

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ABORDAGEM METALÔMICA QUANTITATIVA DE MERCÚRIO EM PEIXES DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

JOÃO VITOR DE QUEIROZ

Dissertação apresentada como parte das exigências para
obtenção do Título de Mestre em Zootecnia pelo
Programa de Pós-graduação em Zootecnia da FMVZ –
UNESP Câmpus de Botucatu.

BOTUCATU – SP
Janeiro – 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ABORDAGEM METALÔMICA QUANTITATIVA DE MERCÚRIO EM PEIXES DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

JOÃO VITOR DE QUEIROZ
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

BOTUCATU – SP
Janeiro – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO
TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Q3a Queiroz, João Vitor de, 1989-
Abordagem metalômica quantitativa de mercúrio em peixes da região amazônica /
João Vitor de Queiroz.- Botucatu : [s.n.], 2015
70 f. : il., color., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
2015

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha
Inclui bibliografia

1. Metaloproteínas. 2. Mercúrio. 3. Amazônia - Aspectos ambientais. 4.
Proteômica. I. Padilha, Pedro de Magalhães. II. Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veteri-
nária e Zootecnia. III. Título.

AUXÍLIOS FINANCEIROS

Projeto regulamentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL e desenvolvido no âmbito do Programa P&D da Energia Sustentável do Brasil S.A.

P&D: 6631-0001/2012

Contrato Jirau 004/13



FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Processos: 2010/51332-5 e 2013/21297-1



CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Processo: FCT 270/11



CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Processo: 472388/2011-8



FUNDIBIO – Fundação do Instituto de Biociências



PROPG – Pró-Reitoria de Pós-Graduação



Dedico este trabalho aos meus pais Francisco e Regina. Aos meus irmãos Francisco e Pedro. Companheiros inseparáveis em todos os momentos de minha vida. Vocês são os grandes responsáveis pelo meu sucesso, luta e dedicação. Vocês merecem todo o meu respeito, carinho, amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado forças, coragem e saúde para buscar e realizar meus sonhos. Obrigado meu Deus por tudo!!! Aos meus pais, Francisco e Regina, por serem meus principais incentivadores, por me darem condições para que eu pudesse estudar e por me apoiarem em tudo. Aos meus irmãos Francisco e Pedro por estarem sempre comigo. Amo vocês!!! Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim. Vocês são meus alicerces verdadeiros, meus amigos e companheiros para qualquer hora ou lugar. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado a lugar algum! Aos meus professores que me incentivaram muito, me inspiraram, me fizeram acreditar mais em mim. Agradeço!!! A todos meus grandes amigos que conquistei durante minha vida, principalmente Jundiá (Eric), Xana (Mônica), Xitaki (Erika), Camilona (Camila) e Joseph (José) que considero meus irmãos. A companhia de vocês tornou meus dias melhores e mais bonitos!!! À Laís, uma pessoa muito especial que me fez uma pessoa melhor. Ao meu orientador Pedro de Magalhães Padilha pela dedicação, paciência, bondade, amizade, respeito. Por ter confiado em mim e no meu potencial. Agradeço a oportunidade. Pessoa que aprendi a admirar muito e me espelhar. Obrigado Prof. Pedro! A meus colegas e amigos de laboratório: Cilene, Bruna, Paula Lima, Paula Martin, Vânia, pela companhia, ajuda e por fazer dos meus dias um grande aprendizado. Obrigado! A UNESP, minha Universidade, minha casa que amo. Agradeço por ter me acolhido e por ter me dado recursos para o meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTO

Um agradecimento especial vai para um ser que infelizmente não consegue ler nem escrever mas que significa muito pra mim e que sabe o quanto eu a amo. A minha cadelinha e fiel escudeira, Sindy. A melhor coisa que aconteceu na minha vida. Sempre me proporcionando momento de alegrias e companheirismo. Como eu te amo Sindoca pipoca! Obrigado por ser assim, desse jeitinho que você é!

“Cães não precisam de carros luxuosos, casas grandes ou de roupas chiques. Água e alimento já são o suficiente. Um cachorro não liga se você é rico ou pobre. Esperto ou não. Inteligente ou não. Entregue seu coração e ele dará o dele. De quantas pessoas podemos dizer o mesmo? Quantas pessoas fazem você se sentir raro, puro e especial? Quantas pessoas nos fazer sentir extraordinários?”

John Grogan

Sumário

CAPÍTULO I.....	11
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	12
Justificativa da Proposta de Trabalho.....	12
Revisão Bibliográfica.....	16
Espécies estudadas.....	16
<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	16
<i>Pimelodidae</i>	16
<i>Cichlidae</i>	19
<i>Cichla spp</i>	21
Problemática do Mercúrio.....	22
A Ameaça.....	22
O Ciclo.....	22
Contaminação das Águas Amazônicas.....	24
Metilação do Hg.....	25
Hg e a Saúde.....	26
Biomagnificação na Cadeia Alimentar.....	29
Proteômica.....	30
Metalômica.....	31
Referências Bibliográficas.....	33
CAPÍTULO II.....	39
ESTRATÉGIAS METALÔMICAS PARA FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE TUCUNARÉ (<i>Cichla spp.</i>) E FILHOTE (<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>) DA REGIÃO AMAZÔNICA.....	39
Resumo.....	41
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Parte Experimental.....	44
Equipamentos e Acessórios.....	44
Reagentes, Soluções e Limpeza de Vidrarias.....	45
Coleta das Amostras.....	46
Preparação das Amostras para Eletroforese 2D-Page.....	46
Extração das Proteínas.....	46
Precipitação Fracionada e Ressolubilização das Proteínas.....	47
Determinação de Proteína Total.....	48
Corridas Eletroforéticas.....	48
Determinação de Hg Total.....	49
Digestão Triptica dos Spots Proteicos para Caracterização por ESI-MS/MS.....	50
Remoção do Corante.....	51
Caracterização das Proteínas por ESI MS/MS.....	51
Resultados e Discussão.....	51

Determinação da Concentração e Proteína Total.....	51
Fracionamento das Proteínas por 2D-Page.....	52
Avaliação Quantitativa de Hg.....	53
Caracterização dos Spots Proteicos por ESI-MS/MS.....	55
Conclusões.....	58
CAPÍTULO III.....	59
Implicações.....	60
Referências Bibliográficas.....	61
Figura 1.....	64
Figura 2.....	65
Figura 3.....	66
Tabela 1.....	67
Tabela 2.....	68
Tabela 3.....	69
Tabela 4.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%Vol – volume normalizado de um spot no gel
1D-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em uma dimensão
2D-PAGE – eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
AAS – espectrometria de absorção atômica
ACET – acetileno
AHE – Aproveitamento Hidrelétrico
BG – background
CHAPS - 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato
DTT - 1,4-ditiotreitol
ESI MS MS – espectrometria de massas em sequência com ionização por *elctrospray*
FAAS – espectrometria de absorção atômica com atomização por chama
GFAAS – espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
Hg – mercúrio
IEF - Focalização Isoelétrica
kDa - KiloDalton ($1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$)
kV – quilovolt
mA – miliampere
mM – milimolar
Mm - Massa Molar
Pd – paládio
pH – potencial hidrogeniônico
pI - Ponto Isoelétrico
ppb – parte por bilhão
rpm – rotação por minuto
SDS – dodecil-sulfato de sódio
spot - Banda 2D de proteínas
TEMED - N,N',N,N'-tetrametiletilenodiamina
TM – tecido muscular
V – volt
v – volume
Vh – volt-hora
W – watt

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Justificativa da Proposta de Trabalho

Na bacia amazônica e em seus rios vivem aproximadamente 3 mil espécies diferentes de peixes. Somente no rio Madeira, que nasce nos Andes bolivianos e percorre mais de três mil quilômetros até a foz do rio Amazonas, vivem cerca de mil espécies. Essa riqueza faz do Madeira o rio, entre os já estudados, com a maior biodiversidade de peixes do planeta. O rio apresenta uma vazão de mais de 40 milhões de litros de água por segundo no período chuvoso. [1]

Um dos aspectos mais marcantes da bacia amazônica é a elevada riqueza da ictiofauna, que inclui cerca de 3 mil espécies de variados tamanhos, hábitos, formas e cores. Quanto ao tamanho, há desde espécies pequenas, como as piabas (a maioria pertencente à família *Characidae*), até os maiores, como o pirarucu e a piraíba ou filhote. A maioria dos peixes siluriformes (peixes caracterizados pelo corpo sem escamas e revestido por pele nua ou placas ósseas), bagre ou peixe-liso é formado por espécies que empreendem migrações longas através do canal principal do sistema Solimões-Amazonas. Os principais representantes desse grupo são o surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*), caparari (*P. tigrinum*), dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), piramutaba (*B. vaillantii*) e piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*). [1]

A bacia do rio Madeira é a única que ocupa uma extensão duas vezes superior a qualquer outra bacia na região amazônica, cobrindo uma área de 1.380.000 km², distribuída em territórios do Brasil, da Bolívia e do Peru. A complexidade dessa bacia congrega corpos d'água de origens distintas: os rios Mamoré e Beni, que drenam os Andes bolivianos, e o rio Madre de Dios, que drena os Andes peruanos e deságua no rio Beni; o rio Guaporé, cujos formadores se localizam nas terras antigas do escudo central brasileiro e; a parte baixa do rio Madeira, que percorre as terras rebaixadas da bacia sedimentar, onde se concentram as várzeas do rio Madeira. [1]

O período de chuvas inicia-se normalmente no mês de outubro, intensificando-se nos meses de novembro e dezembro. O mesmo se estende até o mês de maio, podendo prolongar-se eventualmente até o mês de junho. O período mais chuvoso concentra-se entre os meses de janeiro a março. Este período é conhecido como inverno amazônico, caracterizado por ser quente e chuvoso [1]. A vazante do rio se inicia entre o final do mês

de maio ou início de junho e o período de baixa vazão estende-se até o mês de novembro. A amplitude média da flutuação do nível do rio é de 10,8 a 12,4 m, mas entre secas e cheias extremas pode oscilar entre 15,4 e 21,8 m, com valores de vazão entre 2.322 e 47.236 m³.s⁻¹ calculadas a partir do histórico das cotas medidas no Porto do Cai n'Água, em Porto Velho, entre 1967 e 2005. [2,17]

A formação de grandes represas autentica um papel relevante no desenvolvimento econômico e social de um país. Nos dias atuais, cerca de metade dos rios de todo o mundo apresentam ao menos uma grande represa e aproximadamente um terço dos países dependem de usinas hidrelétricas para gerar mais da metade da sua energia. Estima-se que existam cerca de 45.000 grandes represas em todo o mundo, sendo que as maiores, são a do Amazonas, do Congo e do Mekong. O Brasil já apresenta mais de 500 hidrelétricas espalhadas por todo o país, o que pode parecer muito em números, mas que na verdade é equivalente a apenas 24% de todo o potencial hidroenergético do país. Todavia, mudanças bruscas no ecossistema podem influenciar na disseminação de doenças não endêmicas até o momento, e causar efeitos adversos na saúde das comunidades locais devido a fragmentação social causada pela implantação das grandes represas. [3, 4].

A implantação de complexos hidrelétricos na bacia do rio Madeira, tem motivado diversos debates científicos sobre a biodisponibilidade e remobilização de espécies de mercúrio nos reservatórios amazônicos. Estudos realizados em diversos reservatórios do Brasil, interviram que os compostos de mercúrio associados ao material particulado em suspensão, plâncton e/ou sedimentos, apresentam-se preferivelmente na sua forma inorgânica. Essa forma ocorre principalmente no início dos reservatórios, ou seja, a montante, enquanto que a forma orgânica vai aumentando sua porcentagem de forma crescente, atingindo valores maiores próximos às barragens nas áreas mais profundas [3].

Devido ao fato de que a poluição química e biológica do rio Madeira se tornou um dos principais problemas socioambientais daquela região, o rio acabou se tornando um laboratório natural de pesquisas, cujo estudo poderá se tornar uma referência para a Amazônia brasileira. Por essa região ter sido vítima de exploração da garimpagem do ouro na década de 80 até meados da década de 90, a contaminação pelo mercúrio que marcou a região volta a ser discutida devido aos passivos ambientais deixados resultantes da atividade de garimpagem de ouro e principalmente pelo potencial de contaminação que

estes passivos representam para a sociedade. Com a construção e implantação do Complexo Hidrelétrico Jirau na bacia do rio Madeira, serão feitas alterações ambientais, o que poderá alterar a dinâmica do mercúrio nessa região ambiental [3,5]. Devido à garimpagem do ouro na Amazônia, foram atribuídos os altos teores de mercúrio encontrados em peixes, sedimentos e solos por conta desse tipo de exploração. No entanto, estudos recentes mostraram que foram encontradas altas concentrações de mercúrio em compartimentos bióticos e abióticos sem fontes antrópicas, ou seja, em regiões que não foram exploradas pelo garimpo do ouro ou qualquer outro tipo de exploração feita pelo homem. Portanto podemos concluir que independente da fonte de contaminação, a elucidação dos mecanismos de toxicidade do mercúrio são de fundamental importância para o desenvolvimento sócio-ambiental da região amazônica [5,6]. Sendo assim, o desenvolvimento de biomarcadores de proteínas relacionadas ao mercúrio, poderão indicar com antecedência os possíveis riscos de contaminação do pescado e à exposição humana, devido às mudanças ocorridas na qualidade da água nos reservatórios, podendo evitar que a população ribeirinha seja influenciada direta ou indiretamente pelos empreendimentos hidrelétricos na região amazônica. “A metaloproteômica – área científica proposta recentemente – integra estudos analíticos e bioquímicos, contemplando o fracionamento e a caracterização de proteínas associadas a metais. Esta nova área do conhecimento científico tem contribuído para o esclarecimento dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos” [7,8]. A identificação de biomarcadores de toxicidade do mercúrio utilizando a metaloproteômica está associada às proteínas transportadoras desse elemento que possam apresentar aumento ou diminuição de expressão, frente às alterações das características limnológicas e disponibilidades das espécies mercuriais no ambiente. Dessa forma, informações importantes poderão ser obtidas em relação à elucidação dos mecanismos de absorção desse metal potencialmente tóxico pela biota aquática e pelos seres humanos. A construção e implementação do Aproveitamento Hidrelétrico Jirau (AHE JIRAU) na bacia do rio Madeira poderá alterar a dinâmica do mercúrio nesse compartimento ambiental devido a alteração ambiental do local onde o empreendimento foi instalado [3,5].

Trabalhos relataram que na última década, as concentrações de mercúrio total nas águas superficiais dos rios amazônicos (Tapajós, Amazonas, Negro e Madeira) variou entre 02 e 12 ng/L e o teor de mercúrio total no sedimento nestes mesmos rios permaneceu entre 100 e 400 µg/kg. Estas concentrações de mercúrio estão dentro dos níveis considerados naturais dos rios amazônicos. No entanto, possíveis transformações e processos de remobilização de espécies mercuriais até então indisponíveis, podem alterar forma química dessas espécies, tornando-as lábeis para o meio aquático [4,5].

Com base no exposto, a presente dissertação foi dividida em três capítulos: **Capítulo 1** – apresenta a justificativa da proposta de trabalho com uma breve descrição da área de estudo e espécies avaliadas, bem como uma introdução sobre a importância das represas de dos complexos hidrelétricos. E por fim, a garimpagem do ouro naquela região e a problemática do mercúrio, tais como o ciclo, a contaminação das águas amazônicas, metilação do mercúrio, e os diversos problemas causados pelo mercúrio ao ser humano são discutidos. **Capítulo 2** – apresenta os resultados obtidos no estudo metaloproteômico quantitativo utilizando 2D PAGE assistida por precipitação fracionada, como componente de seletividade, no processo de fracionamento do mercúrio das amostras de tecido muscular de tucunaré e filhote. GFAAS foi utilizada como componente de sensibilidade na determinação quantitativa de mercúrio nos spots obtidos no fracionamento das proteínas. E finalmente, as proteínas dos spots proteicos nos quais foi determinada a presença de mercúrio foram caracterizadas por espectrometria de massas por ionização com eletrospray em sequência (ESI- MS/MS), técnica utilizada como componente estrutural. Os resultados obtidos nesse capítulo serão submetidos para publicação no periódico *journal of the brazilian chemistry society*. **Capítulo 3** – apresenta as implicações do trabalho.

Revisão Bibliográfica

Espécies estudadas

Duas espécies de peixes foram escolhidas para o estudo metaloproteômico do mercúrio, considerando seus níveis tróficos e, também por se tratarem de espécies bastante consumidas pela população ribeirinha. As espécies de peixes são: filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) e tucunaré (*Cichla spp.*).

Brachyplatystoma filamentosum

Pimelodidae

Por muito tempo, a família *Pimelodidae* abrigou um conjunto de espécies sem uma sinapomorfia conhecida que a sustentasse. Esse grupo incluía as espécies atualmente alocadas em *Heptapteridae* e *Pseudopimelodidae*, as quais hoje representam grupos reconhecidamente monofiléticos e distintos dos *Pimelodidae* sensu stricto. *Pimelodidae* sensu stricto é considerado atualmente como um grupo monofilético com base no seguinte conjunto de sinapomorfias: (1) organização dendrítica dos canais do sistema da linha-lateral da região da cabeça, (2) côndilo palatino do etmoide lateral alargado e (3) uma união sutural entre os centros da 5ª e 6ª vértebras. Posteriormente, uma sinapomorfia adicional que corrobora o monofiletismo de *Pimelodidae*: a presença de um processo dorso-lateral bifurcado no pré-maxilar [9].

Na sua configuração atual, *Pimelodidae* compreende um conjunto de 83 espécies endêmicas da região Neotropical, onde a maior diversidade de formas conhecidas ocorre nas bacias dos rios Amazonas, Paraná, Orinoco e nos grandes rios das Guianas. Algumas espécies apresentam ampla distribuição geográfica, enquanto outras são endêmicas de bacias como as dos rios Magdalena, Maracaibo, de alguns rios do sudeste do Brasil, do noroeste da Colômbia e leste do Panamá [9].

Algumas espécies de *pimelodídeos* podem atingir tamanhos muito grandes. Entre essas, as espécies de *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma* figuram entre os peixes de água doce mais importantes na pesca comercial e de subsistência na América do Sul [10]. Morfologicamente, os *pimelodídeos* representam um modelo quase arquetípico de um

bagre: apresentam corpo nu (sem placas ósseas externas), com uma nadadeira adiposa relativamente grande e três pares de barbilhões longos (um par maxilar e dois mentonianos). O colorido do corpo pode variar de cinza uniforme até padrões bastante elaborados de listras, pintas e manchas escuras e claras. Do ponto de vista biológico e ecológico, a maior parte dos pimelodídeos é composta por peixes de hábitos carnívoros, e algumas espécies de grandes bagres representam predadores de topo de cadeia alimentar. Algumas espécies consomem frutos (*Pimelodus blochii* e *Phractocephalus hemioliopterus*), enquanto outras tendem à onivoria. As espécies de *pimelodus* podem formar grandes cardumes em certas épocas do ano, e muitos *pimelodídeos* apresentam estratégia reprodutiva sazonal com desova durante a fase de enchente dos rios [10].

A bacia do rio Madeira tem uma grande importância para os peixes dessa família, pois serve como rota migratória para a reprodução dos chamados “grandes bagres”, que incluem espécies dos gêneros *Brachyplatystoma*, *Pseudoplatystoma*, *Zungaro* e *Platynemichthys*, entre outros. Além disso, as corredeiras do rio Madeira foram utilizadas historicamente como local de pesca desses grandes bagres, que movimentou uma intensa atividade comercial na região da Cachoeira do Teotônio em Rondônia. Ainda, essa cachoeira constitui a localidade-tipo de uma espécie de bagre de grande porte, *Brachyplatystoma tigrinum* (descrita originalmente como *Merodontotus tigrinus*). Mais recentemente, e surpreendentemente, outra espécie de grande bagre foi descrita para os rios amazônicos, *Brachyplatystoma capapretum*, a qual também ocorre no rio Madeira e havia sido equivocadamente identificada até então como *B. filamentosum* [9].

Para o rio Madeira, no trecho que inclui a foz do rio Mamoré até a foz do rio Madeira, são conhecidas 49 espécies de *Pimelodidae*. Isso representa mais de 80% das espécies de *pimelodídeos* conhecidas para a Amazônia, o que evidencia a importância do rio Madeira como representação da ictiofauna regional. Dessas espécies, pelo menos sete ainda não foram descritas taxonomicamente [11].

A piraíba conhecida também como filhote, bagre-branco ou piratinga é o bagre amazônico que atinge maior tamanho, alcançando em torno de 2,5 m e 300 kg. O peixe pertencente à família *Pimelodidae* (ordem Siluriforme) apresenta coloração uniforme, sendo cinza no dorso e claro no ventre; faixa de dentes do pré-maxilar com uma faixa de dentes maiores e depressíveis na sua porção posterior; barbilhões roliços e estreitos;

nadadeiras, adiposa e anal, com base aproximadamente de mesmo tamanho; nadadeira caudal com lobos arredondados (figura 3). Geralmente o nome filhote é aplicado a exemplares de menor porte, até 1,5 m de comprimento padrão e 50 kg, e piraíba, a exemplares maiores. Ocorre em quase toda a bacia amazônica e a captura é realizada normalmente no canal ou em áreas de cachoeiras, com uso de redes de emalhe, espinhéis e linhada [11].

Além da ausência de escama, suas principais características são: ampla abertura das brânquias (que se estende além da base das nadadeiras peitorais) e a presença de três pares de barbilhões tácteis, sendo um par na maxila superior e dois na mandíbula [11].

Pode ser encontrada nas bacias do Amazonas e Orinoco, grandes rios das Guianas e Nordeste do Brasil. Para coleta, usam-se rede de espera, arrasto bentônico e espinhel [9].

Essa é a maior espécie de Siluriformes Neotropical, mas exemplares de grande porte já são raros na maior parte de sua área de distribuição, em função da sobrepesca. Tem a fama de engolir pessoas que se arriscam a nadar nos grandes rios amazônicos, mas não há casos confirmados de ataques a seres humanos. As piraíbas jovens são conhecidas regionalmente como “filhotes”, e apresentam um filamento no lobo superior da cauda que pode ser várias vezes maior do que o tamanho do corpo em indivíduos pequenos, diminuindo essa proporção à medida que o peixe cresce.



Figura 3: *Brachyplatystoma filamentosum* (peixe popularmente conhecido por “Filhote”)

Fonte: Adaptado de Queiroz et al., 2013

Cichlidae

Cichlidae Bonaparte, 1840 é um clado monofilético que inclui aproximadamente 1.600 espécies válidas [12], distribuídas na África, Américas do Sul, Central e do Norte (México e sul do Texas), Índia, Irã, Israel, Madagascar, Síria e Sri Lanka. Os ciclídeos neotropicais incluem mais de 406 espécies válidas, formando o maior grupo “não-Otophysi” de peixes de água doce da América do Sul. No Brasil, os ciclídeos são conhecidos como acará ou cará, caratinga, jacundá, joaninha e tucunaré, entre outros nomes populares. Eles podem ser facilmente identificados por uma combinação de caracteres externos, tais como: uma única narina de cada lado da cabeça; linha lateral normalmente dividida em um ramo anterior mais dorsal e um ramo posterior médio-lateral; e presença de espinhos nos primeiros raios das nadadeiras dorsal, anal e pélvica [12,13].

Estudos sobre as relações filogenéticas de *Cichlidae* têm sido realizados nos últimos 30 anos utilizando caracteres morfológicos e, mais recentemente, dados moleculares. Por um lado, o monofiletismo da família foi definido através das análises cladísticas, definiu sinapomorfias relacionadas aos arcos branquiais. Autores subsequentes definiram outras sinapomorfias relacionadas à musculatura, trato digestório, sistema sensorial e esqueleto com análises moleculares, associando caracteres morfológicos com moleculares, corroboraram o monofiletismo da família. Apesar de ter incluído neste clado o gênero africano *Heterochromis Regan*, reconheceu uma “dicotomia” entre os ciclídeos do “Velho Mundo” e do “Novo Mundo”. Posteriormente, o monofiletismo deste grupo neotropical foi novamente corroborado e as relações filogenéticas entre seus subgrupos têm sido elucidadas principalmente por meio de dados moleculares ou combinação de dados morfológicos e moleculares [14].

No Brasil são conhecidas aproximadamente 250 espécies, sendo que aproximadamente 60% ocorrem na bacia amazônica. Os ciclídeos brasileiros compreendem desde espécies de pequeno porte, com 2,5 – 3,0 cm de comprimento padrão, até espécies de grande porte como os tucunarés (*Cichla spp.*), que chegam a 75 cm. Os ciclídeos brasileiros habitam os mais variados ambientes: igarapés de terra firme, várzeas e igapós, a calha principal dos rios e lagos. Algumas formas estão adaptadas a ambientes reofílicos, vivendo preferencialmente em corredeiras e próximas a cachoeiras, como as espécies de *Retroculus*, e algumas de *Crenicichla*; outras vivem em ambientes fortemente

lênticos, como as espécies de *Symphysodon*, *Pterophyllum Heckel*, *Chaetobranchus Heckel* e *Chaetobranchopsis Steindachner* [9].

Existe uma grande variedade de hábitos alimentares dentro dos ciclídeos, sendo encontradas espécies herbívoras, planctívoras, moluscívoras, invertívoras e piscívoras, embora aparentemente a maioria das espécies seja carnívora oportunista. Muitas espécies de ciclídeos apresentam dimorfismo sexual, que pode incluir variações no padrão de colorido, prolongamento de raios das nadadeiras dorsal e anal e a presença de uma gibosidade na região pós-occipital em indivíduos machos adultos sexualmente maduros. Além disso, todas as espécies possuem algum tipo de cuidado com a prole, uni ou biparental, que pode envolver a defesa do ninho, o carregamento dos ovos e/ou alevinos na boca, e até a produção de um tipo especial de muco para alimentação e proteção dos filhotes no acará-disco (*Symphysodon aequifasciatus Pellegrin*) [11].

No mercado de peixes ornamentais, os ciclídeos são altamente apreciados por conta da diversidade de formas e de colorido e pela complexidade comportamental. Alguns peixes neotropicais, como os dos gêneros *Apistogramma*, *Astronotus*, *Cichlasoma*, *Laetacara*, *Mikrogeophagus*, *Pterophyllum* e *Symphysodon*, são amplamente cultivados, enquanto alguns outros despertam interesse dos aquaristas mais experientes, por conta da dificuldade da manutenção e reprodução em cativeiro, como por exemplo, algumas espécies de *Crenicichla* e *Teleocichla*. O tucunaré (*Cichla spp.*) é o ciclídeo de maior destaque na pesca esportiva e comercial, porém os mercados pesqueiros regionais e a pesca de subsistência abrangem outros peixes, como o acaratinga (*Geophagus spp.*), acará-prata (*Chaetobranchus semifasciatus*), acará-bicudo (*Satanoperca spp.*) e acará-açu (*Astronotus spp.*) [1].

As primeiras espécies de *Cichlidae* do rio Madeira foram formalmente descritas pelo austríaco Johann Jacob Heckel em 1840, a partir do vasto material reunido pelo também austríaco Johann von Natterer, que veio na missão Austríaca e realizou coletas no Brasil de 1817 a 1835 [1].

Cichla spp.

O tucunaré é um peixe de água doce com distribuição na Amazônia e nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil. Esse peixe habita açudes, represas e rios. É um peixe carnívoro, alimentando-se principalmente de peixes e camarões. Persegue a presa, ou seja, após iniciar o ataque, não desiste até conseguir capturá-la. Formam casais e se reproduzem em ambientes lênticos, onde constroem ninhos e cuidam da prole. O tucunaré é um peixe de escamas, com corpo alongado e um pouco comprimido. Sua coloração é amarelada, com manchas pretas e verticais distribuídas regularmente pelo corpo. Todos os tucunarés apresentam uma mancha redonda (ocelo) no pedúnculo caudal (figura 4). É bastante rápido, agressivo, forte e muito sedentário (não realizando migrações). Com hábitos diurnos, pode chegar a 30 cm ou mais de 1 m de comprimento total [14].



Figura 4: *Cichla spp.* (peixe popularmente conhecido por “Tucunaré”)

Fonte: Adaptado de Queiroz et al., 2013

Problemática do Mercúrio

A Ameaça

O mercúrio (Hg) e todos os seus compostos são potencialmente tóxicos não apenas ao ser humano, mas também para toda a vida selvagem e ecossistema. Grande quantidade desse metal torna-se fatal para o homem, no entanto, doses consideradas baixas podem também causar repercussões adversas graves tanto no desenvolvimento neurológico, quanto imunológico, cardiovascular e reprodutivo. Na natureza, o Hg desacelera os processos microbiológicos no solo e no meio ambiente, esse elemento pode se transformar em metilmercúrio (MeHg), sua forma mais tóxica e prejudicial ao ser humano. O MeHg tem a capacidade de atravessar a barreira placentária, tendo predisposição em se concentrar no cérebro, inibindo assim o desenvolvimento cerebral do feto. Assim, a preocupação principalmente com gestantes, lactantes e crianças [15].

O Ciclo

O Hg é o único metal conhecido que se apresenta no estado líquido em temperatura ambiente e a 0°C, é inodoro, e além disso, o único elemento (com exceção dos gases nobres) cujo vapor é monoatômico em temperatura ambiente (25°C). Atualmente novas metodologias e técnicas têm se tornado disponíveis nos estudos ambientais, o que vem causando um maior entendimento por parte dos pesquisadores sobre esse elemento em sistemas naturais. O Hg é um elemento que pode existir em um grande número de formas químicas e com diferentes propriedades. A conversão entre essas diferentes formas proporciona a base para o modelo de distribuição em ciclos locais e globais e, seu enriquecimento biológico nos organismos. Os grupos mais importantes são: Hg elementar, as espécies de Hg inorgânico e orgânico. Processos naturais podem contribuir para emissões de Hg, tais como ressuspensão de partículas do solo através dos ventos, emanções vulcânicas, queimadas e através do solo e águas superficiais. As mudanças climáticas também pode disponibilizar o Hg contido em rochas, entretanto, a atividade humana tem contribuído muito para o aumento dos níveis globais de Hg, situação que é

extremamente preocupante. Todavia, mesmo o mecanismo de deposição do Hg através da atmosfera seja de grande importância e algumas vezes responsável pela contaminação em regiões remotas e distantes de indústrias, deve-se levar em consideração o ciclo biogeoquímico do Hg em solos e ambientes aquáticos. O Hg liberado na atmosfera por fontes naturais ou antrópicas na forma de Hg^0 sofre oxidação na interface sólido-líquido (neblina, gotículas de chuva) e por meio de reações mediadas pelo ozônio e raios ultravioletas torna-se Hg^{2+} . Este retorna ao ambiente aquático e terrestre carregado pela água da chuva ou adsorvido a pequenas partículas. O cátion mercúrio também pode se originar do rompimento da ligação carbono-mercúrio de compostos organomercuriais, por meio de processos químicos ou biológicos. No ambiente aquático, o Hg^{2+} é adsorvido preferencialmente na superfície dos sedimentos, ácidos húmicos, material particulado e argilas por processos de co-precipitação e interações de superfície, podendo formar grande quantidade de complexos e de quelantes com o material orgânico. Nas camadas superiores do sedimento, que são biologicamente ativas, o Hg^{2+} é, em parte, metilado por bactérias, incluindo as sulfato redutoras, transformando-se em metilmercúrio e depois a etilmercúrio na interface água-sedimento e também, no perifiton das macrófitas aquáticas. O MeHg é rapidamente absorvido pelos organismos marinhos e desta forma será bioacumulado e biomagnificado ao longo da cadeia trófica. Logo, os organismos de topo de cadeia apresentarão as maiores concentrações de Hg total e MeHg. Em menor extensão, o MeHg é também demetilado a Hg^{2+} e posteriormente reduzido a Hg^0 , retornando a atmosfera. Na Figura 5 estão ilustradas as diferentes origens do Hg [16,17].

Como resultado de emissões antrópicas, a taxa de deposição atmosférica de Hg é aproximadamente três vezes maior do que no tempo pré-industrial e tem aumentado nas proximidades das regiões industrializadas. Companhias termoeletricas movidas a carvão, indústrias de processamento de metais, de incineração de lixo, lâmpadas fluorescentes, produção de baterias, de cloro, indústria de mineração e esgotos e outros resíduos são as principais fontes de contaminação de Hg causadas pelo próprio homem. Dadas as características alarmantes do quadro descrito, na maioria dos países, as emissões de Hg de origem antrópica tiveram uma queda significativa em virtude do controle mais rígido exercido pelos órgãos governamentais, embora ainda, verifiquem-se concentrações elevadas deste elemento em muitas partes do mundo. Algumas são principalmente devidas

a fontes locais, notadamente à extração de ouro em pequena escala na América do Sul, África e Ásia. Mas como poluente “transfronteiriço” que é, o Hg pode igualmente ser transportado a nível global para regiões distantes da sua fonte. Isso significa que alguma poluição de caráter local, vista à curto prazo, poderá se juntar à reserva global a longo prazo. Tal fato teve também como resultado, a contaminação de regiões com poucas ou nenhuma fontes de Hg, como o Ártico [18].

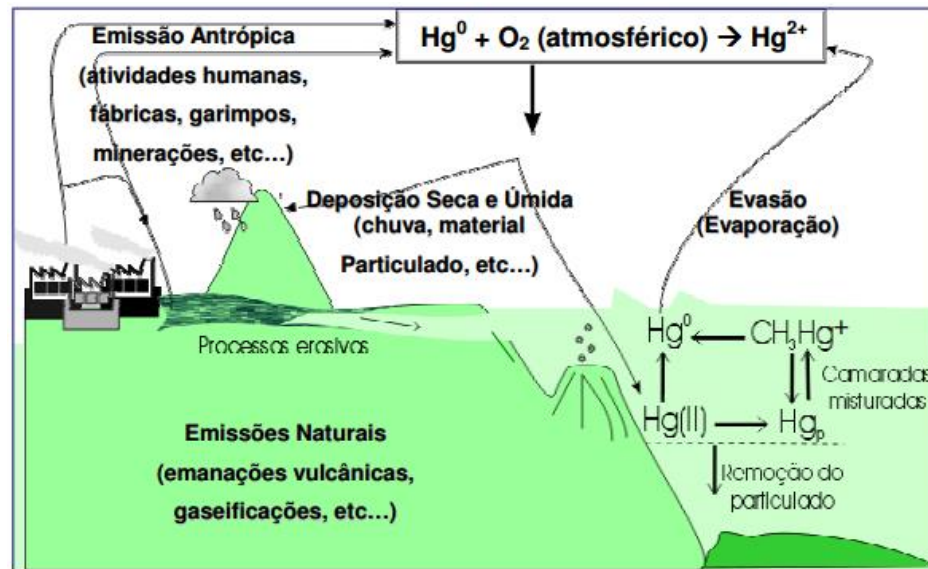


Figura 5: Origem do Hg (adaptado de Azevedo, 2003). ■

No Brasil, a extração de ouro, entre outras, é uma grande fonte de contaminação, principalmente nas regiões Amazônica e Centro-Oeste, em que o metal é extraído do minério pela amalgamação com Hg [18].

Contaminação das Águas Amazônicas

A Amazônia foi marcada na década de 80 até meados da década de 90 pela intensa atividade garimpeira, o que causou grande contaminação pelo mercúrio. Estima-se que a emissão anual de Hg na bacia amazônica naquela época tenha atingido a impressionante marca de 200 toneladas, sendo o Brasil, a Bolívia, a Venezuela, a Guiana e a Colômbia os maiores emissores. A bacia superior do rio Madeira foi a segunda mais importante região produtora de ouro de garimpo na Amazônia e essa atividade apresentou o fator de emissão

médio de Hg de aproximadamente 1,3 kg de Hg para 1 kg de ouro produzido nesta bacia. A emissão total do mercúrio é compreendida em cerca de 35-45% na forma líquida (metálica) liberada diretamente para os rios, solos e drenagens nas áreas de garimpo, e cerca de 55-65% na forma volátil (vapor) emitido para a atmosfera durante a queima da amálgama de ouro-mercúrio (AuHg), quando o ouro é purificado nas casas compradoras. Estas emissões resultam em concentrações extremamente elevadas tanto nas regiões garimpeiras quanto nas proximidades dos grandes centros, onde se localizavam as casas compradoras [5].

Para uma avaliação da contaminação dos recursos de uma região, como a bacia do rio Madeira e sua população, é preciso não só determinações do mercúrio nos compartimentos ambientais, mas também se faz necessário o conhecimento biogeoquímico de seus ecossistemas, já que são os processos biogeoquímicos que controlam a biodisponibilidade deste metal. As mudanças no uso da terra pela agropecuária, o desmatamento, as queimadas, a dragagem anual que ocorre em alguns pontos da Hidrovia do rio Madeira, podem acelerar processos de remobilização do mercúrio presente em solos e sedimentos fluviais. Além disso, as características particulares de ambientes amazônicos – como condições anóxicas e acúmulo de matéria orgânica dissolvida – podem ainda criar condições ideais para a metilação do mercúrio, obtendo metilmercúrio – forma química mais tóxica desse elemento [5].

Observa-se que nos últimos anos as concentrações de mercúrio têm se mantido dentro dos níveis naturais nos rios amazônicos, no entanto, sabe-se que essas transformações e os processos de remobilização das espécies mercuriais até então indisponíveis, podem alterar sua forma química, tornando-as biodisponíveis, ou seja, disponibilizando-as para os ciclos ecológicos e o meio aquático [5, 6].

Metilação do Hg

Diversos trabalhos relatam diferentes formas de metilação do Hg [16,17]. Quando as concentrações de oxigênio são baixas, o processo de produção e degradação de Hg é predominantemente microbiano. Acredita-se que a degradação solar seja a principal via para a decomposição do metilmercúrio na superfície da coluna de água. Contudo, em água

doce e nas zonas aquáticas costeiras, micro-organismos anaeróbicos prosperando em zonas anóxicas (como sedimentos bentônicos, solo saturado, coluna de água estratificada, perifiton e biofilmes) são os produtores dominantes de metilmercúrio. Porém, uma parte significativa é produzida por uma variedade de microrganismos, destacando principalmente as bactérias redutoras de sulfeto (SBR). O mercúrio associado ao material particulado em suspensão tende a sedimentar, enquanto o mercúrio dissolvido encontra-se mais biodisponível e pode ser incorporado pela biota. O processo de metilação do mercúrio, que aumenta significativamente sua biodisponibilidade e acumulação ao longo da cadeia alimentar, é favorecido em ambientes aquáticos anóxicos ou subóxicos, levemente ácidos, com concentrações elevadas de matéria orgânica dissolvida e atividade microbiológica intensa. Em áreas de remanso, lagos marginais, de inundação e em reservatórios artificiais, essas características biogeoquímicas estão mais propensas a ocorrer [16-19].

Estima-se que nos garimpos da região amazônica brasileira, desde a década de 50 até a década de 90 foram despejadas aproximadamente 200 toneladas de mercúrio, já que a proporção é mais de um kg de mercúrio para cada kg de ouro extraído [16]. A bacia do rio Madeira foi uma das mais prejudicada pelas grandes quantidades de mercúrio lançados pelas minas de ouro, contaminando rios, lagos, sedimentos, plantas, animais e seres humanos [16].

Hg e a Saúde

As primeiras evidências dos efeitos neurotoxicológicos do Hg, em consequência da ingestão materna de alimentos contaminados, foram observadas em crianças na cidade de Minamata, Japão, na década de 50, onde o MeHg liberado de uma indústria química contaminou as águas da baía local, contaminando os peixes consumidos pela população. O Hg nos peixes está principalmente na forma de MeHg, o qual é caracterizado por sua alta biodisponibilidade. Neste acidente, onde moluscos analisados exibiram concentrações de 11 a 40 mg kg⁻¹, provocando lesões neurológicas e até mortes, o Hg passou a ser considerado um dos metais mais perigosos no que diz respeito à contaminação ambiental e

à saúde humana. A população afetada apresentou problemas neurológicos e as crianças nascidas das mães contaminadas exibiram severas deficiências em seu desenvolvimento neural, mesmo em casos nos quais havia completa ausência de sinais clínicos nas mães. Concluiu-se, a partir disso, que o cérebro fetal é muito suscetível aos efeitos deletérios do MeHg em níveis mais baixos do que aqueles que produziam efeitos detectáveis em recém-nascidos ou em adultos. Em 1953, a doença de Minamata foi reconhecida como uma doença neurológica e chamou a atenção do mundo todo para o problema da intoxicação por metais tóxicos. As intoxicações com Hg são evidenciadas por sintomas tais como: tremores, rigidez, ataxia entre outros. Relatos similares ao de Minamata ocorreram no Iraque nos anos de 1971 e 1972, quando a população consumiu pão fabricado com farinha de trigo cujas sementes haviam sido tratadas com fungicida que continha MeHg em sua formulação [19,20].

Estudos procurando estabelecer uma relação dose-resposta começaram então a ser realizados, utilizando-se os níveis de MeHg encontrados nos cabelos das mães como um indicador da exposição e relacionando-os ao desenvolvimento neural de crianças expostas no período pré-natal. Após estes episódios de intoxicação com Hg, as pesquisas foram direcionadas na avaliação dos possíveis efeitos da exposição crônica a níveis mais baixos de MeHg ambiental, particularmente em crianças cuja dieta materna incluía quantidades substanciais de peixe ou outros frutos do mar. Com relação à possível carcinogenicidade do Hg, estudos epidemiológicos realizados nas populações expostas e não expostas ao Hg, bem como, em pessoas que sobreviveram ao acidente de Minamata, não foram conclusivos. Entretanto, outros estudos deverão ser realizados, visto que a população amostrada foi pequena, a descrição dos casos clínicos foi insuficiente e a fonte de exposição ao Hg não foi identificada com certeza [21].

A carcinogenicidade do MeHg também foi investigada em inúmeros estudos e não foi estabelecida nenhuma relação significativa entre bioacumulação de MeHg e câncer. Estudos também mostraram que a exposição ao Hg pode afetar a função imunológica (National Research Council, 2000). A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) estabeleceu um novo limite para MeHg de 0,1 microgramas de Hg por quilo de peso corpóreo por dia ($0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ por dia) (EPA, 1997). Esse valor é 4,7 vezes menor do que o valor de $0,47 \mu\text{g kg}^{-1}$ por dia, preconizado pela Organização Mundial da Saúde. A

concentração média de Hg em peixes de água doce e marinhos é cerca de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$. Em termos práticos, isso significa que uma pessoa pesando 60 kg, em média, pode consumir somente 30g de peixe por dia. É essencial, que a metodologia analítica seja capaz de distinguir entre o Hg total e o MeHg, de modo a avaliar o impacto potencial de Hg na saúde humana, em grupos de populações expostas. A maior fonte de MeHg na alimentação está nos peixes, frutos do mar e derivados; para peixes comestíveis a concentração não deve exceder $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg total, sendo que, em média, 85% se encontra na forma de MeHg. Nos EUA, a concentração média de Hg total encontrada nos peixes e frutos do mar é de $0,24 \text{ mg kg}^{-1}$ para atum (principalmente enlatado); $0,46 \text{ mg kg}^{-1}$ para camarão; $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ para linguado; $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ para mexilhão; $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ para caranguejo/lagosta; $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ para salmão; $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ para ostra; $0,42 \text{ mg kg}^{-1}$ para truta e $0,06 \text{ mg kg}^{-1}$ para sardinha [21].

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu para as águas de classe I, II, e III o limite de $0,0002 \text{ mg L}^{-1}$ de Hg e para águas salinas e salobras, $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente nos corpos de água, em níveis de $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ de Hg. Visto a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos e visando a proteção à saúde da população a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Portaria n ° 685, de 27 de agosto de 1998 também estabeleceu regulamentos técnicos sobre contaminantes em alimentos para inúmeros elementos tóxicos, incluindo o Hg. Este Regulamento Técnico estabeleceu o limite máximo de tolerância para o Hg total em 1 mg kg^{-1} para peixes predadores e $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ para peixes não predadores e produtos da pesca. Diversos fatores afetam os níveis de MeHg em peixes, entre eles: a dieta e o nível trófico das espécies, sendo neste caso a espécie carnívora a que mais contribui para o acúmulo de Hg na forma orgânica, chegando a acumular nove vezes mais que outras espécies [22,23].

O consumo de pequenas quantidades de peixe contaminado pode afetar acentuadamente a ingestão de MeHg em seres humanos e as preocupações referentes ao Hg estão baseadas em seus efeitos no ecossistema e a saúde humana [23].

Biomagnificação na Cadeia Alimentar

O metilmercúrio pode ser facilmente absorvido pela biota aquática, o que não acontece com a sua forma metálica, e tende a acumular-se nos organismos e magnificar-se através da cadeia alimentar. Na Amazônia, como o peixe é a principal fonte de alimento, o consumo de peixes predadores, como o tucunaré e o filhote, pode representar um risco para a saúde humana dessas populações, principalmente para mulheres em idade reprodutiva e para as crianças, já que o mercúrio é reconhecidamente um agente teratogênico (o metilmercúrio da mãe é transferido para a placenta e transportada para o feto). O sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio, afetando principalmente áreas específicas do cérebro, como cerebelo e lobos temporais, sendo principais efeitos neurotóxicos em humanos: ataxia (perda da coordenação dos movimentos voluntários); disartria (problemas nas articulações das palavras); parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades das mãos e pés e em torno da boca); visão de túnel (constricção do campo visual); e perda da audição [7, 9].

A meia-vida biológica do mercúrio em peixes, dependendo da espécie, pode ser de vários anos. As concentrações elevadas de mercúrio em peixes são comumente encontradas naquelas espécies que ocupam o topo da cadeia alimentar. Entretanto, a extensão da cadeia alimentar, a taxa de crescimento individual e a idade do peixe são fatores responsáveis pela variabilidade dos níveis de mercúrio nos predadores. Outra variável a ser considerada é a mudança dos hábitos alimentares que frequentemente variam em função da fase de desenvolvimento, assim como podem variar significativamente entre indivíduos da mesma espécie [10, 13]. Diversos trabalhos desenvolvidos nas últimas duas décadas destacam as altas concentrações de mercúrio determinadas nos peixes amazônicos. De uma forma geral, todas essas pesquisas apontam a bioacumulação ao longo da cadeia trófica como a responsável pelo alto teor de mercúrio nos peixes amazônicos. As algas e as plantas aquáticas dos rios amazônicos apresentam concentrações de mercúrio maiores que as concentrações encontradas nas águas desses rios. Dessa forma, como os peixes se alimentam exclusivamente dessas algas e plantas, apresentam concentrações de mercúrio ainda maiores e, assim por diante, até atingirem peixes como o pintado ou a piranha, que apresentam concentrações um milhão de vezes superiores às das águas dos rios [11, 14].

O aumento significativo da concentração de mercúrio nos peixes de maior longevidade pode estar relacionado ao fato desse elemento apresentar baixa taxa de eliminação pelo organismo. Ou seja, à medida que o organismo envelhece, as concentrações de mercúrio aumentam constantemente e, os organismos que apresentam maior longevidade apresentarão maiores concentrações. Outro aspecto a ser considerado é que, à medida que subimos na cadeia trófica, não apenas a concentração de mercúrio aumenta, mas também a taxa de conversão em metilmercúrio. Por exemplo, um peixe carnívoro adulto pode apresentar mais de 90% do mercúrio na forma metilada, enquanto que esse valor nas águas dos rios não ultrapassa os 2%. Portanto, em resumo, o mercúrio de origem natural e/ou antrópica, ao entrar nos ecossistemas aquáticos, participa de ciclos biogeoquímicos mediados por microorganismos, onde será transformado quimicamente, bioacumulado e biomagnificado na cadeia trófica. Sendo assim, os peixes predadores, ao acumularem altos níveis de mercúrio, podem funcionar como veículos desta forma química para seus consumidores, como répteis, aves, mamíferos e por fim, seres humanos [15,18].

Proteômica

Com a codificação do genoma humano, o qual consiste no conjunto de todos os genes, os cientistas voltaram suas pesquisas ao sequenciamento de proteínas. Uma pesquisa está diretamente ligada à outra, pois são as proteínas que carregam as mensagens dos genes para controlar as funções do organismo [24].

Um dos grandes desafios do século 21, segundo o norte americano *Walter Gilbert*, será codificar as proteínas que os genes produzem e suas funções biológicas exercidas ao longo da vida, podendo assim viabilizar novas drogas e terapias [24].

O termo proteoma foi elaborado por *Wilkins* e *Williams* em 1993, para descrever o complemento proteico total do genoma [26].

O genoma de um organismo é essencialmente estático e o DNA, do qual pode ser extraído em princípios de uma única célula, contém toda informação. Em contraste, o proteoma observável de uma única célula, definido como a coleção de todas as proteínas existentes em seu fenótipo molecular específico é bastante dinâmico e dependente do estado da célula. Portanto, o proteoma não é estacionário, mas muda com o

desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente. Uma vez que o proteoma muda mais que o genoma, é possível então obter-se mais informação do organismo estudando-se o proteoma [27].

O proteoma é mais complexo que o genoma, não apenas devido ao número de proteínas, mas, também, devido às inúmeras possibilidades de interações entre elas e a estrutura tridimensional que a mesma possui, indo interferir decisivamente no papel que ela realiza [25,27].

A análise de proteomas possui várias aplicações e a demanda de trabalhos nessa área tem crescido exponencialmente nos últimos anos. O atendimento dessa demanda vai depender do apoio continuado aos grupos de pesquisa em proteínas e proteomas [26].

Metalômica

Como já definido acima, a proteômica envolve o estudo das propriedades das proteínas, tais como o nível de expressão, as modificações pós-traducionais e as interações, em ampla escala, de modo a obter uma visão global dos processos celulares [24,27].

Já a metalômica é um campo de pesquisa que deve estar relacionada com a genômica e a proteômica, pois a síntese e as funções metabólicas dos genes e das proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas, que são metaloproteínas que atuam como catalisadores biológicos na regulação das reações biológicas e das funções fisiológicas em células e órgãos [28]. A metalômica tem como objetivos a verificação da distribuição das espécies metálicas e metalóides, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas, tais como as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais [29]. Na metalômica, são definidos como “metalomas” os íons metálicos ou espécies metalóides presentes em um sistema biológico (células, tecidos, fluidos ou organismos), na forma livre ou complexado [30].

Uma das mais importantes tecnologias analíticas para estabelecer a metalômica como ciência dos biometais é a especiação química para a identificação específica de

metalomas bioativos, uma vez que a identificação dos metalomas e a elucidação de funções bioquímicas ou fisiológicas nos sistemas biológicos são alvos da metalômica [31].

O estudo do metaloma pode fornecer informações tais como: (i) elemento (espécie metálica ou metalóide) distribuído entre os compartimentos celulares de determinado tipo de célula; (ii) seu meio de coordenação (qual biomolécula está incorporado ou a qual bioligante está complexo); (iii) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes e (iv) a estrutura da biomolécula [30,31].

A informação metalômica pode ser classificada em (i) metalômica qualitativa: identificação das espécies metálicas individuais; (ii) metalômica quantitativa: determinação das concentrações destas espécies e (iii) metalômica comparativa: monitoramento das alterações do metaloma de determinado organismo, sob a influência de estímulo externo. O estudo destas biomoléculas é denominado “metaloproteômica” [32,33].

Os estudos metalômicos, na visão analítica, consistem em três componentes principais: (i) a técnica de separação; isto é, a contribuição para o isolamento das espécies-alvo da matriz, denominada como componente de seletividade; (ii) o detector específico para moléculas; objetivando a sua caracterização, denominado como componente estrutural; e (iii) o detector sensível para a quantificação dos elementos; denominado como componente de sensibilidade [26,34].

Considerando o exposto acima, o presente trabalho teve como objetivos o fracionamento das proteínas por 2D PAGE, o mapeamento quantitativo por espectrometria atômica da porção mercurial nos spots proteicos e a caracterização dos spots nos quais foram identificados o metal estudado por ESI MS/MS.

Referências Bibliográficas

- [1] QUEIROZ, L. J.; VILARA, G. T.; OHARA, W. M.; PIRES, T. H. S.; ZUANON, J.; DORIA, C. R. C. Peixes do Rio Madeira – Volume I, 2013.
- [2] CÁUPER, G. C. B. Ictiofauna In: Biodiversidade Amazônica – Flora Amazônica – Volume II. *Centro Cultural dos Povos da Amazônia*, 2006.
- [3] PARENTE, V. M. A economia da pesca em Manaus: Organização da produção e da comercialização. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 178p., 1996.
- [4] CARDOSO, R. S.; FREITAS, C. E. C. A pesca de pequena escala no rio Madeira pelos desembarques ocorridos em Manicoré (Estado do Amazonas), Brasil. *Acta Amazônica*, v. 38, p. 781-788, 2008.
- [5] BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. A contaminação por mercúrio na bacia do rio Madeira: uma breve revisão. *Geochimica Brasiliensis*, v. 18, p. 99-114, 2004.
- [6] BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ZARA, L. F.; ROCHA, J. C.; SANTOS A. Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. *Tectebel Energia*, 2009. ++++++
- [7] PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; SALOMONS, W.; MALM, O. Environment fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. *Environmental Reviews*, v. 1, p. 26-37, 1993.
- [8] MEILI, M. The coupling of Hg and organic matter in the biogeochemical cycle – a mechanistic model for the boreal forest zone. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 56, p. 333-347, 1991.
- [9] BIDONE, E. D.; CASTILHOS, Z. C.; SANTOS, T. J. S.; SOUZA, T. M. S.; LACERDA, L. D. Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho River, Amapá state, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 97, p. 9-15, 1997.
- [10] BARBOSA, A. C.; BOISCHIO, A. A.; EAST, G. A.; FERRARI, I.; GONÇALVES, A.; SILVA, P. R. M.; CRUZ, T. M. E. Mercury contamination in the Brazilian Amazon. Environmental and occupational aspects. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 80, p. 109-121, 1995.

- [11] D'ITRI, F. M. Mercury pollution and cycling in aquatic system. In: *Proceedings of the 5th International Conference on Environmental Contamination*. Edinburgh, Escócia. p. 391-402, 1992.
- [12] AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO, Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F. J. P.; PFEIFFER, W. C.; KATO H. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 175, p. 85-95, 1995.
- [13] AULA, I.; BRAUNSCHWEILER, H.; MALIN, I. The watershed flux of mercury examined with indicators in Tucuruí reservoir in Pará, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 175, p. 97-107, 1995.
- [14] LECHLER, P. J.; MILLER, J. R.; LACERDA, L. D.; VINSON, D.; BONZONGO, J. C.; LYONS, W. B.; WARWICK, J. J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *Science of the Total Environment*, v. 260, p. 87-96, 2000.
- [15] DOLBEC, J.; MERGLER, D.; LARRIBE, F.; ROULET, M.; LEBEL, J.; LUCOTTE, M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 271, p. 87-97, 2001.
- [16] LEBEL, J.; MERGLER, D.; BRANCHES, F.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; LARRIBE, F.; DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian basin. *Environmental Research*, v. 79, p. 20-32, 1998.
- [17] PASSOS, C. J. S. Exposition humaine au mercure et régime alimentaire en Amazonie brésilienne: une recherche participative. *Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais – Université du Québec à Montréal*. Montréal, Canadá, 120p., 2002.
- [18] WASSERMAN, J. C.; HACON, S.; WASSERMAN, M. A. O Ciclo do mercúrio no Ambiente Amazônico. Rio de Janeiro: *Revista Mundo e Vida*, v. 2, p. 46-53, 2001.
- [19] AMORIM, M. I. M.; MERGLER, D.; BAHIA, M. O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R. R.; LUCOTTE M. Cytogenetic

damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, v. 72, p. 497-507, 2000.

[20] SILVA, J. G. Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático. *Ed. Interciência*, Rio de Janeiro, 126p., 2001.

[21] BERKLMAN, T.; STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. *Amersham Biosciences*, Uppsala, 1998.

[22] MELVIN, M. Electrophoresis, *John Wiley & Sons*, London, 130p., 1987.

[23] COPELAND, R. A. Methods for Protein Analysis, *Chapman & Hall*, New York, 228p., 1994.

[24] GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, v. 69, p. 1-15, 2006.

[25] BERTH, M.; MOSER, F. M.; KOLBE, M.; BERNHARDT J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, p. 1223-1243, 2007.

[26] ERAVCI, M.; FUXIUS, S.; BROEDEL, O.; WEIST, S. E.; MANSMANN, U.; SCHLUTER, H.; TIEMANN, J.; BAUMGARTNER, A. Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, v. 7, p. 513-523, 2007.

[27] FLACK, C. P.; WOOLLEN, J. W. Prevention of interference by dextran with biuret-type assay of serum proteins. *Clinical Chemistry*, v. 30, p. 559-561, 1984.

[28] CHOE, L. H.; LEE, K. H. Quantitative and qualitative of infralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. *Electrophoresis*, v. 24, p. 3500-3507, 2003.

[29] GE HEALTHCARE, Manual do usuário, ImageMaster 2D Platinum 7.0 Edition AA, 2007.

[30] CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

- [31] GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, v. 4, p. 3665-3685, 2004.
- [32] CUTLER, P.; HEALD, G.; WHITE, I. R.; RUAN, J. A novel approach to spots detection for two-dimension gel electrophoresis images using pixel value collection. *Proteomics*, v. 3, p. 392-401, 2003.
- [33] VAN LANGEVELD, R. D. Trace-element determinations using a 15-keV synchrotron X-ray microprobe. *Analytical Chemistry*, v. 63, p. 2253-2259, 1991.
- [34] GAO, Y.; CHEN, Z.; ZHAO, J.; HUANG, Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence combined with gel filtration chromatography and isoelectric focusing separation. *Analyst*, v. 127, p. 1700-1704, 2002.
- [35] KUNBACHER, M.; WESELOH, G.; THOMZIG, A.; BERTELSMANN, H.; BEHNE, D. Analysis and localization of metal and metalloid containing proteins by synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry. *X-Ray Spectrometry*, v. 34, p. 112-117, 2005.
- [36] VERBI, F. M.; ARRUDA, S. C. C.; RODRÍGUEZ, A. P. M.; PÉREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. M. Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 62, p. 97-109, 2005.
- [37] BARNES, D. B.; PIERCE, G. F.; LICHTI, D.; LANDT, M.; KOENIG, J.; CHAN, K. M. Effects of dextran on five biuret-based procedures for total protein in serum. *Clinical Chemistry*, v. 31, p. 2018-2019, 1985.
- [38] LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SANTOS, F. A.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR-XRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. *Talanta*, v. 82, p. 1052-1056, 2010.
- [39] SANTOS, F. A.; LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using

SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: Initial results. *Microchimica Acta*, v. 173, p. 43-49, 2011.

[40] NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; BALDASSINI, W. A.; SANTOS, F. A.; MORAES, P. M.; CASTRO, G. R.; PADILHA P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de Tilápia do Nilo. *Química Nova*, v. 35, p. 493-498, 2012.

[41] SILVA, F. A.; CAVECCI, B.; BALDASSINI, W. A.; LIMA, P. M.; MORAES, P. M.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA P. M. Selenium fractionation from plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 7, p. 158-165, 2013.

[42] SUSSULINI, A.; GARCIA, J. S.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; FLORES, E. M.; PÉREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Microchimica Acta*, v. 158, p. 173-180, 2007.

[43] SUSSULINI, A.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, M. A. Z. Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 22, p. 1-6, 2007.

[44] GARCIA, J. S.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through proteomic changes. *Metallomics*, v. 1, p. 107-113, 2009.

[45] PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. *Journal of American Chemical Society*, v. 85, p. 3533-3539, 1963.

O Capítulo II: “Estratégias metalômicas para fracionamento de mercúrio em amostras de tecido muscular de tucunaré (*Cichla spp.*) e filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) da região amazônica”, apresentou como objetivos:

- a) Identificação e caracterização de metaloproteínas presentes em amostras de tecido muscular de *Brachyplatystoma filamentosum* e *Cichla spp.*;
- b) Desenvolver e validar métodos analíticos visando o fracionamento/separação de proteínas por eletroforese 2D-PAGE de amostras de tecido muscular de *Brachyplatystoma filamentosum* e *Cichla spp.*;
- c) Identificar e quantificar por GFAAS a presença de Mercúrio nos spots proteicos;
- d) Caracterizar as proteínas presentes nos spots nos quais foram identificados a presença de Hg por ESI MS/MS;

O trabalho foi redigido de acordo com as normas do periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society*

CAPÍTULO II

*ESTRATÉGIAS METALÔMICAS PARA FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE TUCUNARÉ (*Cichla spp.*) E FILHOTE (*Brachyplatystoma filamentosum*) DA REGIÃO AMAZÔNICA*

ESTRATÉGIAS METALÔMICAS PARA FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE TUCUNARÉ (*Cichla spp.*) E FILHOTE (*Brachyplatystoma filamentosum*) DA REGIÃO AMAZÔNICA

João Vitor de Queiroz^a, José C. S. Vieira^b, Bruna Cavecci^b, Camila P. Braga^b, Pedro M. Padilha^{a,b,c*}

^aFaculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, C. Postal 560, 18.618-970, Botucatu – SP – Brasil.

^bInstituto de Biociências/UNESP – Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, C. Postal 510, 18.618-970, Botucatu – SP –Brasil.

^cInstituto de Biociências/UNESP – Departamento de Química e Bioquímica, C. Postal 510, 18.618-970, Botucatu – SP –Brasil.

*Corresponding author: e-mail: joaovitor.queiroz@hotmail.com; telephone: + 55 (14) 3880-0581

Resumo

Este trabalho apresenta os resultados de fracionamento de proteínas ligadas ao mercúrio em amostras de músculo de tucunaré (*Cichla spp.*) e filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) oriundos do complexo hidrelétrico de Jirau, na Bacia do Rio Madeira, região amazônica do Brasil. O proteoma do músculo dessas espécies foi separado por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (PAGE 2D). O mercúrio presente nos spots proteicos foi determinado por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) após mineralização ácida assistida por banho de ultra-som. Os spots proteicos que apresentaram mercúrio foram caracterizados por espectrometria de massas por ionização com eletrospray em sequência (ESI- MS/MS) após digestão triptica. As determinações GFAAS indicaram que 65% do mercúrio está ligada à fração proteica com massa molar (Mm) inferior a 90 kDa. As concentrações de mercúrio nos spots apresentaram-se na faixa de 13,60 – 17,10 mg g⁻¹. Com base nas concentrações de mercúrio, foi possível estimar que os spots proteicos continham aproximadamente um átomo de mercúrio por molécula de proteína. A análise por ESI-MS / MS permitiu caracterizar em dez spots proteicos as seguintes proteínas e/ou enzimas: parvalbumina-2 (Mm = 12,40, pI = 3,80); parvalbumina alfa (Mm = 12,40, pI = 3,80); parvalbumina beta (Mm = 12,40, pI = 3,80); ubiquitina-40S proteína ribossômica S27a (Mm = 11,60, pI = 6,10); GTP cyclohydrolase 1 proteína reguladora de feedback (Mm = 13,00, pI = 4,00) e proteína de transmembrana 186 (Mm = 14,00, pI = 4,70).

Palavras-chaves: Metaloproteínas, GFAAS, 2D-PAGE

Abstract

This paper presents the results of mercury fractionation in muscle samples of tucunaré (*Cichla spp.*) and filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) from the JIRAU Hydroelectric Power Plant in the Madeira River Basin in the Amazon region of Brazil. The proteome of the fishes muscle was separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D PAGE). The mercury present in the protein spots was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) after acid mineralization in an ultrasound bath. The protein spots in which the presence of mercury was detected were characterised by electrospray ionisation tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) after tryptic digestion. The GFAAS determinations indicated that 65% of the mercury was linked to the protein fraction with a molar mass (Mm) of less than 90 kDa. The mercury concentration in the eleven spots in this protein fraction was present were in the range 13.60 to 17.10 mg g⁻¹. Based on mercury concentrations, it was possible to estimate that the protein spots contained approximately one atom of mercury per protein molecule. Analysis by ESI-MS / MS protein allowed the characterization of ten spots as proteins and / or following enzymes: parvalbumin-2 (MW = 12.40, pI = 3.80); parvalbumin alpha (Mm = 12.40, pI = 3.80); parvalbumin beta (Mm = 12.40, pI = 3.80); ubiquitin-40S ribosomal protein S27a (Mm = 11.60, pI = 6.10); GTP cyclohydrolase 1 regulatory protein of feedback (Mm = 13.00, pI = 4.00) and transmembrane protein 186 (Mm = 14.00, pI = 4.70).

Keywords: Metalloproteins, GFAAS, 2D-PAGE

Introdução

A poluição química e biológica na bacia do rio Madeira configura um dos principais problemas socioambientais da Amazônia. A contaminação pelo mercúrio, que marcou a Amazônia na década de 80 até meados de 90, volta a ser cenário de discussão devido aos passivos ambientais deixados pela atividade de garimpagem de ouro e pelo potencial de contaminação que estes passivos representam para a sociedade [1].

A construção e implementação do Aproveitamento Hidrelétrico Jirau na bacia do rio Madeira poderá, em virtude das alterações ambientais, modificar as espécies químicas do mercúrio, disponibilizando-as para o meio aquático. Espécies mercuriais, como por exemplo o metilmercúrio, estando disponíveis no meio aquático, podem ser absorvidas pela biota aquática, acumular-se nos organismos e magnificar-se através da cadeia alimentar [2].

Na Amazônia, o peixe é a principal fonte de alimento para as populações ribeirinhas. Diversos trabalhos desenvolvidos nas últimas duas décadas destacam as altas concentrações de mercúrio determinadas nos peixes amazônicos. De forma geral, todas essas pesquisas, apontam a bioacumulação ao longo da cadeia trófica como a responsável pelo alto teor de mercúrio nos peixes amazônicos. O mercúrio de origem natural e/ou antrópica, ao entrar nos ecossistemas aquáticos, participa de ciclos biogeoquímicos mediados por microorganismos, onde será transformado quimicamente, bioacumulado e biomagnificado na cadeia trófica. Sendo assim, os peixes predadores, como a dourada, ao acumularem altos níveis de mercúrio podem funcionar como veículos desta forma química para seus consumidores, como répteis, aves e seres humanos [3,4].

Assim, o consumo de peixes pode representar um risco à saúde dessas populações ribeirinhas. A determinação de espécies mercuriais em amostras biológicas apresenta dificuldades devido às baixas concentrações que essas espécies apresentam nessas amostras e também porque a toxicidade depende da espécie mercurial analisada. Nesse contexto, o desenvolvimento de biomarcadores relacionados ao mapeamento e expressões de metalotioneínas associadas ao mercúrio poderá indicar previamente os riscos relacionados à contaminação do pescado dos rios amazônicos [5,6]. A metalômica, recente

área de pesquisa, permitiu a integração estudos analíticos e bioquímicos de elevada complexidade, contemplando o sequenciamento e a caracterização de proteínas associadas a metais. Esta nova área do conhecimento científico tem contribuído na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos. A elucidação de espécies mercuriais complexadas por proteínas e/ou enzimas utilizando a metalômica e análise de especiação permitirá estudo detalhado do aumento ou diminuição de expressão dessas metaloproteínas, frente às alterações das características limnológicas e disponibilidades das espécies mercuriais no ambiente dos rios amazônicos. Nesse aspecto, as metaloproteínas e/ou proteínas metal-ligante caracterizadas nessas condições de estudo, poderão ser utilizadas como biomarcadoras de toxicidade do mercúrio no pescado da região amazônica [5-8].

Considerando o exposto, o presente trabalho apresenta os resultados metalômicos quantitativos da análise de tecido muscular de tucunaré (*Cichla spp.*) e filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (PAGE 2D) para obter o proteoma do tecido muscular, espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) para determinação quantitativa de mercúrio nos spots protéicos e espectrometria de massas por ionização com eletrospray em sequência (ESI- MS/MS) para caracterização dos spots protéicos que apresentaram mercúrio ligado em suas estruturas.

Parte Experimental

Equipamentos e Acessórios

Sistema para eletroforese 2D-PAGE, marca GE Healthcare, modelo Ettan™ Daltsix (Uppsala, Suécia); Sistema para focalização isoeletrica, marca Amersham Biosciences, modelo EPS1001 (Uppsala, Suécia); Espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA 6800 com sistema de atomização eletrotérmica em forno de grafite GFA-EX7 e amostrador automático ASC-6100; Banho de Ultrassom UNIQUE ULTRASONIC CLEANER, modelo USC1800A; Espectrômetro de massas com fonte de ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado

com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA); Sistema Montage® In-Gel Digest_{zp} Milipore.

Reagentes, Soluções e Limpeza de Vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica espectroscópica e/ou cromatográfica, sendo as soluções preparadas todas com água ultrapura (18,2 MΩ cm⁻¹) obtida em sistema de purificação PURELAB Ultra, marca ELGA LABWATER (Saint Maurice, França), e estão listados a seguir:

Bicarbonato de amônio (Sigma); Acetonitrila (J. T. Baker); Tripsina (Promega); Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich); Solução 50 mmol L⁻¹ em Bicarbonato de amônio; Solução 25 mmol L⁻¹ em Bicarbonato de amônio; Solução descorante 50% (v/v) em acetonitrila e 25 mmol L⁻¹ em Bicarbonato de amônio; Solução de redução 20 mmol L⁻¹ em ditioneína (Affymetrix) e 50 mmol L⁻¹ em Bicarbonato de amônio; Solução de alquilação 55 mmol L⁻¹ em iodocetamida (GE Healthcare) e 50 mmol L⁻¹ em Bicarbonato de amônio; Solução 100 µg mL⁻¹ de tripsina e 50 mmol L⁻¹ em ácido acético; Solução bloqueadora 5% (v/v) em ácido fórmico e 50% (v/v) em acetonitrila; Solução eluente A 1% (v/v) em ácido fórmico e 50% (v/v) em acetonitrila; Solução eluente B 1% (v/v) em ácido fórmico e 60% (v/v) em metanol (J. T. Baker).

Todos os frascos de estocagem de amostras e soluções, vidrarias e os vials do amostrador do espectrômetro de absorção atômica foram lavados com Extran® (J. T. Baker) 10% (v/v) em seguida com ácido nítrico (J. T. Baker) 10% (v/v) por 24 horas. Posteriormente, foram lavados com água ultrapura e secos em estufa, exceto as vidrarias volumétricas, secas à temperatura ambiente.

Coleta das Amostras

Todo o processo de amostragem foi feito considerando a sazonalidade regional (cheia, enchente, vazante e seca). A Figura 1 mostra os pontos de coleta ao longo do rio Madeira até o AHE Jirau.

Figura 1

Após o processo de coleta, os peixes foram anestesiados e em seguida eutanasiados para retirada das amostras de tecido muscular. Um pool de amostra de músculo de cada uma das espécies de peixes coletados (tucunaré e filhote) foi então transferido para frascos de polipropileno de 15 mL e armazenadas em gelo seco a -70°C na Base de Operações do Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico, localizada na área do Canteiro de Obras do AHE Jirau. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o laboratório de estudos metalômicos (Laboratório de Bioanalítica) do Instituto de Biociências – Departamento de Química e Bioquímica/UNESP.

Preparação das Amostras para Eletroforese 2D-Page

Extração das Proteínas

Cerca de 2 g do pool das amostras de tecido muscular de tucunaré e filhote, foi macerada em volume equivalente de água ultrapura (proporção 1:1), com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, os extratos contendo as proteínas foram separados da parte sólida por centrifugação por 30 minutos a $16.000 \times g$ a 4°C , em centrífuga refrigerada. Os extratos proteicos obtidos dessas amostras foram transferidos para *vials* de 2 mL e foram utilizados posteriormente para quantificação dos teores proteicos totais, de mercúrio total, e para as precipitações das proteínas que seriam utilizadas nas corridas eletroforéticas [5,6].

Precipitação Fracionada e Ressolubilização das Proteínas

A precipitação das proteínas contidas nos extratos proteicos foi feita em duas etapas (precipitação fracionada). Na primeira etapa, alíquotas de 1 mL de solução etanol-clorofórmio e do extrato proteico foram transferidas para *vials* de 2 mL, na proporção 1:1 (v/v). A mistura homogênea foi mantida em geladeira por 15 minutos, tempo suficiente para formação de precipitado proteico. Após esse tempo, a mistura heterogênea foi centrifugada por 30 min a 16.000 *g* a 4°C. O sobrenadante foi então separado para nova submissão à precipitação e os precipitados obtidos (*pellets* com proteínas de alta massa molar) foram mantidos nos *vials* e guardados em freezer a -20°C para determinação de mercúrio total. As massas dos *pellets* foram determinadas pela diferença das massas iniciais dos *vials* vazios e das massas finais dos *vials* com os *pellets* [5].

Na segunda etapa de precipitação, em *vials* de 2 mL foi adicionado 1 mL do sobrenadante retirado da primeira etapa e 400 µL de solução etanol-ácido clorídrico, na proporção 2,5:1 (v/v). Essa etapa de precipitação foi conduzida em freezer a -20°C durante 3 horas, garantindo assim que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, a mistura heterogênea foi centrifugada a 16.000 *g* a 4°C em centrífuga refrigerada por 30 min, descartando-se o sobrenadante. O precipitado proteico (*pellet* de interesse) foi lavado quatro vezes com 1 mL de etanol gelado (-20°C) para remoção de resquícios de ácido clorídrico [5].

Este procedimento foi conduzido com réplicas para se garantir a obtenção de *pellets* que seriam utilizados tanto para a quantificação de proteína total e mercúrio total, quanto para as corridas de 2D-PAGE.

Para a quantificação de proteína total o precipitado proteico foi resolubilizado em solução a 0,50 mol L⁻¹ de NaOH; já para a determinação de mercúrio total foi feita mineralização ácida do precipitado conforme descrito na página seguinte, procedimento este já publicado [5]. Para as separações eletroforéticas, o *pellet* foi resolubilizado em tampão específico.

Determinação de Proteína Total

A determinação de proteína total nos extratos dos *pellets* na segunda etapa do processo de precipitação das proteínas foi feita utilizando-se o método do Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão. A determinação de proteína total nos extratos dos *pellets* permite calcular o volume de extrato proteico que contenha 375 µg de proteína, para ser aplicado em cada fita de IOF utilizada na primeira etapa da eletroforese bidimensional [9,10].

Corridas Eletroforéticas

O *pellet* de massa molar inferior a 90 kDa obtido anteriormente, foi diluído em solução de solubilização contendo uréia 7 mol L⁻¹; tiouréia 2 mol L⁻¹; CHAPS (3-[(3-colaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato) a 2% (m/v); anfólitos 0,5% (v/v) em pH variando de 3 a 10; azul de bromofenol 0,002% (m/v). A diluição do *pellet* foi feita de tal forma que a concentração de proteínas totais resultante fosse a mesma para todas as amostras: 1,5 µg/µL. Um volume de 250µL dessa solução foi adicionado às fitas de 13 cm contendo gel de poliacrilamida e com gradiente de pH de 3 a 10 para que estas fossem reidratadas com solução contendo a própria amostra. As fitas foram reidratadas por 12 h em caixa de hidratação a temperatura ambiente, em seguida, levadas para o sistema de focalização isoeletrica (IEF) Ettan™ IPGphor™ 3. As corridas IEF das fitas (gradiente de pH de 3 a 10) foram realizadas utilizando a seguinte programação de tensão: Etapa 1 = 500 V, com acúmulo de 500 Vh; Etapa 2 = 1.000, com acúmulo de 800 Vh; Etapa 3 = 10.000 V, com acúmulo de 11.300 Vh; Etapa 4 = 10.000 V com acúmulo de 3.000 Vh [7,8, 11-13].

Terminada a corrida de IEF, as fitas foram equilibradas em duas etapas. Na primeira etapa, utilizou-se 10 mL de solução contendo uréia 6 mol L⁻¹, SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,8), azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 2% (m/v), para manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa, utilizou-se uma solução de composição similar, entretanto, o DTT foi substituído por iodoacetamida 2,5% (m/v), para se obter a alquilação dos grupos tióis das proteínas e com

isso prevenir uma possível reoxidação. Na segunda etapa do processo eletroforético (2D-PAGE), as fitas foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 15% (m/v), previamente preparado em placa de 180 x 160 x 1,5mm. Aplicou-se os padrões de massa molar - β -fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) - ao lado das fitas e ambos foram selados com solução de agarose 0,5% (m/v). A programação da corrida, feita na cuba SE 600 Ruby (GE Healthcare Bioscience AB), foi: Tensão (V) – Etapa 1 = 90, Etapa 2 = 250; Corrente Elétrica (mA) – Etapa 1 = 25, Etapa 2 = 25; Potência (W) - Etapa 1 = 100, Etapa 2 = 100; Tempo (h) – Etapa 1 = 0,5, Etapa 2 = 3 [7,8, 11-13].

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel, durante 1h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). As proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal, que ficou em contato com o gel durante 72 horas [7,8].

Determinação de Hg Total

A determinação de mercúrio total nas amostras de tecido muscular e hepático dos peixes, nos extratos proteicos, nos *pellets* e nos spots proteicos foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) conforme procedimento descrito a seguir [10].

As amostras de tecido muscular, extratos, *pellets* e spots proteicos foram mineralizadas da seguinte forma: cerca de 50 mg (pesadas em triplicata em balança analítica com precisão de centésimo de miligrama) de amostra de tecido muscular, e/ou 9 spots proteicos (obtidos das réplicas de três corridas – em cada corrida obteve-se 3 géis), e/ou a massa total dos *pellets* proteicos de cada uma das duas etapas da precipitação fracionada (~100 mg; obtidos pela diferença da massa inicial do microtubo e a massa final, depois da precipitação das proteínas) foram transferidos para frascos de digestão de 5 mL. Para cada frasco de digestão foram transferidas alíquotas de 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de frascos foi colocado em banho de ultrassom da UNIQUE à temperatura de 40°C e 135 Watts de

potência, até completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL completando-se os volumes com água ultrapura. Para validação do método de mineralização foi utilizado padrão certificado *Fish Protein* DORM 4 – NRC contendo $410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio total.

Para a determinação de mercúrio foi utilizado espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema *self-reverse* (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de mercúrio SHIMADZU, operada com corrente mínima de 12 mA e corrente máxima de 400 mA (corrente utilizada na correção de fundo – BG). O comprimento de onda utilizado foi de 253,7 nm e resolução espectral de 0,5 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min^{-1} durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos em área de pico por mostrar melhor repetibilidade dos resultados. As paredes interiores do tubo de grafite com plataforma integrada utilizado nas análises de mercúrio foram recobertos com tungstênio.

No processo de recobrimento do tubo, alíquotas de 25 μL de solução modificadora tungstato de sódio 1000 mg L^{-1} foram injetadas dentro do atomizador, a qual foi em seguida submetida ao programa descrito por Silva et al. (2007). Íons de tungstênio foram depositados sobre a plataforma do tubo de grafite com aquecimento até 500°C , formando uma camada de carbeto de tungstênio, que funciona como modificador químico. Após este tratamento, a vida útil do tubo foi de aproximadamente 450 queimas [15].

Digestão Triptica dos Spots Proteicos para Caracterização por ESI-MS/MS

Os spots proteicos foram extraídos dos géis utilizando-se bisturi, sendo cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 . Os seguimentos foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo ácido acético 1% e mantidos em geladeira até os passos subseqüentes, descritos no Boletim Técnico da Walters, que se resume em 4 etapas: a)

remoção do corante; b) redução e alquilação; c) digestão tríptica das proteínas; d) eluição dos peptídeos [16,18].

Caracterização das Proteínas por ESI MS/MS

As alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram analisadas para obtenção dos espectros de massas utilizando Plataforma UPLC em espectrômetro de massa com fonte ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA). A identificação das proteínas foi feita por meio de busca em banco de dados *Uniprot* (www.uniprot.org) [18].

Resultados e Discussão

Determinação da Concentração e Proteína Total

A obtenção dos *pellets* proteicos foi feita utilizando-se o processo de precipitação fracionada, descrita acima, com o objetivo de obter uma fração com proteínas maiores que 90 kDa e outra fração com proteínas menores que 90 kDa. A literatura descreve que o mercúrio apresenta maior afinidade por proteínas com massa molar abaixo de 10 kDa, as chamadas metalotioneínas – proteínas que por apresentarem grande porcentagem de cisteínas (aminoácidos que contêm grupos sulfidríla, classificados como base mole) formam complexos estáveis com o mercúrio [19]. Dessa forma, optou-se por trabalhar com as proteínas presentes na fração de menor massa molar considerando que as determinações por GFAAS não indicaram presença de mercúrio na fração de massa molar maior que 90 kDa.

Foi determinado o teor total de proteína nos extratos obtidos a partir da solubilização dos *pellets* proteicos com o objetivo de aplicar uma quantidade de massa proteica conhecida nas fitas de IEF das corridas eletroforéticas. Essas determinações foram feitas utilizando-se o método do Biureto [12]. As concentrações de proteína total nos

extratos dos *pellets* de menor massa molar foram (g L^{-1}): Tecido muscular – tucunaré: $13,10 \pm 0,40$ e filhote: $11,80 \pm 0,34$. Com base no resultado da concentração de proteína total presente nos extratos de tecido muscular foi possível calcular o volume de extrato a ser aplicado nas fitas de IEF a fim de se obter uma massa de proteína de $375 \mu\text{g}$. Com base no manual do sistema IEF, essa massa de proteína permite uma melhor separação das proteínas no gradiente de pH 3-10 [13]. Os resultados obtidos nas mostras de tecido muscular apresentam valores bem próximos, o que demonstra que o processo de extração foi eficiente e homogêneo.

Fracionamento das Proteínas por 2D-Page

Os experimentos de eletroforese 2D-PAGE foram feitos em seis repetições de corridas, com três géis cada, para as amostras de tecido muscular das seguintes espécies: tucunaré (*Cichla spp.*) e filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*), utilizando-se os extratos obtidos na ressolubilização dos *pellets* proteicos de menor massa molar ($< 90 \text{ kDa}$). Os géis obtidos em três corridas (nove géis) de cada amostra foram utilizados na determinação de mercúrio nos spots proteicos e os outros géis obtidos nas outras três corridas de cada amostra foram utilizados na caracterização das proteínas por ESI MS/MS dos spots proteicos que apresentaram mercúrio.

As análises de correlação entre as repetições dos géis (*matching*) e a contagem de spots proteicos obtidos em cada gel foram feitas utilizando-se os parâmetros para obtenção das imagens conforme descrito em trabalhos anteriores [8, 9, 13]. Nas Figuras 2 e 3 são apresentados um exemplo de cada gel obtido nas seis repetições das corridas eletroforéticas das amostras de tecido muscular das espécies de peixes estudadas. Os spots proteicos destacados com círculo são aqueles nos quais foi detectada a presença de mercúrio e determinada as concentrações deste elemento por GFAAS [10]. Os resultados médios das análises de correlação entre as três repetições dos géis, foram $76 \pm 4 \%$ para tucunaré, e $77 \pm 5 \%$ para filhote. A contagem média de spots nos géis foram 458 ± 15 para tucunaré, e 338 ± 13 .

Figura 2

Figura 3

A análise de correlação entre os géis, considerando as três corridas eletroforéticas, demonstrou que em média mais de 74% dos spots proteicos estavam presentes nos nove géis das amostras de tecido muscular das espécies de peixes estudadas. Deve-se destacar que o número médio de spots encontrados nos géis e o *matching* (correlação entre os géis), considerando três corridas eletroforéticas – com três géis por corrida – apresentaram desvios padrões menores que 5%. Os resultados obtidos demonstraram que as condições da 2D-PAGE otimizadas foram mais eficientes quando comparadas com outras condições de corridas da literatura [14 e 15].

Avaliação Quantitativa de Hg

A determinação de mercúrio total foi feita nas amostras de tecido muscular das espécies de peixes estudadas, nos spots proteicos e nos *pellets* proteicos obtidos no processo de precipitação fracionada das proteínas (*pellets* com > massa molar e com < massa molar). O objetivo desse procedimento foi fazer um balanço de massa de mercúrio em relação à concentração desse elemento nas amostras de tecidos e nos spots proteicos. Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações de mercúrio nos *pellets* proteicos obtidos, a concentração de mercúrio nas amostras de tecido muscular das espécies de peixes e a concentração de mercúrio e no padrão certificado de proteína de músculo de peixe DORM 4 – NRC para validar o método de determinação de mercúrio otimizado [10].

Tabela 1

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 1, observa-se que aproximadamente 65% do mercúrio presente nas amostras de tecido muscular está ligado nas proteínas dos *pellets* de massa molar menor que 90 kDa. Como não foi detectado mercúrio nos extratos dos *pellets* proteicos de massa molar maior que 90 kDa, pode-se inferir, considerando que o processo de extração tenha sido eficiente, que 65% do mercúrio presente nas amostras de tecido muscular dos peixes estudados estão ligados à fração proteica e que 35% pode estar ligado em outros compostos e/ou macromoléculas.

Os dados apresentados são considerados bastante confiáveis porque foram validados com base no resultado obtido na determinação de mercúrio no padrão certificado DORM 4 – NRC de proteína de músculo de peixe. Conforme mostra a Tabela 1, o valor experimental do desvio padrão relativo obtido nas amostras é menor que 1% e o valor experimental absoluto do padrão certificado ($408 \mu\text{g kg}^{-1}$) é cerca de 0,50 % menor que o valor certificado absoluto ($410 \mu\text{g kg}^{-1}$), comprovando assim a exatidão e precisão do método otimizado para determinação de mercúrio.

As concentrações de mercúrio nos spots proteicos obtidos nas corridas por 2D-PAGE com os *pellets* de menor massa molar também foram determinadas utilizando-se o método por GFAAS otimizado [10]. Essas determinações indicaram a presença de mercúrio nos spots proteicos destacados com círculo nos géis de poliacrilamida apresentados nas Figuras 2 e 3. A Tabela 2 mostra os valores de concentração de mercúrio determinados em cada spot proteico, com suas respectivas massas molares (Mm) e pontos isoelétricos (pI), além da massa de proteína e o número de moléculas em cada spot proteico identificado bem como o número de átomos de mercúrio em cada spot proteico determinado utilizando-se o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 2, pode-se observar que as concentrações de mercúrio nos spots proteicos apresentam valores na faixa de 13,60 a 17,10 mg g^{-1} . No entanto, esses resultados não fornecem muitas informações sem que tenham sido caracterizadas as proteínas desses spots proteicos. Dessa forma, foi feita a conversão da estimativa das massas de spots proteicos e das massas de mercúrio para quantidade de moléculas de spot proteico e quantidade de átomos de mercúrio. Para isso, consideraram-se as respectivas massas molares dos spots proteicos, a massa molar do mercúrio ($200,59 \text{ g mol}^{-1}$), a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$) e $1 \text{ kDa} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$. Esses cálculos possibilitaram a estimativa de quantos átomos de mercúrio estariam presentes por moléculas de spot proteico [8, 9, 13]. Os resultados obtidos nesses cálculos são mostrados também na Tabela 2 em termos de número de átomos de mercúrio por molécula do spot proteico considerado.

Tabela 2

Os resultados obtidos por meio dos cálculos estequiométricos permitiram estimar que os spots do tecido muscular T1-T5 e F1-F6 apresentam aproximadamente um átomo de mercúrio por molécula de spot proteico. Esses resultados, embora estimativos, sugerem que pode existir uma relação estequiométrica entre o número de átomos de mercúrio e o número de moléculas dos spots proteicos, o que seria uma possível indicação de que esses spots podem se tratar de metaloproteínas e/ou proteínas metal-ligante [4, 8, 9, 13].

Caracterização dos Spots Proteicos por ESI-MS/MS

A caracterização dos spots proteicos nos quais foram identificados e quantificados mercúrio, foi feita por espectrometria de massas por ionização com eletrospray em sequência (ESI- MS/MS).

As Tabelas 3 e 4 apresentam os dados de caracterização obtidos na análise por ESI MS/MS com a provável proteína identificada com base nas condições descritas acima. Como é normal na análise de caracterização de spots proteicos, foi encontrada mais de uma proteína na busca no banco de dados [14, 15, 16]. No entanto, foi considerando o maior *score* e/ou cobertura no trabalho de bioinformática. Os dados de massa molar e pI obtidos por 2D-PAGE (experimental) em relação à massa molar teórica obtidas no banco de dados *Uniprot* (www.uniprot.org) também foram considerados.

Tabela 3

Tabela 4

As proteínas e/ou enzimas caracterizadas nos dez spots proteicos foram: *Parvalbumina* - proteína de baixa massa molar (11-12 kDa), apresenta as isoformas *parvalbumina-2*, *parvalbumina alfa* e *parvalbumina beta*, todas as três isoformas normalmente se ligam à íons cálcio. Essa proteína está diretamente envolvida em processos de relaxamento muscular após ocorrência de contração. Essa proteína é basicamente formada por sequências peptídicas que contém serina e alanina – aminoácidos que apresentam estruturas com grupos carboxílicos, amino e hidroxila, suscetíveis à complexação de íons metálicos divalentes, principalmente cálcio e magnésio [17]. A

Parvalbumina ligada ao mercúrio foi a proteína mais identificada nos spots proteicos analisados, sendo que a isoforma *parvalbumina-2* foi caracterizada nos spots T1, T3 e T5 de tecido muscular de tucunaré; a *parvalbumina alfa* foi caracterizada nos spots T1, T3 e T5 de tecido muscular de tucunaré; e a *parvalbumina beta* foi caracterizada nos spots T1 e T2 de tecido muscular de tucunaré e F1 e F2 de tecido muscular de filhote. A literatura até o momento não apresenta nenhum trabalho que discute a possibilidade da ligação de mercúrio e/ou outros metais potencialmente tóxicos na *parvalbumina* ou em suas isoformas. No entanto, por essa proteína apresentar sítios de ligações de metais divalentes disponíveis, podem formar ligações com íons Hg^{2+} [17,18]. Dessa forma, pode-se inferir que o mercúrio pode ter se incorporado às isoformas da *parvalbumina* por ligações não específicas formando uma proteína *metal-binding*, não sendo configurado como um cofator metálico [17]. Deve-se destacar que todos os spots caracterizados com isoformas da *parvalbumina* ligadas ao mercúrio apresentaram expressão significativa, o que pode candidatar esses spots a possíveis biomarcadores de mercúrio; *Ubiquitina-40S proteína ribossômica S27a* - proteína que, quando ligada de forma covalente, pode estar envolvida na reparação do DNA, regulação do ciclo celular, endocitose, degradação lisossomal; pode também estar envolvida em processos de sinalização que conduzem à ativação do fator de transcrição NF-kappa-B; e na sua forma livre, pode ativar proteínas quinases e ter papel na sinalização celular. Essa proteína apresenta domínios com grupos específicos para ligação de zinco (*zinc-finger metal binding domains*) [19]. Por apresentar domínios específicos ligados a átomos de zinco, que apresentam características semelhantes ao mercúrio (ácido mole), pode também se ligar a outros íons divalentes como o cobre, o cádmio e o mercúrio [18, 19, 20]. Os spots T4 e F6 de tecido muscular de tucunaré e filhote, respectivamente, foram caracterizados como sendo essa proteína com mercúrio incorporado em sua estrutura. Como esses spots apresentaram expressão significativa, podem ser considerados possíveis candidatos à biomarcadores de mercúrio. Os dados obtidos por GFAAS demonstraram que esses spots apresentam uma relação estequiométrica com o mercúrio, o que reforça a hipótese dessa proteína atuar como biomarcador desse elemento; *GTP Cyclohydrolase 1 proteína reguladora de feedback (GCHRF)* - enzima que ajuda na regulação da biossíntese de tetrahidrobiopterina, por meio da inibição de retorno da taxa da enzima limitante GTP ciclo I (GTP CHI), sendo codificada pelo gene GCHRF. A

tetrahidrobiopterina é o cofator necessário para a hidroxilação de aminoácidos aromáticos e formação da sequência peptídica [21]. Postula-se que essa enzima possa atuar na regulação do metabolismo da fenilalanina no fígado e na produção de neurotransmissores de aminas biogênicas e do óxido nítrico. Essa enzima possui cadeias laterais compostas por dois grupos tióis que normalmente apresentam Zn^{2+} coordenado. Acredita-se que a coordenação do Zn^{2+} ioniza os grupos hidroxila que atuam com nucleófilos do anel imidazol presente na GTP [21]. Por apresentar tais cadeias laterais coordenadas com zinco, que apresentam características semelhantes aos íons Hg^{2+} (ácido mole), pode-se inferir que o mercúrio possa deslocar os íons Zn^{2+} dos grupos tióis, ligando-se às cadeias laterais da GCHRF [11, 18, 20, 21]. O spot F3 de tecido muscular de filhote foi caracterizado como sendo essa enzima com mercúrio incorporado em sua estrutura. Como esse spot apresenta expressão significativa, pode ser considerado possível candidato à biomarcador de mercúrio. Os dados obtidos por GFAAS demonstraram que esse spot apresenta uma relação estequiométrica com o mercúrio, o que reforça a hipótese dessa enzima atuar como biomarcador desse elemento; *Proteína de Transmembrana 186* - como toda proteína transmembrana, postula-se que essa proteína também desempenha a função de transporte de íons, função receptora e até, em alguns casos, como enzimas [22]. Essa proteína é formada por sequências peptídicas com glicina, prolina, histidina e aminoácidos hidrofóbicos, como a cisteína, que apresenta grupo tiol na sua estrutura [22, 23]. A presença de grupos tióis e a possível atuação no transporte de íons podem justificar a incorporação de mercúrio pela *Proteína de Transmembrana 186*, considerando a grande afinidade de grupos tióis (base mole) por esse íon [19]. O spot F5 de tecido muscular de filhote foi caracterizado como sendo essa proteína com mercúrio incorporado em sua estrutura. Como esse spot apresentou expressão significativa e os dados obtidos por GFAAS demonstraram que existe relação estequiométrica com o mercúrio, pode-se inferir que este spot possa atuar como biomarcador de mercúrio.

Conclusões

A utilização da 2D-PAGE como componente de seletividade no fracionamento de proteínas mostrou-se bastante eficiente, separando com eficácia uma vasta quantidade de

spots proteicos por gel. A GFAAS como componente de sensibilidade permitiu quantificar o mercúrio presente nos extratos proteicos; nos extratos dos *pellets* e nos extratos ácidos dos *spots* proteicos do tecido muscular das espécies de peixes estudadas. A análise das imagens dos géis de eletroforese 2D-PAGE e a quantificação do mercúrio nos extratos proteicos, permitiu concluir que o mercúrio encontra-se ligado em proteínas de massa molar menor que 15 kDa. As análises por ESI-MS/MS dos *spots* proteicos que apresentaram mercúrio permitiram caracterizar as seguintes proteínas e/ou enzimas, com grandes possibilidades de serem biomarcadoras de mercúrio: *Parvalbumina* e suas isoformas; *Ubiquitin-40S proteína ribossômica S27a*; *GTP Cyclohydrolase 1 proteína reguladora de feedback* (GCHRF) e *Proteína de transmembrana 186*. Os *spots* proteicos caracterizados além de apresentarem relação estequiométrica entre os átomos de mercúrio por moléculas de proteína, apresentaram intensidade significativa nos géis, reforçando a possibilidade do uso dessas proteínas como possíveis biomarcadoras de mercúrio em peixes da região. De forma geral, os *spots* proteicos caracterizados e que apresentaram características de biomarcador poderão ser utilizados no acompanhamento, em nível proteômico, das concentrações tóxicas de mercúrio nas espécies de peixes da região amazônica.

CAPÍTULO III
IMPLICAÇÕES

Implicações

A metalômica vem crescendo como um novo campo de investigação que integra estudos de espécies metálicas com estudos de macromoléculas, mais especificamente as proteínas. O aprimoramento de métodos analíticos que permitem a investigação segura das metaloproteínas, inclusive àquelas que podem possuir maior afinidade com o mercúrio.

Esse trabalho contribui para o *start* de estudos metalaproteômicos relacionados com a toxicidade de mercúrio em peixes. Os *spots* proteicos caracterizados e que apresentaram características de biomarcador poderão ser utilizados no acompanhamento, em nível proteômico, das concentrações de mercúrio nas espécies de peixes estudadas.

Referências Bibliográficas

- [1] PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; SALOMONS, W.; MALM, O. Environment fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. *Environmental Reviews*, v. 1, p. 26-37, 1993.
- [2] BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ZARA, L. F.; ROCHA, J. C.; SANTOS A. Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. *Tectebel Energia*, 2009.
- [3] BIDONE, E. D.; CASTILHOS, Z. C.; SANTOS, T. J. S.; SOUZA, T. M. S.; LACERDA, L. D. Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho River, Amapá state, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 97, p. 9-15, 1997.
- [4] BARBOSA, A. C.; BOISCHIO, A. A.; EAST, G. A.; FERRARI, I.; GONÇALVES, A.; SILVA, P. R. M.; CRUZ, T. M. E. Mercury contamination in the Brazilian Amazon. Environmental and occupational aspects. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 80, p. 109-121, 1995.
- [5] BRAGA, C. P.; BITTARELLO, A. C.; PADILHA, C. C. F.; LEITE, A. L.; MORAES, P. M.; BUZALAF, M. A. R.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta*, v. 132, p. 239 - 244, 2015.
- [6] MORAES, P. M.; SANTOS, F. A.; PADILHA, C. C. F.; VIEIRA, J. C. S.; ZARA, L. F.; PADILHA P. M. A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from Amazonas, Brazil. *Biological Trace Element Research*, v. 150, p. 195-199, 2012.
- [7] LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SANTOS, F. A.; PEREZ, C. A.; DA SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR XRF and FAAS after 2D PAGE separation: preliminar results. *Talanta* 82: 1052-1056.
- [8] SANTOS, F. A.; LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M.

Metallomic study of plasma 108 samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: initial results. *Microchimica Acta*, v. 173, p. 43-49, 2011.

[9] NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; BALDASSINI, W. A.; SANTOS, F. A.; MORAES, P. M.; CASTRO, G. R.; PADILHA P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. *Química Nova* 35, 493-498, 2012.

[10] SYKES E., GRZYCH C., EPSTEIN E., KIECHLE F. L. Dextran interference in biuret-based assays for serum proteins. *Clin. Chem.* 33:1073, 1987.

[11] Pozzii, C. M ; BRAGA, C. P. ; VIEIRA, J. C. S. ; Cavecci, B. ; Queiroz, J. V. ; BARBOSA, HERBERT DE SOUZA ; ARRUDA, MARCO AURELIO ZEZZI ; GOZZO, FABIO CESAR ; PADILHA PM . Metal ions bound to the human milk immunoglobulin A: Metalloproteomic approach.. *Food Chemistry*, v. 166, p. 492-497, 2014.

[12] Baldassini, W. A. ; BRAGA, C. P. ; CHARDULO, L. A. L. ; Vasconcelos Silva J. A ; Malheiros J. M. ; De Albuquerque L. G. ; Fernandes T. T.; PADILHA PM . Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). *Food Chemistry*, v. 169, p. 65-72, 2014.

[13] SILVA, M. A. O.; GARCIA, J. S.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of sample preparation protocols for proteomic analysis of sunflower leaves. *Talanta*, v. 80, p. 1545-1551, 2010.

[14] Moraes, P.M., Santos, F.A., Cavecci, B., Padilha, C.C.F., Vieira, J.C.S., Roldan, P.S., Padilha, P.M., GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon. *Food Chem.* v. 141, p. 2614-2617. 2013.

[15] SILVA, F. A.; NEVES, R. C. F. ; QUINTERO-PINTO, L. G. ; PADILHA, C. C. F. ; JORGE, S. O. M. A. ; BARROS, M. M. ; PEZZATO, L. E.; PADILHA PM. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture.. *Chemosphere*, v. 68, p. 1542-1547, 2007.

- [16] MAMONE, G.; CAIRA, S.; GARRO, G.; NICOLAI, A.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, G.; MALORNI, A.; CHIANESE, L.; ADDEO, F. Casein phosphoproteome: identification of phosphoproteins by combined mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 24, p. 2824-2837, 2003.
- [17] WOOD, E. J. Textbook of biochemistry with clinical correlations. (Devlin, T. M.) 4.ed., *Wiley-Liss*, New York, 1186p., 1997.
- [18] GROSS, J. Introduction. In: Gross, J. Mass Spectrometry: A Textbook. 2.ed. *Springer*, p.1- 20, 2011.
- [19] PEARSON R. G. Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Society*, 85:3533-3539, 1963.
- [20] GARCIA, J. S.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through proteomic changes. *Metallomics*, v. 1, p. 107-113, 2009.
- [21] HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. Ion sources. In: Hoffman, E; Stroobant, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3.ed. *John Wiley and Sons*, p. 15-84, 2007.
- [22] GROSS, J. Electrospray Ionization. In: Gross, J. Mass Spectrometry: A Textbook. 2.ed. *Springer*, p.560-620, 2011.
- [23] GUERRERA, I. C.; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience Reports*, v. 25, p. 71-93, 2005.



Figura 1 – Pontos de coleta na Bacia do rio Madeira

Fonte: *Moraes et al.*, 2014

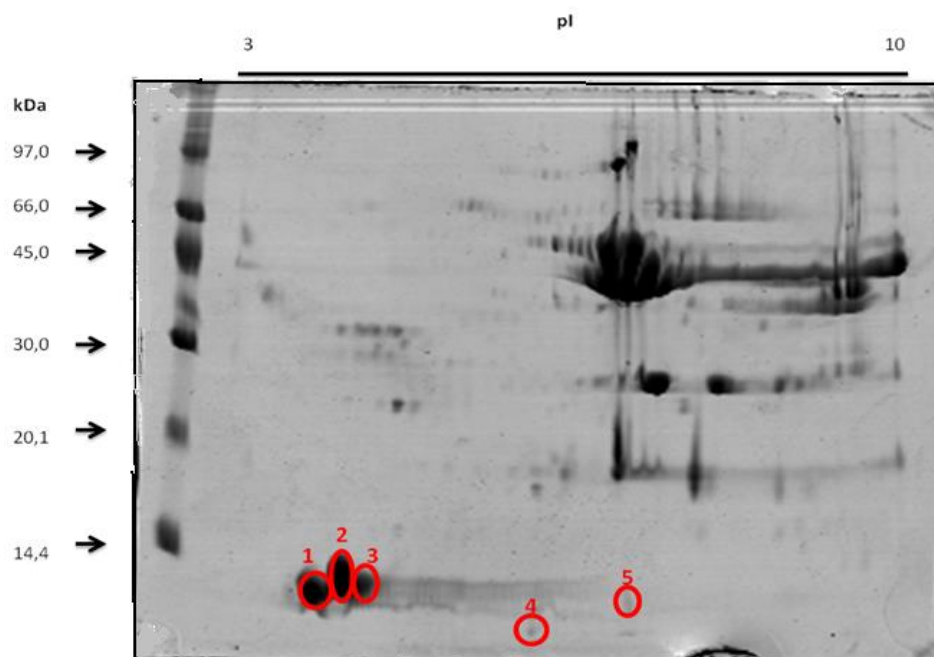


Figura 2. Gel a 15% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de tucunaré. Os números e círculos em vermelho indicam os spots nos quais foram identificadas a presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS/MS.

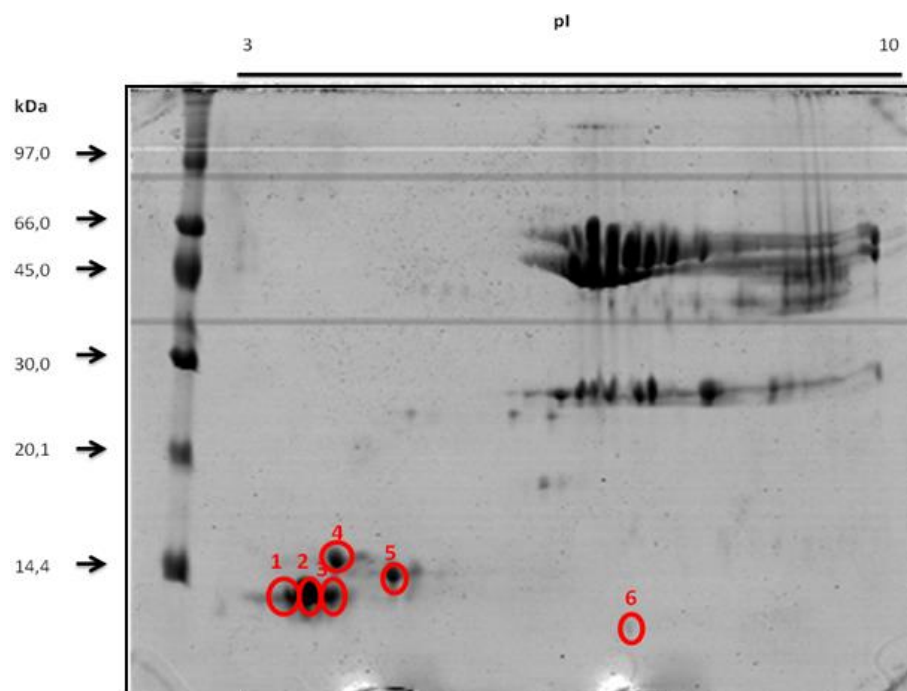


Figura 3. Gel a 15% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de filhote. Os números e círculos em vermelho indicam os spots nos quais foram identificadas a presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS/MS.

Tabela 1. Resultados obtidos na determinação de mercúrio nos pellets de maior e menor massa molar (Mm), nas amostras de tecido muscular (TM) de tucunaré e filhote.

Espécies de peixes	Pellets de TM (>Mm)	Pellets de TM (<Mm)	Tecido Muscular
Tucunaré	n.d.	290 ± 4	435 ± 11
Filhote	n.d.	248 ± 3	378 ± 9
DORM 4 –NRC*	-	-	408 ± 3

Concentração de mercúrio em $\mu\text{g kg}^{-1}$; n.d. – não detectado.

*Padrão certificado de proteína de músculo de peixe contendo $410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 2. Valores obtidos na determinação da concentração de mercúrio por GFAAS nos spots proteicos das amostras de tecido muscular de tucunaré e filhote.

Spots Proteicos	Massa Molar (kDa)	pI	Massa de proteína (μ g)	Concentração de Hg (mg g ⁻¹)	Nº de moléculas no spot proteico x10 ¹²	Nº de átomos de mercúrio x10 ¹²
T1	12,40	3,80	14,80	16,50	704	733
T2	13,00	4,10	23,90	15,10	1100	1083
T3	12,70	4,30	11,10	15,60	530	520
T4	11,60	6,10	0,30	17,10	16	15
T5	11,90	7,20	0,33	16,90	17	18
F1	13,00	3,50	4,40	15,20	204	201
F2	13,10	3,80	22,40	15,50	1030	1042
F3	13,00	4,00	9,30	14,90	430	416
F4	14,40	4,20	5,40	13,90	230	225
F5	14,00	4,70	5,00	13,60	215	204
F6	12,00	7,30	0,12	16,50	6	6

T1–T5 spots do músculo de tucunaré; F1–F6 spots do músculo de filhote.

Tabela 3. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido muscular de tucunaré.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm do spot	Mm ESI	Mm teórica Uniprot	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
T1	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	956.2759	3,80/12,40	12.25	11.62	21.1	LFLQNFSAGAR IGVDEFALLVK NFFAKVGLSAK IGVDEFALLVKA
	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	563.0951		11.82	11.45	10.09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	136.415		11.97	11.26	19.81	SGFIEEEEELK IGIDEFAALVK IGIDEFAALVKA
T2	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	337.1367	4,10/13,00	12.25	11.62	28.44	LFLQNFSAGAR DEDVAAALK IGVDEFALLVK
	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	286.4008		11.98	11.26	19.81	SGFIEEEEELK IGIDEFAALVK
T3	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	178.6003	4,30/ 12,70	11.816	11.45	10.09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	178.6003		12.253	11.62	10.09	LFLQNFSAGAR
T4	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_ICTPU	106.5555	6,10/ 11,60	19.76	17.90	5.77	ESTLHLVLR
T5	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	99.6065	7,20/1,90	11.816	11.451	10.09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	99.6065		12.253	11.622	10.09	LFLQNFSAGAR

Tabela 4. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido muscular de filhote.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm do spot	Mm ESI	Mm teórica Uniprot	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
F1	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	53.4902	3,50/ 13,00	11.979	11.263	9.43	SGFIEEEELK
F2	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	221.4044	3,80/3,10	11.979	11.263	9.43	SGFIEEEELK
F3	GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein	GFRP_DANRE	145.1465	4,00/13,00	10.304	10.018	28.09	LETGPTMVGDEYSDPSIMNYLGARK
F4	Não identificada	-	-	-	-	-	-	-
F5	Transmembrane protein 186	TM186_DANRE	51.5611	4,70 /14,00	26.093	25.720	8.77	DIYVPVSDVVTLGDSGDSR RDIYVPVSDVVTLGDSGDSR
F6	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_ICTPU	303.1158	7,30/12,00	19.764	17.999	25.00	ESTLHLVLR TLTGKTITLEVEPSDTIENVK