ISSN:2594-6153

Avaliação metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos biliares e atividade da acetilcolinesterase em *Centropomus parallelus* de estuários paulistas

Wilton R.S. Santos[1]; Marthe M. Gagnon[4]; Marco Aurélio M. Soares[2]; Lincoln G. S. Aquino[3]; Gustavo A. Loch[3]; Marco T. Grassi[3]; Camilo D. Seabra[1-5]; Milena Ramires[1]; Helen Sadauskas-Henrique[1,2].

[1] Universidade Santa Cecília (Unisanta), Brasil.
[2]Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), Brasil.
[3]Universidade Federal do Paraná (UFPR), Brasil.
[4]Curtin University, Austrália.
[5]Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) – Campus Baixada Santista

E-mail: wiltonrodrigues77@gmail.com

Resumo: Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são contaminantes associados às atividades antrópicas. Este estudo avaliou a exposição a HPAs em exemplares de *Centropomus parallelus* coletados no Porto de Santos, SP (área contaminada), e na Reserva de Desenvolvimento Sustentável (RDS) Barra do Una (área de referência). Na área contaminada, foram detectados HPAs nos sedimentos, enquanto, na área de referência, esses compostos não foram identificados. Os metabólitos biliares equivalentes a benzo[a]pireno (BaP), pireno e naftaleno apresentaram maiores concentrações nos peixes da área contaminada, onde também foi observada inibição da atividade da acetilcolinesterase. Os resultados indicam maior exposição aos HPAs no Porto de Santos e reforçam a importância da integração de indicadores ambientais e biomarcadores biológicos na avaliação da contaminação em ambientes costeiros.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; *Centropomus parallelus*; Metabólitos biliares; Acetilcolinesterase.

Evaluation of biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and acetylcholinesterase activity in *Centropomus parallelus* from estuaries

Abstract: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are contaminants associated with anthropogenic activities. This study evaluated PAH exposure in *Centropomus parallelus* specimens collected from the Port of Santos, São Paulo State (contaminated area), and the Barra do Una Sustainable Development Reserve (reference area). PAHs were detected in sediments from the contaminated area, whereas these compounds were not detected in the reference area. Biliary metabolites equivalent to benzo[a]pyrene (BaP), pyrene, and naphthalene were found at higher concentrations in fish from the contaminated area, where inhibition of acetylcholinesterase activity was also observed. These findings indicate greater PAH exposure in the Port of Santos and reinforce the importance of integrating environmental indicators and biological biomarkers when assessing contamination in coastal environments.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; *Centropomus parallelus*; Biliary metabolites; Acetylcholinesterase.

Introdução

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são contaminantes orgânicos lipofílicos e persistentes, provenientes de atividades como lançamento de efluentes, derramamentos de óleo e queima de combustíveis. Amplamente distribuídos no ambiente, alguns desses compostos apresentam potencial genotóxico, carcinogênico e teratogênico [1,2].

Os peixes podem ser utilizados como bioindicadores da presença de HPAs. O robalo-peva (*Centropomus parallelus*) apresenta características ecológicas e respostas biológicas à exposição a derivados de petróleo que favorecem seu uso no monitoramento ambiental [3]. A análise de metabólitos de HPAs na bile permite avaliar a exposição recente dos peixes, enquanto alterações na atividade da acetilcolinesterase (AChE) podem indicar possíveis efeitos neurotóxicos [4–6].

Objetivos

Compreender as respostas biológicas em áreas com diferentes níveis de influência antrópica (canal do Porto de Santos, local considerado poluído, e RDS Barra do Una, considerado um local pristino) avaliando a ocorrência de HPAs em sedimentos, seus metabólitos na bile e a atividade da AChE muscular de *Centropomus parallelus*.

Material e Métodos

Exemplares de *Centropomus parallelus* foram coletados com vara e isca artificial na região da Capitania dos Portos, em Santos, e na RDS Barra do Una, em Peruíbe. Após anestesia com óleo de cravo, foram coletadas amostras de músculo e bile, armazenadas a −80 °C. Também foram coletadas amostras de sedimento no Porto de Santos (n = 3) e na RDS Barra do Una (n = 2). Os sedimentos foram liofilizados, homogeneizados e submetidos à extração com acetonitrila e diclorometano (1:5, v/v), utilizando padrão *surrogate*. Os HPAs foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), e suas concentrações, expressas em μg kg^{-1} de sedimento seco, foram comparadas aos valores orientadores da Resolução CONAMA nº 454/2012.

Os metabólitos biliares de HPAs foram determinados por fluorescência fixa. As amostras foram diluídas em metanol e analisadas nos comprimentos de excitação/emissão de 340/380 nm para pireno, 380/430 nm para BaP e 290/335 nm para naftaleno. Foram utilizados 1-hidroxipireno e 1-naftol como padrões, e os resultados foram normalizados pela concentração de proteínas [8,9]. Para a determinação da acetilcolinesterase, o músculo foi

homogeneizado em tampão fosfato 0,1 M com 20% de glicerol (1:4, m/v; pH 7,5) e centrifugado a 12.000 × *g* por 20 minutos, a 4 °C. A atividade foi determinada a 405 nm, utilizando iodeto de acetilcolina e DTNB, e expressa em nmol min^{-1} mg de $proteína^{-1}$ [10]. As diferenças entre os locais foram avaliadas pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Resultados

Foram detectados os HPAs fenantreno (95,9 ± 11,5 µg kg^{-1}), fluoranteno (182,8 ± 154,0 µg kg^{-1}), pireno (104,1 ± 53,0 µg kg^{-1}), benzo[k]fluoranteno (29,1 ± 8,7 µg kg^{-1}), benzo[a]pireno (146,3 ± 25,1 µg kg^{-1}) e indeno[1,2,3-cd]pireno (45,6 µg kg^{-1}), resultando em concentração total de 447,2 ± 226,3 µg kg^{-1} nas amostras de sedimento no local contaminado. Não foram detectados HPAS no local referência (Tabela 1):

Tabela 1. Concentrações dos HPAs prioritários em sedimentos das áreas de referência (RDS Barra do Una) e contaminada (Porto de Santos-SP), expressas em média ± erro-padrão (µg kg^{-1}), comparadas aos Níveis 1 e 2 da Resolução CONAMA nº 454/2012 para sedimentos de águas salinas e salobras. ΣHPA = somatório dos HPAs detectados.

HPA	**Referência**	**Poluído**	CONAMA 454/2012	
	µg kg^{-1}		**Nível 1**	**Nível 2**
Fenantreno	<LOD	95,9 ± 11,5	240	1500
Fluoranteno	<LOD	182,8 ± 154,0	600	5100
Pireno	<LOD	104,1 ± 53,0	665	2600
Benzo[b]fluoranteno	<LOD	41,6 ± 34,0	–	–
Benzo[k]fluoranteno	<LOD	29,1 ± 8,7	–	–
Benzo[a]pireno	<LOD	146,3 ± 25,1	230	760
ΣHPA	**-**	**447,2 ± 226,3**	–	–

Nota: <LOD = concentração abaixo do limite de detecção **(µg kg^{-1}):** PHE = 2,5; FLT = 3,6; PYR = 2,7; BbF = 4,5; BkF = 5,6; BaP = 3,6.

A avaliação dos metabólitos biliares de HPAs revelou concentrações significativamente maiores nos peixes do local contaminado em relação ao local referência (Figura 1).

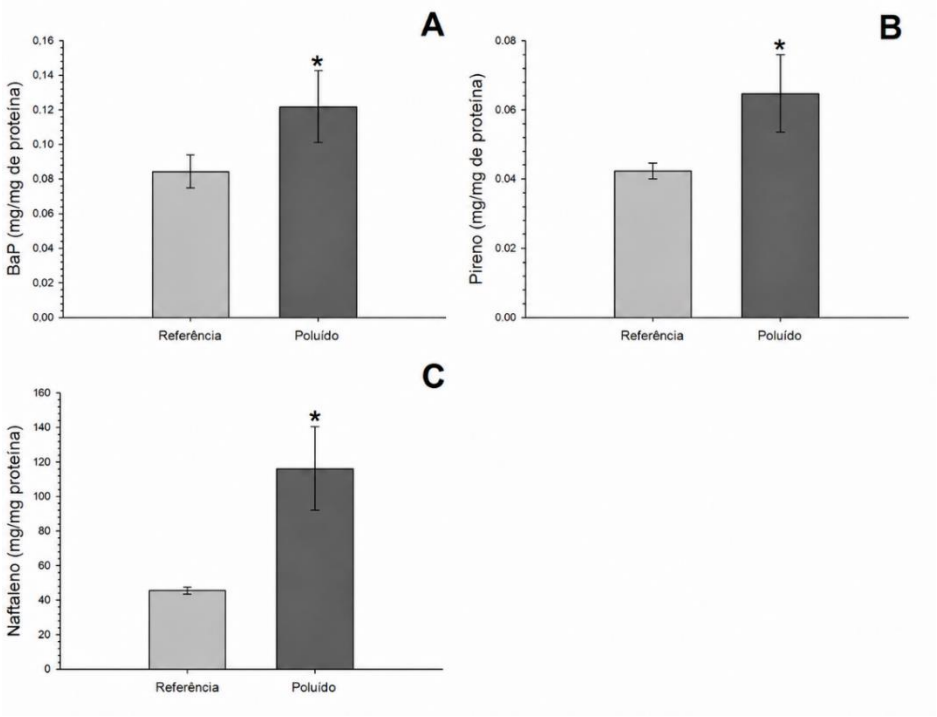

Figura 1. Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile de *C. parallelus* coletados nos locais de referência (RDS Barra do Una) e poluído (Porto de Santos). (A) Benzo[a]pireno (BaP), (B) Pireno e (C) Naftaleno. Sinal de asterisco indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Foi observada uma inibição da enzima acetilcolinesterase muscular de *C. parallelus* coletados no local poluído em relação ao local contaminado (Figura 2).

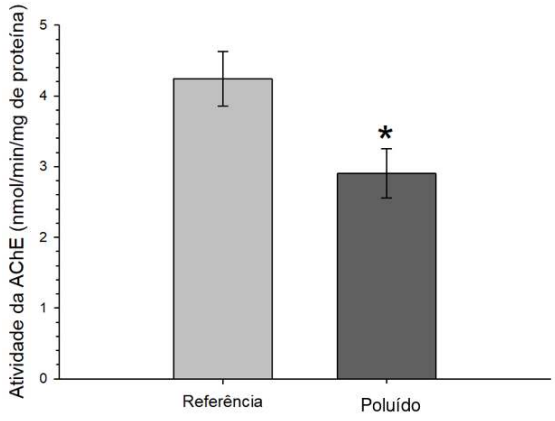

Figura 2. Atividade da enzima acetilcolinesterase muscular de *C. parallelus* coletados nos locais de referência (RDS Barra do Una) e poluído (Porto de Santos).* indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Discussão

Os sedimentos coletados no Porto de Santos apresentaram concentrações de HPAs, embora inferiores aos valores orientadores. Esses resultados corroboram a presença de

metabólitos biliares de HPAs em *C. parallelus* coletados nesse local, evidenciando maior influência antrópica. A presença de HPAs nos sedimentos e a metabolização desses compostos podem estar relacionadas à inibição da acetilcolinesterase muscular observada nos peixes do Porto de Santos. A inibição dessa enzima pode provocar o acúmulo de acetilcolina nas sinapses, comprometendo a transmissão neuromuscular e funções como locomoção, alimentação e resposta de fuga. Resultados semelhantes foram observados na Baía de Santos, demonstrando diferenças na biodisponibilidade e nos efeitos dos HPAs sobre os peixes [11].

Conclusão

A maior presença de HPAs no sedimento, associada aos metabólitos biliares e à inibição da AChE, evidencia maior exposição e possíveis efeitos neurotóxicos em *C. parallelus* no local poluído.

Agradecimentos: Curtin University, Capitania dos Portos de Santos, CNPq, CAPES (código 001).

Referências

1. Guimarães, I. D. L.; Monteiro, F. C.; Pinho, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic animals: a systematic review on analytical advances and challenges. Journal of Environmental Science and Health, Part A, v. 57, n. 3, p. 198-217, 2022.
2. Jesus, F.; Pereira, J. L.; Campos, I.; Santos, M.; et al. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons distribution in freshwater ecosystems and their toxicity to benthic fauna. Science of The Total Environment, v. 820, 153282, 2022.
3. Medeiros, L. C. C.; Delunardo, F. A. C.; Simões, L. N.; et al. Water-soluble fraction of petroleum induces genotoxicity and morphological effects in fat snook (*Centropomus parallelus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 144, p. 275-282, 2017.
4. Beyer, J.; Jonsson, G.; Porte, C.; et al. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 30, n. 3, p. 224-244, 2010.
5. Dearnley, J. M.; Killeen, C.; Davis, R. L.; et al. Monitoring polycyclic aromatic compounds exposure in fish using biliary metabolites. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v. 52, n. 4, p. 475-519, 2022.
6. Olivares-Rubio, H. F.; Espinosa-Aguirre, J. J. Acetylcholinesterase activity in fish species exposed to crude oil hydrocarbons: A review and new perspectives. Chemosphere, v. 264, 128401, 2021.
7. Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 454, de 1º de novembro de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 nov. 2012.
8. Krahn, M. M.; Rhodes, L. D.; Myers, M. S.; et al. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 15, n. 1, p. 61–67, 1986.
9. Lin, E. L.; Cormier, S. M.; Torsella, J. A. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: comparison with HPLC-fluorescent detection. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 35, p. 16–23, 1996.

10. Ellman, G. L.; Courtney, K. D. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, v. 7, p. 88–95, 1961.
11. Patire, V. F.; De Albergaria-Barbosa, A. C. R.; Barreto, I. S.; et al. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in Santos Bay (Brazil) and its adjacent continental shelf. Ocean and Coastal Research, 2024.