou concentração média ( $403,4 \pm 226,2$  ng/g) próxima ao limite estabelecido pela OMS (Organização Mundial de Saúde) para consumo de peixe (500 ng/g). Apesar de terem o mesmo hábito alimentar (carnívoro), as espécies *H. steindachneri* e *Micropogonias furnieri* apresentaram concentrações de HgT no músculo distintas. Tal diferença pode ser existir devido a: idade dos espécimes coletados, diferenças no metabolismo de cada espécie; e, presença de comportamento migratório. As espécies de bagres (*C. spixii*, *G. genidens* e *S. luniscutis*) apresentaram concentrações médias de HgT no músculo entre 100ng/g a 200ng/g. Todas as espécies de bagres estudadas apresentam o mesmo hábito alimentar (omnívoro).

**Tabela 1: Valores Médios e desvio padrão dos parâmetros alométricos e de Hg total no músculo (HgM), no sangue total (HgSt), nas hemácias (HgHe) e no plasma (HgPl) das espécies estudadas.**

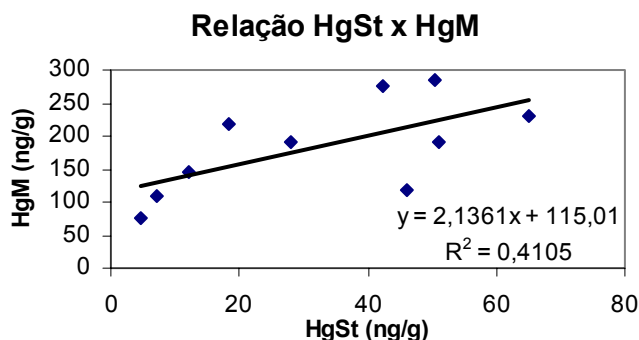
Espécies	Tamanho (mm)	Peso (g)	HgM (ng/g)	HgSt (ng/g)	HgHe (ng/g)	HgPl (ng/g)
<b><i>Catharops spixii</i></b>	181,2±87,9 (6)	92,7±74,8 (6)	124,8±37,1 (5)	22,4±9,1 (6)	75,5 (1)	-
Estação 1	265,0±35,4 (2)	175±56,6 (2)	131,6 (1)	26,3±13,7 (2)	-	-
Estação 2	221,0 (1)	100,0 (1)	88,2 (1)	31,0 (1)	75,5 (1)	-
Estação 3	112,0±61,0 (3)	35,3±25,7 (3)	134,8±43,6 (3)	16,8±3,8 (3)	-	-
<b><i>G. genidens</i></b>	161,6±63,3 (27)	46,7±62,0 (27)	106,0±111,9 (26)	24,4±17,1 (7)	46,2±30,1 (7)	14,8±9,8 (7)
Estação 1	127,7±42,1 (18)	14,2±12,1 (18)	54,8±29,0 (18)	19,5 (1)	29,0 (1)	31,5 (1)
Estação 2	212,5±46,0 (2)	85,0±63,6 (2)	63,0 (1)	14,2 (1)	-	-
Estação 3	221,7±22,5 (6)	92,3±26,8 (6)	222,2±139,1 (6)	22,0±18,2 (4)	42,4±30,6 (5)	11,4±7,7 (5)
Estação 4	310,0 (1)	282,0 (1)	374,3 (1)	49,3 (1)	82,5 (1)	15,5 (1)
<b><i>S. luniscutis</i></b>	244,5±58,0 (19)	179,7±104,6 (19)	177,0±75,4 (12)	34,9±17,7 (18)	93,2±87,9 (4)	11,3±7,4 (4)
Estação 1	282,8±57,9 (6)	245,7±161,0 (6)	160,0±110,5 (4)	40,0±22,4 (5)	220,8 (1)	5,9 (1)
Estação 2	245,8±15,1 (4)	119,3±66,9 (4)	149,1±41,1 (3)	18,2±10,2 (4)	35,5±11,3 (2)	8,6±2,4 (2)
Estação 3	218,3±59,0 (9)	162,6±36,5 (9)	207,4±59,9 (5)	39,6±13,9 (9)	81,0 (1)	22,0 (1)
<b><i>M. furnieri</i></b>	221,8±66,4 (26)	129,3±160,1 (26)	86,6±104,8 (25)	15,3 (1)	-	-
Estação 1	182,0±45,6 (10)	69,7±60,0 (10)	56,4±37,5 (10)	-	-	-
Estação 2	231,0 (1)	123,0 (1)	108,0 (1)	-	-	-
Estação 3	295,8±80,3 (6)	278,7±284,6 (6)	185,1±184,6 (6)	-	-	-
Estação 4	205,3±37,2 (6)	96,8±68,1 (6)	45,4±8,2 (6)	-	-	-
Estação 5	236,3±25,1 (3)	96,7±22,0 (3)	54,8±0,5 (2)	15,3 (1)	-	-
<b><i>H. steindachneri</i></b>	202,3±36,1 (12)	107,4±38,1 (12)	403,9±226,2 (10)	28,4±8,3 (2)	-	-
Estação 4	202,3±36,1 (12)	107,4±38,1 (12)	403,9±226,2 (10)	28,4±8,3 (2)	-	-

(n) = Número de espécimes coletados.

Não foi realizado teste estatístico para verificar diferenças entre os pontos de coleta, devido ao baixo número de espécimes coletados em algumas estações.

Foi realizado o teste de Spearman para verificar as possíveis correlações entre os dados alométricos, o HgT no sangue e no músculo. Para corvinas e cocorocas foram encontradas correlações positivas e significativas entre os dados alométricos e o HgT no músculo, seguindo a tendência do acúmulo do HgT com o aumento do tamanho e do peso. Porém, não foi encontrada nenhuma correlação entre HgT no sangue e HgT no músculo ou dados alométricos, provavelmente pelo baixo número de análises de sangue realizadas ( $n < 5$ ). Para a espécie de bagre *Catharops spixii* foram encontradas correlações positivas e significativas entre o HgT no sangue e os dados alométricos (0,83;  $p < 0,05$  e  $n = 6$ ). Para a espécie de bagre *Genidens genidens* foram encontradas correlações entre o HgT no músculo e o HgT nas hemácias ( $p < 0,0001$  e  $n = 7$ ) e HgT no músculo com dados alométricos. Para a espécie de bagre *Sciadeichthys luniscutis*, foram encontradas correlações entre dados alométricos e HgT no sangue e HgT no sangue com HgT no músculo ( $p < 0,05$  e  $n = 10$ ). A forte correlação positiva e significativa entre a concentração de HgT no músculo e a concentração de HgT no sangue abre a possibilidade da utilização do sangue de peixes como matriz para a avaliação de contaminação por mercúrio no músculo, o que evitaria o sacrifício dos exemplares coletados. O estudo de regressão linear com esses dois parâmetros está apresentado no Gráfico 1.

Gráfico 1: Relação entre HgT no músculo e HgT no sangue de *Sciadeichthys luniscutis*, Baía da Ribeira.



Assim, a partir da equação da reta apresentada no gráfico 1, possível estimar a concentração de HgT no músculo do peixe pela através da concentração do HgT no sangue.

Para verificação dos efeitos genotóxicos, foram realizados os teste de micronúcleo e do núcleo bilobado nos espécimes de bagre coletados na Baía da Ribeira para comparação com resultados obtidos em Rodrigues & Castilhos (2003) em outra espécie de bagre, *Netuma barba*. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2. Utilizando o teste estatístico para comparação de problemas em citogenética, foi verificado que tanto a freqüência de micronúcleo ( $p < 0,05$ ) quanto a de núcleo bilobado ( $p < 0,0001$ ) são estatisticamente diferentes nas duas áreas, sugerindo que os peixes da Baía de Guanabara apresentaram uma freqüência maior de efeitos citogenéticos por estarem expostos a diversos tipos de contaminantes, inclusive o mercúrio.

Tabela 2: Freqüência de micronúcleo e núcleo bilobado em bagres da família Ariidae de distintas áreas – Baía de Guanabara e Baía da Ribeira – e os níveis de mercúrio total em músculo e sangue dos mesmos.

Área/ ano	Células contadas	Micronúcleo	Núcleo Bilobado	HgM (ng/g)	HgSt (ng/g)
Baía de Guanabara 2003	11000	9	11	124,0±41,0 (13)	32,4±30,5 (13)
Baía da Ribeira 2004/2005	32000	19	11	191,7±96,5 (21)	31,1±17,4 (32)

## 5. Conclusões

Pode-se concluir que a Baía da Ribeira continua sendo uma área de referência para concentrações de mercúrio em peixes devido as baixas médias de HgT encontradas no músculo dos espécimes coletados, apesar dos níveis encontrados na espécie *H. steindachneri* serem próximos ao limite estabelecido pela OMS.

A correlação encontrada entre HgT no sangue e HgT no músculo na espécie *S. luniscutis* possibilitou a delimitação da equação da reta para que esta seja utilizada na determinação de HgT no músculo a partir do HgT no sangue.

Os bagres da Baía da Ribeira apresentaram uma freqüência significativamente menor de micronúcleos e núcleos bilobados do que os coletados na Baía de Guanabara, sugerindo que os peixes da Baía da Ribeira apresentam

uma frequência menor de efeitos citogenéticos e possivelmente estão menos expostos a diversos tipos de contaminantes, como o mercúrio.

## 6. Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Patrícia Maciel, MSc. Luiz César Cavalcanti Pereira da Silva e Dra. Nádia Almosny por todo auxílio, trabalho e hospitalidade no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Veterinária da UFF; ao Dr. José Vanderli Andreata e toda equipe do Laboratório de Ictiologia - Universidade Santa Úrsula (Mariana Contins, Michele Longo, Bruno Meurer, Bruno Absolon, Felipe Manzano, Dirceu Teixeira, Nilo, Natalie Freret); a Elizabeth, Sandra e Gaspar por toda paciência e preocupação com a geração dos nossos dados de Hg Total; ao Luiz Roberto Pedroso, por toda paciência, dicas, otimismo, brincadeiras e amizade; e, ao CNPq pela bolsa concedida.

## 7. Bibliografia

- ANDREATA, José V.; MEURER, Bruno C.; BAPTISTA, Maurício G.S.; MANZANO, Felipe V.; TEIXEIRA, Dirceu E.; LONGO, Michele M.; FRERET, Natalie V. (2002) Composição da assembléia de peixes da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.19 (4), p. 1139-1146.
- CABANA G, Tremblay A, KAFF J, Rasmussen JB. (1994) Pelagic food chain Structure in Ontario Lakes: A determinant of mercury levels in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Can J Fish Aquat Sc*, (51) 381-389.
- CARDOSO, André G. A, BOAVENTURA, Geraldo R., SILVA FILHO, Emmanoel V., BROAD, José (2001) Metal Distribution in Sediments from the Ribeira Bay, Rio de Janeiro-Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.12 nov/dez.
- CASTILHOS, Z.C; BIDONE, E. D.; HARTZ, S. M. (2001) Bioaccumulation of Mercury by Tucunaré (*Cichla ocellaris*) from Tapajós River Region, Brazilian Amazon: A Field Dose-Response Approach. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66:631-637.
- KEHRIG, H.A (1992) Estudo Comparativo dos Níveis de Concentração de Mercúrio Total em Corvinas (*Micropogonias furnieri*) de Quatro Estuários Brasileiros. Dissertação de Mestrado-PUC-RJ
- LACERDA, L.D; PFEIFFER, W.C.; FISZMAN, M. (1981) Níveis Naturais de Metais Pesados em Sedimentos Marinhos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis. *Ciência e Cultura*, 34(7): 921-924.
- LACERDA, L.D; SOUZA, C.M., PESTANA M.H. (1984) Geoquímica de Metais Pesados em Sedimentos não Contaminados no Estuário do Frade, Angra dos Reis.
- PEREIRA, C.A.B. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética In: RABELO-GAY, N. RODRIGUES, M.A. & MONTELEONE-NETO, R. (ed.) Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese.: SBG, 1991, pp. 113-21.
- RODRIGUES, A. P. C. & CASTILHOS, Z. C. (2003) Avaliação de Risco Ecológico em Ecossistemas Aquáticos Contaminados por Mercúrio. Estudo de caso: Ilha das Enxadas, Baía de Guanabara, RJ. JIC-CETEM.
- SANTOS, EDUARDO. (1982) Zoologia Brasileira – Nossos Peixes Marinhos. Volume 1. Ed. Villa Rica, Belo Horizonte, MG.
- SZPILMAN, M. Peixes Marinhos-Guia Prático de Identificação, 1995.
- WASSERMAN, J.C.; FREITAS-PINTO, A. A.P.; AMOUROUX, D. (1999) Mercury concentrations in Sediments Profiles of Degraded Tropical Coastal Environment. *Revista Environmental Technology*, (21)297-305.