

Monitoramento longitudinal da contaminação de peixes por mercúrio e avaliação de riscos à saúde humana por ingestão de pescado contaminado

Longitudinal monitoring of mercury contamination of fish and human health risks assessment from ingestion of contaminated fish

Thainá de Lima Farinchon
Bolsista PCI, Bióloga

Zuleica Carmen Castilhos
Supervisora, Bioquímica, D.Sc.

Resumo

Este trabalho apresenta os resultados relacionados à identificação taxonômica e molecular de peixes coletados no Rio Branco-RR, utilizando um protocolo propositivo e em melhoria contínua. O protocolo foi proposto a partir de revisão bibliográfica. As análises de identificação molecular realizadas por sequenciamento de DNA confirmaram as identificações taxonômicas iniciais. Os peixes carnívoros na sua maioria e os peixes não carnívoros apresentaram concentrações abaixo do limite máximo permitido para comercialização (1,0 mg/kg e 0,5 mg/kg, respectivamente). Entretanto, estas concentrações de HgT em peixes pode representar risco à saúde da população ribeirinha amazônica pelas altas taxas de consumo de pescado. A avaliação de risco à saúde humana será realizada em trabalho futuro, após incremento de amostragem de peixes no Rio Branco para abordagem longitudinal. Importante ressaltar que os peixes coletados neste estudo são os primeiros peixes amazônicos a compor o maior banco de dados de identificação molecular da América do Sul.

Palavras-chave: peixes, mercúrio, identificação molecular, amostragem, protocolo.

Abstract

This work presents the results related to the taxonomic and molecular identification of fish collected in the Rio Branco-RR, using a proactive and continuously improving protocol. The protocol was proposed based on a literature review. Molecular identification analyses carried out by DNA sequencing confirmed the initial taxonomic identifications. Carnivorous fish, for the most part, and non-carnivorous fish showed concentrations below the maximum allowed limit for commercialization (1.0 mg/kg and 0.5 mg/kg, respectively). However, these concentrations of total mercury (HgT) in fish may pose a risk to the health of the Amazonian riverside population due to high fish consumption rates. The assessment of human health risk will be conducted in future work after increasing the fish sampling in the Rio Branco for a longitudinal approach. It is important to emphasize that the fish collected in this study are the first Amazonian fish to contribute to the largest molecular identification database in South America.

Keywords: fish, mercury, molecular identification, sampling, protocol.

1. Introdução

O mercúrio é um poluente global. É transportado a longas distâncias na atmosfera, podendo impactar áreas distantes do local de emissão. A mineração artesanal e de pequena escala (MAPE) de ouro mundial é uma importante fonte de Hg para a atmosfera, sendo responsável por 37% -40% das emissões de mercúrio em escala global (AMAP / UNEP, 2013).

Em ambiente aquático, o Hg pode ser biotransformado em metilmercúrio (MeHg). Este possui a capacidade de bioacumular e de biomagnificar na cadeia trófica aquática, atingindo as mais altas concentrações nos mais elevados níveis tróficos, como por exemplo, em peixes carnívoro-piscívoros (DRISCOLL et al., 2013). A ingestão de peixes contaminados é a principal, senão única, via de exposição humana ao MeHg, uma conhecida neurotoxina em adultos e com ação teratogênica neurotóxica em fetos humanos (HARADA, 1978; CLARKSON, 1991).

A população residente nas proximidades de garimpos de ouro na região amazônica convive direta e cotidianamente com os impactos desta atividade, incluindo a contaminação por mercúrio, em todo o sistema ecológico. A contaminação dos peixes por metilmercúrio é uma das piores consequências, uma vez que o consumo de pescado é a principal fonte de proteína para as populações.

O Brasil é signatário da Convenção de Minamata que visa reduzir as emissões e liberações de mercúrio com a finalidade de proteger a saúde humana e o meio ambiente. O monitoramento longitudinal de mercúrio em peixes se tornou de grande importância uma vez que permite acompanhar as tendências da contaminação na Amazônia, conferindo se os objetivos da convenção estão sendo alcançados.

Uma das principais formas de acompanhar a variação dos níveis de mercúrio em determinada região, ao longo do tempo, é pelo monitoramento de seus teores em peixes. Estes estudos têm atraído bastante atenção da comunidade científica nas últimas décadas. Sabe-se que os teores de mercúrio variam linearmente com o tempo de exposição dos peixes (bioacumulação) e com o hábito alimentar das espécies (biomagnificação). Por isto, a necessidade de registrar os dados sobre tamanho e peso dos indivíduos coletados e da identificação taxonômica inequívoca, o que tem sido mais recentemente realizada pela identificação molecular através do sequenciamento de DNA de peixes.

Entretanto, alguns autores têm alertado para a carência, em artigos sobre o tema e até em bancos de dados, de importantes informações para a interpretação de teores de mercúrio em peixes. Incluem-se os padrões espaciais e temporais, tamanho e nome científico das espécies, esforço de pesca, entre outros (Moulton et al, 2002; Sá e Castilhos, 2022). Ainda, há grande dificuldade em estabelecer padronização de coleta sistemática de peixes por conta de diversos fatores (distância dos centros urbanos, alojamentos precários, difícil acesso e deslocamento, dificuldades de acesso a sistemas hidrográficos, circunstâncias do tempo no momento da coleta, etc.) (Loebmann et al, 2005; Lima et al, 2011), que restringem a amostragem. A utilização de diversas metodologias de amostragem dificulta a comparação entre os resultados dos estudos (Pavione et al, 2019), bem como os estudos longitudinais. Por isto é fundamental buscar um protocolo que contemple todas as informações

necessárias para a melhor avaliação longitudinal da contaminação por mercúrio em peixes, visando revelar as tendências ao longo do tempo em um determinado espaço. E adequar o protocolo à realidade da imensa biodiversidade da região Amazônica. A partir dos resultados desta avaliação da contaminação de peixes por mercúrio é possível associar os riscos à saúde humana (USEPA, 1989; CASTILHOS et al., 2005).

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo apresentar um estudo piloto para a avaliação da contaminação por mercúrio em peixes da Amazônia, utilizando um protocolo propositivo; e os resultados relacionados à identificação taxonômica e molecular dos peixes.

3. Material e Métodos

3.1 Revisão Bibliográfica

A revisão bibliográfica buscou informações sobre os parâmetros necessários para elaboração de um protocolo de amostragem e sobre a avaliação de risco de saúde humana (MATA et al, 2019; USEPA, 1989; CASTILHOS, et al, 2005).

3.2 Coleta de Peixes

Em fevereiro de 2023, em parceria com o ICMBio de Boa Vista-RR, foram coletados 22 peixes no alto e no baixo Rio Branco, em Boa Vista-RR e em Caracaraí-RR, respectivamente. Estes foram medidos, pesados e fotografados.

Os peixes foram identificados em nível de espécie (Dr. Sylvio Romério Briglia Ferreira, ICMBio RR) e nível trófico (FROESER et al, 2005). Amostras de tecido muscular foram retiradas e congeladas e posteriormente encaminhados para o Laboratório de Especificação de Mercúrio Ambiental – LEMA/CETEM para análise de mercúrio.

3.3 Análise de Mercúrio

A quantificação de mercúrio total das amostras de tecido muscular dos peixes foi realizada no LEMA. A técnica utilizada foi espectrometria de absorção atômica acoplada a forno de grafite (AAS GF), sem a utilização de pré-tratamentos. O limite de detecção de 0,0005mg/Kg, e o limite de quantificação é 0,009mg/kg do método. Foram realizadas análises em triplicata de cada amostra e a cada 30 amostras analisadas foi analisado material de referência certificado (MRC) como medida de controle da qualidade dos resultados.

3.4 Identificação Molecular

As análises de identificação molecular foram realizadas pelo Centro Nacional de Identificação Molecular de Pescado – CENIMP/UFRJ. O DNA genômico foi extraído utilizando cerca de 10mg de músculo previamente conservado em álcool 96%. A PCR (reação em cadeia da polimerase) foi feita para amplificar fragmentos de genes dos DNA extraídos, para que pudessem ser sequenciados e assim identificados. Os produtos da PCR

foram purificados e sequenciados. As sequências de DNA foram editadas e depois comparadas com a base de dados GenBank utilizando uma pesquisa Blast no software Geneious. A reconstrução filogenética foi realizada usando a máxima verossimilhança, conforme implementado no pacote IQ-Tree (MINH et al., 2020), com o modelo de substituição de dois parâmetros de Kimura (K2P) (KIMURA, 1980) definido a priori como o modelo mais usado e bem estabelecido para análise forense de produtos de frutos do mar (DELPIANI et al., 2020).

4. Resultados

Os peixes foram identificados taxonomicamente em uma primeira fase pelo ICMBio-RR, em: *Pseudoplatystoma tigrinum* (N=1), *Leporinus agassizii* (N=2), *Brycon falcatus* (N:4), *Hypophthalmus marginatus* (N=3), *Pirirampus pirinampu* (N=4), *Calophysus cf. macropterus* (N=3), *Pygocentrus nattereri* (N=3), *Piaractus brachypomus* (N=2). Ao término das identificações moleculares foram feitas comparações com o banco internacional – National Library of Medicine - Nucleotide BLAST. Os resultados apresentaram mais de 95% de compatibilidade quando comparados, confirmando o que foi identificado inicialmente. Este material está depositado no CENIMP/UFRJ.

Os teores de mercúrio total (HgT) em tecido muscular de peixes encontram-se na Tabela 1

Tabela 1. Nome científico, hábito alimentar (HA) e teores de mercúrio total (mg/kg; peso úmido) em tecido muscular de peixes.

Nome Científico	HA	HgT (mg/kg)	Nome Científico	HA	HgT (mg/kg)
<i>Brycon cf falcatus</i>	NC	<LD	<i>Piaractus brachypomus</i>	NC	<LD
<i>Brycon cf falcatus</i>	NC	0,074	<i>Piaractus brachypomus</i>	NC	<LD
<i>Brycon falcatus</i>	NC	0,094	<i>Pirirampus pirinampu</i>	C	0,963
<i>Brycon falcatus</i>	NC	0,105	<i>Pirirampus pirinampu</i>	C	2,836
<i>Calophysus cf. macropterus</i>	C	1,013	<i>Pirirampus pirinampu</i>	C	2,508
<i>Calophysus cf. macropterus</i>	C	0,821	<i>Pirirampus pirinampu</i>	C	0,789
<i>Calophysus cf. macropterus</i>	C	1,062	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	NC	0,134
<i>Hypophthalmus marginatus</i>	C	0,606	<i>Pygocentrus nattereri</i>	NC	0,262

<i>Hypophthalmus marginatus</i>	C	0,507	<i>Pygocentrus nattereri</i>	NC	0,433
<i>Hypophthalmus marginatus</i>	C	0,602	<i>Pygocentrus nattereri</i>	NC	0,44
<i>Leporinus agassizii</i>	NC	0,051			
<i>Leporinus agassizii</i>	NC	0,081			

C=Carnívoro; NC=Não carnívoro

Os resultados mostraram que os peixes carnívoros na sua maioria apresentaram concentrações dentro do máximo recomendado (1,0 mg/kg), apenas dois peixes da espécie *Pinirampus pirinampu* apresentaram níveis de HgT acima do recomendado pela Legislação Resolução – RDC N°42, de 29 de agosto de 2013. Os peixes não carnívoros apresentaram concentrações abaixo do máximo recomendado (0,5 mg/kg) pela Legislação Resolução – RDC N°42, de 29 de agosto de 2013.

Sá & Castilhos, 2022 organizaram dados primários de teores de mercúrio em pescado, gerados no LEMA de 2000 a 2021, visando informações sobre: o projeto de pesquisa, responsável pela coleta, data de coleta dos espécimes (dia/mês e ano), ambiente de coleta (sub-bacia de nível 4, sub-bacias e bacias hidrográficas; coordenadas geográficas), o nome popular e científico dos peixes, o profissional responsável pela identificação taxonômica, o hábito alimentar da espécie, o tamanho e peso dos peixes e o teor de mercúrio total em peso úmido, ou em peso seco e umidade. Foram observadas lacunas importantes nestas informações básicas, que se repetiram em uma série de artigos científicos publicados. Estas lacunas poderão ser superadas com a elaboração de um protocolo orientador de amostragem de pescado para quantificação de mercúrio e avaliação de risco à saúde humana e risco ecológico.

5. Conclusão

O protocolo de coleta utilizado no estudo piloto mostrou-se útil e está em contínua melhoria. Os teores de mercúrio nos peixes coletados no Rio Branco estão dentro dos limites da legislação. Entretanto, é preciso considerar que a população amazônica consome pescado em altas taxas, o que pode resultar em riscos à saúde humana. Estudos futuros irão abordar este tema, bem como incrementar a amostragem de peixes da bacia hidrográfica do Rio Branco. Importante ressaltar que os peixes coletados neste estudo são os primeiros peixes amazônicos a compor o maior banco de dados de identificação molecular da América do Sul.

6. Agradecimentos

A autora agradece ao Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) pela infraestrutura, ao Programa Institucional de Bolsa de Capacitação Institucional – PCI/CNPq pela concessão da bolsa, à supervisora Dra. Zuleica Carmen

Castilhos, ao Dr. Romério Briglia (ICMBio-RR), ao Prof. Dr. Antônio Solé (coordenador do CENIMP) e a todas e todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

7. Referências Bibliográficas

AMAP/UNEP. Technical Background Report for the Global Mercury Assessment 2013. Oslo: Arctic Monitoring and Assessment Programme / Geneva: UNEP Chemicals Branch, 2013.

BRASIL. Resolução RDC Nº 42 de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Brasília, DF. Diário Oficial da União Nº168, 2013.

CASTILHOS, Z.C.; CASTRO, A.M.; RAMOS, A.S.; LIMA, C.A.; RODRIGUES, A.P.C. Avaliação de risco à saúde humana: conceitos e metodologia. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2005. (Série Estudos e Documentos, 65).

CLARKSON, T. Methylmercury. *Toxicological Sciences*, v. 16 (1), p. 20-21, 1991.

DRISCOLL, T.C.; MASON, R.P.; CHANG, H.M.; JACOB, D.J.; PIRRONE, N. Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Environmental Science & Technology*, 2013.

EPA, U.S.E.P.A. Guidelines for Ecological Risk Assessment. *Federal Register*, v. 63, n. April, p. 26846-26924, 1998.

FROESE, R. & PAULY, D. (eds.) 2005. FishBase, World Wide Web electronic publication. Disponível em <http://www.fishbase.org>, version (11/2005). Consulta em outubro de 2023.

GUIMARÃES, K.L.A.; ROSSO, J.J.; SOUZA, M.F.B.; ASTARLOA J.M.D.; RODRIGUES, L.R.R.; Taxonomia integrativa revela distribuição disjunta e primeiro registro de *Hoplias misionera* (Characiformes: Erythrinidae) na bacia do rio Amazonas: considerações morfológicas, código de barras de DNA e citogenéticas. *Neotrop ictiol* [Internet]. 2021;19(2):e200110. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0110>

HARADA, M. Congenital Minamata disease: intrauterine methylmercury poisoning. *Teratology*, v. 18, p. 285-288, 1978.

JUNQUEIRA, Nara Tadini, Luiz Fernando Magnago, and Paulo Santos Pompeu. Assessing fish sampling effort in studies of Brazilian streams. *Scientometrics* 123 (2020): 841-860.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980 Dec;16(2):111-20. doi: 10.1007/BF01731581. PMID: 7463489.

LIMA, F.C.T. de, & CAIRES, R.A. (2011). Peixes da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins, bacias dos Rios Tocantins e São Francisco, com observações sobre as implicações biogeográficas das "águas emendadas" dos Rios Sapão e Galheiros. *Biota Neotropica*, 11(1), 231-250. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000100024>.

LOEBMANN, D., & VIEIRA, J.P. (2005). Distribuição espacial e abundância das assembléias de peixes no Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira De Zoologia*, 22(3), 667-675. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752005000300023>.

MATA, P.P; COSTA K.G; PERÔNICO, C; MCMASTER, M.E; PARROTT, J.L; HEWITT, L.M; MUNKITTRICK, K.R; BARRETO F.C.C; BASILO, T.H, GOMES, M.P; REIS. F. R.W; FURLEY, T.H. Development of environmental effects monitoring protocol in Brazil: a fish guide study of three river estuaries. *Environ Monit Assess*. 2019 Oct 19;191(11):658. doi: 10.1007/s10661-019-7860-y. PMID: 31630267.

MINH, Q.B.; SCHMIDT, A.H.; CHERNOMOR, O.; SCHREMPF, D.; WOODHAMS, M.D.; HAESELER, A.V.; LANFEAR, R.; IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 37, Issue 5, May 2020, Pages 1530-1534, <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.

SÁ, M.R.; CASTILHOS, Z.C.; DOMINGOS, L.M.B. Avaliação Espaço-Temporal de Teores de Mercúrio em Peixes da Amazônia (2000-2022) XXX Jornada de Iniciação Científica e VI Jornada de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação CETEM RJ 2022.

USEPA; United States Environmental Protection Agency. Risk Assessment Guidance for Superfund, 1989. V.I: Human Health Evaluation Manual.