

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ANIMAL
NÍVEL: MESTRADO

Daiane Garcia Anzolin

ANÁLISE DE CONTAMINANTES E BIOMARCADORES EM
PEIXES-BOIS MARINHOS (*TRICHECHUS MANATUS*)

RECIFE
2011

DAIANE GARCIA ANZOLIN

ANÁLISE DE CONTAMINANTES E BIOMARCADORES EM
PEIXES-BOIS MARINHOS (*TRICHECHUS MANATUS*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Paulo S.M. Carvalho

Co-Orientador:

Prof. Dr. Antonio da Silva Souto

RECIFE
2011

Anzolin, Daiane Garcia

Análise de contaminantes e biomarcadores em peixes-bois marinhos (Trichechus Manatus) / Daiane Garcia Anzolin. – Recife: O Autor, 2011.

81 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Paulo S. M. carvalho

Co-Orientador: Antonio da Silva Souto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia Animal, 2011.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Peixe-boi 2. Mamífero marinho 3. Sangue análise e química 4. Animais – Comportamento I. Título.**

597.64

CDD (22.ed.)

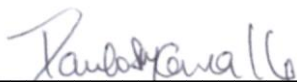
UFPE/CCB-2011-107

DAIANE GARCIA ANZOLIN

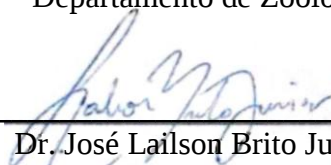
ANÁLISE DE CONTAMINANTES E BIOMARCADORES EM
PEIXES-BOIS MARINHOS (*TRICHECHUS MANATUS*)

Defendida em: 15/02/2011

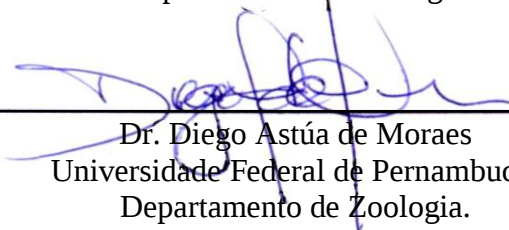
BANCA EXAMINADORA:



Dr. Paulo Carvalho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Zoologia



Dr. José Lailson Brito Junior.
Universidade Estadual do Rio de Janeiro
Departamento de Ecologia.



Dr. Diego Astúa de Moraes
Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Zoologia.



Dra. Inês de Lima Serrano
Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos – CMA/ICMBio

Dr. José Roberto Botelho de Souza (Suplente interno)
Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Zoologia.

Dra. Nicola Schiel (Suplente externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Biologia.

Dedico este trabalho a todos os animais que
fizeram parte da minha formação acadêmica,
em especial aos peixes-bois
Maya, Noel e Petrus.

Agradecimentos

Agradeço a *Deus* pela proteção durante toda execução deste trabalho, principalmente nas atividades de campo e viagens para realização das análises. Ele me concedeu coragem, equilíbrio e paciência que não julguei possuir.

Ao meu noivo *João Carlos Gomes Borges*, pela paciência, dedicação e por não medir esforços em ajudar no que fosse preciso, seja financeiramente, intelectualmente ou psicologicamente. Pelo apoio e incentivo fundamentais nas horas difíceis e nos desafios (que não foram poucos) ao longo da execução deste trabalho.

A minha família (*Edmar, Vera, Samira e Andrezza*) pelo apoio emocional e financeiro, mesmo sem compreenderem a real importância deste estudo apoiaram (a distância) de forma incondicional em todos momentos necessários, vibrando com cada conquista adquirida.

Ao *Paulo S. M. Carvalho* meu orientador, pela paciência, apoio e por confiar em mim e aceitar orientar esta pesquisa mesmo não estando diretamente ligado às atividades de pesquisa do laboratório.

Ao *Antonio da Silva Souto* por aceitar co-orientar este trabalho e pelo apoio na parte do estudo de comportamento.

A todos colegas da turma do mestrado em Biologia Animal 2009/1 em especial *Danilo, Dani, Mica, Fezinha, Cecy, Samuca e Camila R.* Estes foram simplesmente fundamentais para meu equilíbrio psicológico ao longo destes dois anos. Agradeço por todos os inesquecíveis momentos que passamos juntos, levo para vida toda.

Ao pessoal do Laboratório de Ecotoxicologia da UFPE, em especial *Priscila, Flávio, Anderson, Mari, Gaby, Ju, Flor e Kika.* Por todo apoio emocional e cia ao longo deste período. Pelo profissionalismo e amizade que nunca deixaram faltar.

Ao pessoal do Laboratório de Contaminação Aquática e Imunoquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial a *Daniela Soares e Afonso Bainy* que colaboraram para meu aprendizado e execução de todo estudo biomarcadores desta pesquisa.

Ao pessoal do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo - IPEN-USP, em especial *Ernesto Diaz, Juliana Azevedo e Jorge*

Eduardo Sarkis pela colaboração no meu aprendizado e execução de todas análises de metais pesados desta pesquisa.

A *Fernanda Löffler Niemeyer Attademo* pelo auxílio na coleta de sangue dos animais.

A todos os funcionários do projeto Peixe-boi pelo apoio nas atividades de campo e aprendizado sobre os animais, na Base de Alagoas *Pitagoras, Bil, Wilson e Edílson* foram fundamentais, na Base da Paraíba fica impossível descrever todos pois foram excelentes, como sempre, fazendo com que a estadia se transformasse em desejo de passar o resto da vida na Barra de Mamanguape. É impossível não destacar *Sé, Seu Biruca, Toinho e Jocélio* que me acompanham desde a época do estágio em 2004.

Aos Analistas ambientais do ICMBio, *Iran Normande e Thalma Griesi* pelo apoio logístico e pela disponibilidade de alojamentos de grande importância nesta pesquisa. A *Inês de Lima Serrano* por todo apoio que precisei do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos - CMA/ICMBio, estou ciente e muito agradecida pois sempre que esteve ao seu alcance ela não mediu esforços para ajudar.

A todos os funcionários da Fundação Mamíferos Aquáticos, agradeço o apoio logístico e financeiro nas atividades de campo em especial *Patrícia Menezes e Valquíria Lopes* que estiveram diretamente ligadas à execução desta pesquisa.

A *André da Silva Barreto*, meu primeiro orientador, a pessoa que me introduziu no mundo dos mamíferos aquáticos, a ele sempre devo agradecimentos, pelos ensinamentos científicos, pela formação do meu caráter ético e profissional, e por ter proporcionado o desenvolvimento da XIV RT no Brasil, onde foram apresentados os primeiros resultados deste trabalho.

Aos membros da banca *Inês Serrano, José Lailson Brito Junior e Diego Astúa de Moraes* pelas considerações sugeridas neste trabalho.

A Fundação O Boticário de Proteção a Natureza, pelo patrocínio deste projeto.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Pernambuco - FACEPE, pelo apoio financeiro ao longo destes dois anos.

*Metade de mim, agora é assim
De um lado a poesia, o verbo, a saudade
Do outro a luta, a força e a coragem pra chegar ao fim
E o fim é belo e incerto... Depende de como você vê
O novo, o credo, a fé que você deposita em você e só!*

O Teatro Mágico

Resumo

Atualmente, os organismos aquáticos, incluindo os mamíferos marinhos, estão continuamente sendo expostos a diversos contaminantes químicos, desta forma, efeitos adversos podem surgir como resposta aos diferentes mecanismos de toxicidade destes produtos. Este trabalho avaliou a concentração de metais pesados em sangue de peixes-bois marinhos cativos nos estados de Pernambuco, Alagoas e Paraíba, bem como analisou possíveis efeitos deletérios à saúde dos animais envolvidos, através de avaliação de biomarcadores bioquímicos, hematológicos e comportamentais. Os animais cativos em ambiente natural na Paraíba apresentaram valores de Alumínio, Estanho e Chumbo significativamente maiores do que os encontrados em outras regiões (Alagoas e Ilha de Itamaracá-PE) e maiores ainda do que os reportados na literatura para sangue de peixes-bois da Flórida/EUA e para outros mamíferos marinhos. Destes, o estanho merece ser avaliado em maior detalhe para a sua efetiva potencialidade de gerar imunotoxicidade nas concentrações detectadas. A enzima butirilcolinesterase (BChE) de animais na Paraíba e Alagoas apresentou-se inibida em relação a Itamaracá-PE. A inibição da BChE está diretamente ligada à exposição a inseticidas da classe dos organofosforados e carbamatos, sugerindo uma possível exposição destes animais a estes compostos. Os parâmetros hematológicos, dosagem de hemoglobina, hemácias, hematócrito, leucócitos, entre outros, não apresentaram variação correlacionada com a taxa de contaminação por metais pesados no sangue. Foi evidenciada uma frequência maior de comportamentos estereotipados, como natação em círculos e movimentos de “vai e vem”, nos animais mantidos no cativeiro de Pernambuco comparados aos animais matidos em Alagoas e Paraíba. A maior concentração de alguns metais e a inibição da BChE nos animais mantidos no cativeiro da Paraíba sugerem uma avaliação mais detalhada da qualidade ambiental desta área estudada, pois apesar de possuir beleza cênica e ocorrência natural desta espécie é circundada por uma área antropizada com atividades de plantação de cana de açúcar, carcinocultura e falta de saneamento público.

Abstract

Currently, aquatic organisms, including marine mammals, are continuously being exposed to various chemical contaminants, thus, adverse effects may arise as a response to the different mechanisms of toxicity of these products. This study evaluated the concentration of heavy metals in the blood of captive marine manatees in the states of Pernambuco, Alagoas and Paraíba, and examined the possible harmful effects to the health of the animals involved, through assessment of biochemical, hematological and behavioral biomarkers. Captive animals in Paraíba had values of aluminium, tin and lead significantly higher than those found in other regions (Alagoas and Pernambuco) and even higher than those reported in the literature for the blood of manatees of Florida, USA and other marine mammals. Tin should be evaluated further for its effective potential to cause immunotoxicity at the blood concentrations detected. The enzyme butyrylcholinesterase (BChE) of animals kept in Paraíba and Alagoas was inhibited compared to Itamaracá, Pernambuco. The inhibition of BChE is directly linked to exposure to this class of insecticides. Hematologic parameters did not show variation correlated with heavy metal concentrations measured in blood. A higher frequency of stereotypical behaviors like swimming in circles was found in animals kept in Pernambuco compared to animals from Paraíba and Alagoas. The higher concentration of metals like tin and the inhibition of BChE in animals kept in Paraíba captivity suggest that a more detailed assessment of the environmental quality of this area, because despite having scenic beauty and natural occurrence of this species, it is surrounded by a developed area with sugarcane plantation, shrimp culture and lack of public sanitation.

Lista de Abreviaturas

AChE - Acetilcolinesterase
Al – Alumínio
BChE - Butirilcolinesterase
CAT - Catalase
Cd – Cádmio
CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CMA – Centro de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos
Cr – Cromo
Cu – Cobre
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA - ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fe – Ferro
FMA – Fundação Mamíferos Aquáticos
GST – Glutathione-S-Transferase
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média
He – Hemácias
Hb – Hemoglobina
HR ICPMS- Espectrofotômetro de Massa de Alta Resolução com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado
Ht – Hematócrito
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Mg – Magnésio
Pb – Chumbo
Sn – Estanho
VCM – Volume Corpuscular Médio
Zn - Zinco
USP – Universidade de São Paulo
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

Sumário

1.INTRODUÇÃO	8
1.1 SIRÊNIOS	8
1.2 PEIXE-BOI MARINHO	10
1.3 CONSERVAÇÃO	12
1.4 COMPORTAMENTO	13
1.5 CONCEITOS SOBRE BIOACUMULAÇÃO DE CONTAMINANTES QUÍMICOS E SEUS EFEITOS EM MAMÍFEROS MARINHOS.....	14
1.6 HISTÓRICO DE ESTUDOS DE BIOACUMULAÇÃO DE CONTAMINANTES EM MAMÍFEROS MARINHOS	16
1.7 HISTÓRICO DE ESTUDOS DE BIOACUMULAÇÃO DE CONTAMINANTES EM SIRÊNIOS	19
1.8 BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS.....	20
1.9 BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS	22
3. OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. CAPITULO I	28
ANÁLISE DE CONTAMINANTES E SUAS POTENCIAIS RELAÇÕES COM BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS EM SANGUE DE PEIXES-BOIS MARINHOS (TRICHECHUS MANATUS)	28
4.1 INTRODUÇÃO	29
4.2 METODOLOGIA	31
4.2.1 Animais e Área de Estudo.....	31
4.2.2 Coleta do material biológico	32
4.2.3 Análise de metais.....	33
4.2.4 Análise de biomarcadores enzimáticos	34
4.2.5 Biomarcadores hematológicos.....	35
4.2.6 Análise comportamental	35
4.2.7 Análise de Dados.....	36
4.3. RESULTADOS	37
4.3.1 Metais	37
4.3.2 Biomarcadores Enzimáticos	39
4.3.3 Biomarcadores hematológicos.....	41
4.3.4 Análise comportamental	43
4.4. DISCUSSÃO	44
5. CAPITULO II.....	53
COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO EM PEIXES-BOIS MARINHOS CATIVOS	53
5.1 INTRODUÇÃO	54
5.2 METODOLOGIA	55
5.2.1 Animais e Cativeiros.....	55
Procedimentos.....	56
5.2.2 Alimentação.....	56
5.2.3 Observações dos animais.....	56
5.2.4 Etograma.....	57
5.2.5 Análise dos dados.....	57
5.3 RESULTADOS	58
5.4 DISCUSSÃO	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8. ANEXO	79

1.Introdução

1.1 Sirênios

Dentre o grupo dos mamíferos aquáticos podemos destacar alguns animais que apresentam como características principais, a herbivoria, baixa taxa reprodutiva e vida longa, sendo estes representados pelos peixes-bois e dugongos que constituem a ordem Sirenia (BEST, 1982; REYNOLDS; ODELL, 1991). Esta ordem é representada por duas famílias, Dugongidae e Trichechidae (Figura 1).

Hydrodamalis gigas, conhecida como vaca marinha de Steller, extinta pela caça indiscriminada em 1768, e *Dugong dugong* (dugongo), animal com aparência semelhante ao peixe-boi, mas com característica marcante de cauda bifurcada (MARSH, 1986), e presença de dentes incisivos em machos (EISENBERG, 1981), são as espécies pertencentes a família Dugongidae.

A outra família, Trichechidae, é composta por três espécies, sendo: *Trichechus senegalensis* (peixe-boi africano), *Trichechus inunguis* (peixe-boi amazônico) e *Trichechus manatus* (peixe-boi marinho) (HUSAR, 1977; REYNOLDS; ODELL, 1991; VIANNA et al., 2006).

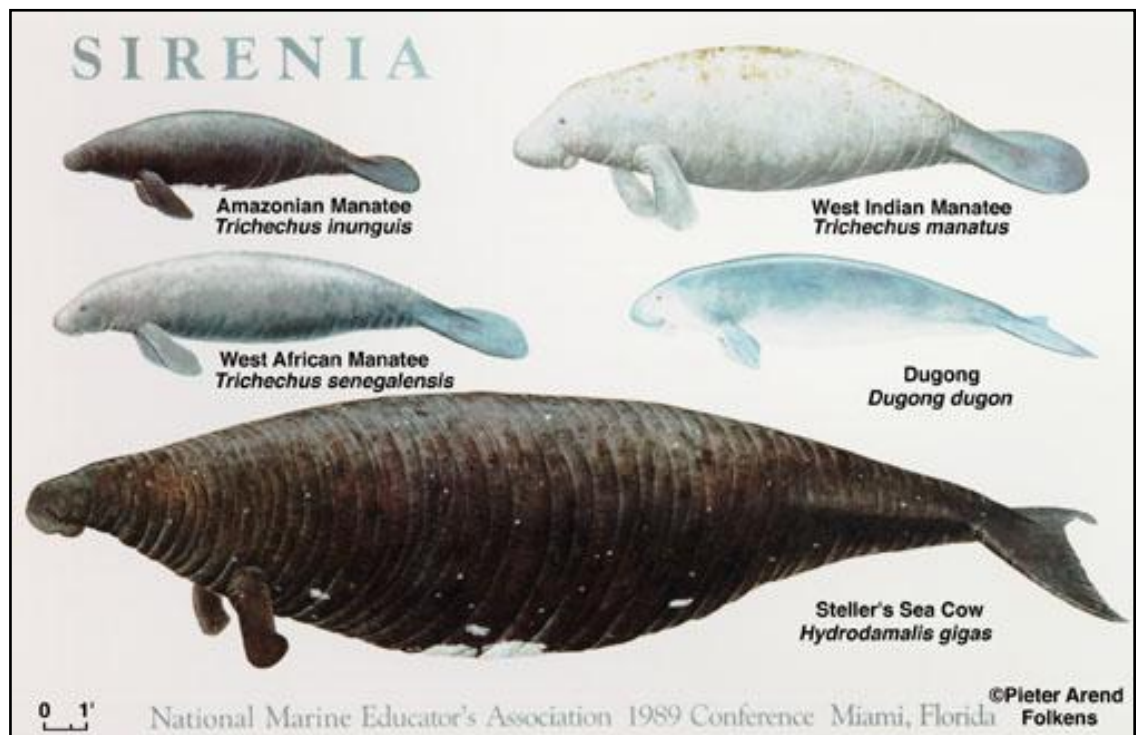


Figura 1: Espécies representantes da ordem sirênia. Fonte: (MARSH; LEFEBVRE, 1994)

Dentre as espécies de sirênios, o dugongo é o único membro vivente da família Dugongidae, diferenciando-se dos demais por ser o único a possuir habitat exclusivamente marinho, distribuindo-se ao longo do Oceano Índico, do leste da África até o oeste da Austrália (HUSAR, 1978).

Já o peixe-boi africano é o menos estudado entre os sirênios. Habita a costa oeste da África, desde o Senegal até Angola e suas características anatômicas se assemelham à dos peixes-bois marinhos (REYNOLDS, 2002).

O Brasil abriga duas espécies da ordem Sirenia, ambas pertencentes à família Trichechidae, sendo elas: o peixe-boi-da-Amazônia (*Trichechus inunguis* Natterer, 1883), e o peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) (HUSAR, 1977; 1978a).

As duas espécies estão legalmente protegidas no território nacional desde 1967 pela Lei Federal de Proteção à Fauna nº 5.197 (BRASIL, 1989). O peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis*), endêmico da região Amazônica, é a única espécie que habita exclusivamente ambientes de água doce, enquanto o peixe-boi marinho pode ser encontrado de forma descontínua ao longo da costa do Caribe até o estado de Alagoas, no Nordeste do Brasil (Fig 2).

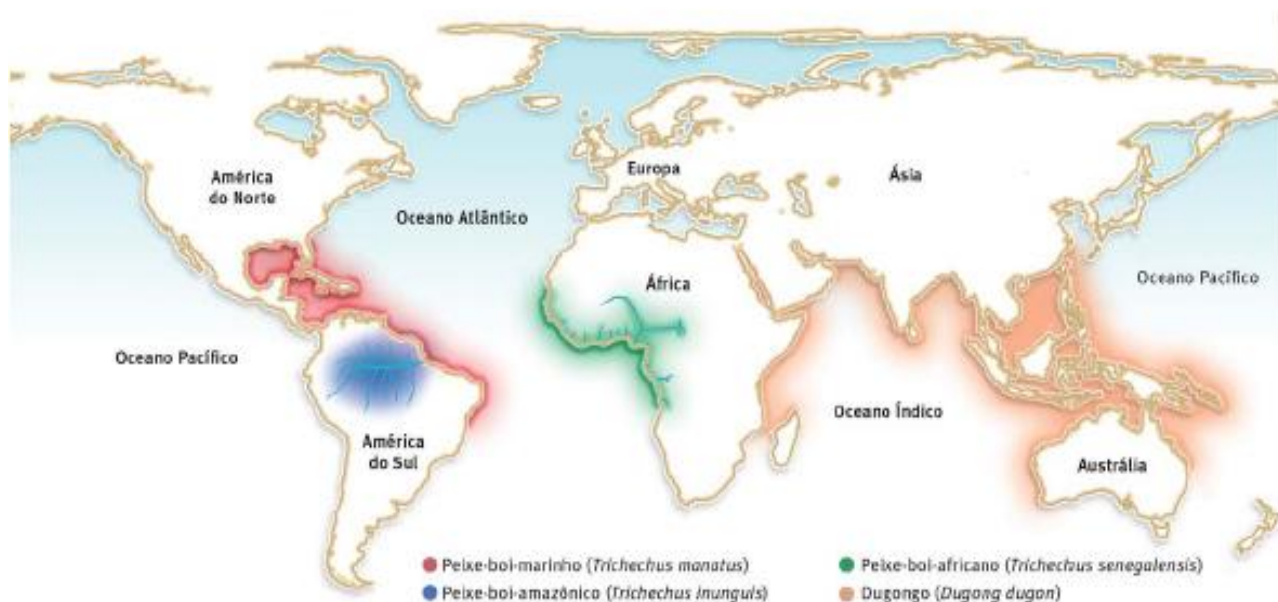


Figura 2: Distribuição geográfica mundial das espécies de Sirênios (Fonte: VIANNA et al., 2006).

1.2 Peixe-Boi Marinho

O peixe-boi-marinho possui uma estrutura corporal compacta e fusiforme, com duas nadadeiras peitorais, que apresentam unhas nas extremidades e uma nadadeira caudal plana em formato oval (HARTMAN, 1979). Um exemplar adulto chega a medir até 4,5 m e pesar 500 Kg, (REYNOLDS; ODELL, 1991), já os filhotes nascem, em média, com 32 Kg e 124 cm de comprimento (PARENTE et al., 2004).

Desde 1989 a espécie *T. manatus* consta na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção do Brasil (BRASIL, 1989; 2003; MMA, 2008) e possui classificação como criticamente ameaçada de extinção de acordo com Plano de Ação de Mamíferos Aquáticos do Brasil (IBAMA, 1997; 2001). Em nível mundial, a espécie apresenta-se como vulnerável (IUCN, 2010).

No resgate histórico da espécie, existem relatos da ocorrência do peixe-boi marinho de forma contínua desde o Estado do Espírito Santo (WHITEHEAD, 1978) até o Amapá (BEST, 1982; DOMNING, 1982). Entretanto, no final da década de 70, pesquisadores percorreram a costa brasileira com o objetivo de mapear áreas de ocorrência da espécie, sendo constatado a preocupante situação destes sirênios no país. O estudo apontou a presença de áreas de descontinuidade, desaparecimento dos indivíduos no litoral dos estados do Espírito Santo,

Bahia e Sergipe, e diminuição significativa nas populações remanescentes (ALBUQUERQUE; MARCOLVALDI, 1982).

Por sua vez, Lima et al. (1992) verificaram que a ocorrência meridional dessa espécie limitava-se ao estado de Alagoas, sendo, portanto comprovado o seu desaparecimento no estado de Sergipe (Figura 3). Segundo Lima (1997), existem duas áreas descontínuas com relação à distribuição desses animais ao longo do litoral nordestino, sendo registradas em partes do litoral de Pernambuco e do Ceará.



Figura 3: – Distribuição de peixe-boi no norte e nordeste do Brasil: áreas de ocorrência atual de peixe-boi marinho (linha vermelha), amazônico (linha amarela) e ocorrência histórica de peixe-boi marinho (peixes-bois brancos) Fonte:(LIMA, 1997).

1.3 Conservação

Luna (2001) ressalta que as espécies de peixes-bois foram exploradas desde o período da colonização no Brasil, através da caça tradicional e exploratória, sendo utilizado a carne, couro e a gordura. Esta forte pressão de caça permaneceu até o século XX, ocorrendo alta mortalidade de peixes-boi marinhos e amazônicos (BEST, 1982; DOMNING, 1982).

Além da forte pressão antrópica relacionada a caça, nas áreas de ocorrência de peixes-bois podemos destacar a captura accidental em redes de pesca (OLIVEIRA, 1994), degradação do habitat e o encalhe de filhotes (LIMA, 1992; MEIRELLES, 2008; PARENTE et al., 2004), além de colisões, principalmente com embarcações motorizadas (BORGES et al., 2007).

Com o objetivo de se reverter a gravidade da situação atribuída a espécie, em 1980 foi criado pelo Governo Federal, o Projeto Peixe-Boi, o qual é executado desde 1998 pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA). Este projeto atualmente está vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e, juntamente com organizações civis, em especial a Fundação Mamíferos Aquáticos (FMA), têm atuado ativamente para o conhecimento e conservação da espécie.

Neste sentido, como estratégia de conservação da espécie no Brasil, os animais que são encontrados encalhados na costa nordestina são encaminhados ao Centro de Reabilitação do Projeto Peixe-Boi (CRAS/CMA/ICMBio), onde recebem tratamentos de médicos veterinários e equipe técnica especializada. A partir daí os animais são alimentados com leite artificial até a idade de 2 anos, e com uma dieta a base de macroalgas e vegetais até aproximadamente 5 a 6 anos, quando podem ser avaliados para possível reintrodução ao ambiente natural. Todo este esforço tem como objetivo promover a reabilitação dos espécimes envolvidos e posteriormente reintroduzi-los na natureza de acordo com protocolo estabelecido por Lima et al (2007). Para a sua reintrodução é seguido o Protocolo de Reintrodução de Peixes-Bois-Marinhos do Brasil (LIMA et al., 2007).

Os animais aptos ao Programa de Reintrodução, o qual contempla diversos critérios para a seleção dos espécimes (tais como a origem do animal, tempo de desmame, aceitação de alimentação natural, afinidade entre os animais, parecer clínico veterinário e medidas biométricas) são translocados para a readaptação em cativeiros construídos no ambiente natural, os quais estão localizados no estuário do Rio Mamanguape, no município de Rio Tinto, estado da Paraíba, e no Rio Tatuamunha, município de Porto de Pedras, estado de Alagoas. Ambos locais estão inseridos em unidades de conservação (UCs), sendo na Paraíba

acobertados pela Área de Proteção Ambiental da Barra do Rio Mamanguape e em Alagoas pela Área de Proteção Ambiental da Costa dos Corais.

Nestas locais, os animais são submetidos às variações ambientais do próprio local, contemplando desta forma, variações da salinidade, amplitudes de maré, alimentação natural encontrada no local ou nas imediações destes, turbidez da água, presença de outros organismos aquáticos, entre outros. Este período varia entre aproximadamente quatro a seis meses ou até que o animal seja considerado apto.

Dentre as atividades profissionais desenvolvidas no CMA/ICMBio em conjunto com a FMA, durante mais de uma década de estudos, foram resgatados mais de 66 filhotes órfãos no litoral nordeste do Brasil e reintroduzidos 27 animais a natureza.

1.4 Comportamento

O peixe-boi marinho é um animal lento e letárgico, apresenta comportamento furtivo, expondo somente a ponta do focinho ao respirar, raramente é possível visualizar o dorso do animal, isso ocorre geralmente em ocasiões de repouso superficial. Eles são normalmente avistados sozinhos ou em grupos de até seis animais (PALUDO; LANGGUTH, 2002).

O comportamento deste sirênio ainda é pouco estudado no Brasil, resumindo-se a estudos de animais cativos em oceanários (GOMES et al., 2008; LINHARES, 2001; SOUZA LIMA, 1998), animais em cativeiros de readaptação no ambiente natural (ARAUJO; MARCONDES, 2003) e nenhum relato publicado para animais nativos.

Existem divergências em relação a classificação comportamental do peixe-boi marinho, enquanto Hartman (1979) classifica-os como essencialmente solitários e moderadamente sociais, Reynolds (1981) e Linhares (2001) afirmam existirem associações e formações de grupo nesta espécie.

Os peixes-bois possuem baixo metabolismo, de forma que chegam a ficar de 4h a 12 horas por dia em comportamento de repouso quando estão em ambiente natural. Porém, é no comportamento de alimentação que despendem a maior parte do tempo, pois consomem cerca de 8% de sua massa corporal, em plantas, a cada dia, o que resulta em grande parte da sua atividade diária (HARTMAN, 1979).

Dentre as características sociais, Medina (2008) ressalta que os peixes-bois cativos apresentam preferências entre indivíduos, não estando necessariamente relacionadas ao sexo oposto.

1.5 Conceitos sobre bioacumulação de contaminantes químicos e seus efeitos em mamíferos marinhos

Atualmente, os organismos aquáticos, incluindo os mamíferos marinhos, estão continuamente sendo expostos a diversos contaminantes químicos, e por isso efeitos adversos podem surgir como resposta aos diferentes mecanismos de toxicidade destes produtos (VOS et al., 2003).

O ambiente marinho é poluído por vários compostos químicos e metais pesados sendo, ainda nos dias de hoje, destino de esgotos domésticos e industriais. Muitos destes componentes são conhecidos por causarem efeitos deletérios a saúde dos animais, e há um risco real de que isto ocorra se estes animais acumularem estes componentes nas várias partes do corpo (MOELLER; REEH, 2003).

Várias são as vias de entrada dos metais pesados e dos contaminantes orgânicos nos mamíferos marinhos, incluindo a absorção da atmosfera através dos pulmões e da pele, a transmissão materna por meio da placenta ou através da lactação, e adsorção através do trato gastro intestinal, sendo este último considerado a principal via de exposição de contaminantes neste grupo de animais (ANDRE et al., 1990; LAILSON-BRITO et al., 2000).

Uma vez absorvidos pelo organismo, estes contaminantes podem circular e interagir com inúmeros sítios de ação nos diferentes tecidos, causando alterações que podem se manifestar em diferentes níveis de organização biológica. Estas alterações podem ser quantificadas por parâmetros de efeito biológico, os biomarcadores de contaminação. Biomarcadores são atualmente definidos como medidas das respostas biológicas a estressores químicos, evidenciadas como alterações moleculares, bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DEPLEDGE, 1994; WALKER et al., 1996).

Exemplos de biomarcadores incluem a indução de expressão gênica e subsequente tradução de RNA mensageiro e síntese de novas proteínas. Entre estes podemos citar as bifenilas policloradas (PCBs), que ao serem bioacumuladas por golfinhos *Tursiops truncatus*, induzem a transcrição de genes do citocromo P450, cujos RNAs ao serem traduzidos levam à síntese de proteínas P450 1A1. Estas proteínas têm sido detectadas em maior quantidade em golfinhos que acumularam maior concentração de PCBs em ambientes contaminados na Flórida (WILSON et al., 2007).

As proteínas P450 1A1 são enzimas que atuam na metabolização e destoxificação de diversos contaminantes, e estas respostas podem não causar nenhum dano imediatamente evidente ao organismo. Entretanto, em um prazo de tempo maior, outras alterações a nível fisiológico ou celular podem ocorrer em consequência destas alterações iniciais. Ainda usando como exemplo as bifenilas policloradas para ilustrar o conceito da potencial propagação de efeitos biológicos ao longo de diferentes níveis de organização biológica, focas aneladas (*Phoca hispida baltica*) e focas cinza (*Halichoerus grypus*) contaminadas por PCBs apresentaram alterações fisiológicas expressas em termos de redução dos níveis de vitamina A, em associação com deficiências no seu sistema imunológico, que por sua vez podem explicar parcialmente problemas reprodutivos de maior relevância ecológica para as espécies (NYMAN et al., 2003; ROSS et al., 1996).

Neste sentido, as alterações moleculares e bioquímicas são a primeira resposta de ação biológica, e estão relacionadas à essência do mecanismo de ação tóxica dos contaminantes, pois representam a base molecular da toxicidade (WALKER et al., 1996).

Biomarcadores fisiológicos, específicos ou não, têm a capacidade de integrar os efeitos de estresses múltiplos e podem ajudar a avaliar o potencial de que efeitos a níveis inferiores de organização causem efeitos ecologicamente relevantes para a espécie (HUGGET et al., 1992).

Os biomarcadores têm como vantagem promover um alerta inicial e precoce de danos biológicos mais relevantes, e podem ser classificados como biomarcadores de exposição ou biomarcadores de efeito. Biomarcadores de exposição, apesar de serem medidas de efeito biológico decorrente da interação do contaminante com o sítio de ação, podem ser usados como indicativos de que tenha ocorrido exposição dos organismos a certos contaminantes, quando estas medidas são específicas de certos grupos de contaminantes (WALKER et al., 2005).

A indução de proteínas P450 é um exemplo deste tipo, sendo passíveis de classificação como biomarcadores de exposição a bifenilas policloradas, ou seja, a detecção desta alteração biológica indica que os organismos possam ter sido expostos a este grupo de contaminantes específico. Entretanto, esta medida do nível de indução de proteínas P450 não dá informação sobre o grau de efeito adverso mais ecologicamente relevante, quer seja uma patologia a nível de um tecido importante como a gônada ou mesmo o efetivo sucesso reprodutivo do indivíduo, com consequências importantes para a manutenção da população. Neste sentido, podemos classificar os biomarcadores como “de efeito ou efeito tóxico” como aqueles que demonstram um efeito adverso “relevante” no organismo, salvaguardando-se que esta

classificação envolve certa subjetividade na definição deste efeito considerado relevante (SOUZA; CARVALHO, 2009).

1.6 Histórico de estudos de bioacumulação de contaminantes em mamíferos marinhos

Apesar da comum utilização do termo metais pesados, não existe uma definição precisa para classificar este grupo, alguns o associam à poluição e toxicidade, enquanto outros afirmam que todos elementos com densidade maior que cinco e a massa atômica maior que 40 são quimicamente classificados como metais pesados (PASCALICCHIO, 2002).

Alguns metais são componentes naturais dos organismos, sendo a grande maioria encontrada em concentrações traço. Estes elementos podem ser classificados como essenciais e não-essenciais do ponto de vista biológico (EISLER, 2000). No entanto, mesmo os considerados essenciais, quando encontrados em excesso, podem causar impactos negativos a organismos de ecossistemas terrestres e aquáticos, tornando-se, assim, um agente contaminante ou poluente de solo e água (EISLER, 2000).

Os elementos não essenciais (Al, Hg, Pb, Cd, Ag e Sn) não possuem função biológica e, portanto são potencialmente tóxicos aos organismos, podendo provocar uma série de distúrbios tais como baixa fertilidade, diminuição nas defesas imunológicas, redução da taxa de crescimento e patologias que podem levar à morte dos indivíduos (BAINY et al., 1998). Mesmo quando encontrados em baixas concentrações, tais elementos podem apresentar efeitos tóxicos crônicos ou agudos, principalmente por mecanismos de competição por sítios de ligação com os metais essenciais (MAGIOLI, 1980).

Os fatores que determinam a toxicidade de cada metal são bastante variáveis, podendo estar relacionados a característica de cada elemento, disponibilidade para incorporação biológica, concentração e forma química, bem como sua essencialidade em processos metabólicos ao longo da vida do organismo (CHAPMAN et al., 2000).

Muitos estudos relacionados à contaminação de mamíferos aquáticos com metais pesados e poluentes orgânicos vêm sendo realizados nos últimos anos (BELANGER et al., 2008; DAS et al., 2003; KEMPER et al., 1994; ROSS et al., 1996; THOMPSON, 1990).

Os contaminantes orgânicos começaram a ser reportados em mamíferos aquáticos na década de 50, onde estudos com focas e baleias reportaram contaminação por DDT (ADDISON et al., 1972) sendo no final da década de 60 a contaminação por organoclorados

reportada em 52 espécimes, sendo seis espécies de pinípedes, e duas de cetáceos (*Phocena phocena* e *Delphinus delphis*) (O'SHEA; TANABE, 2003). Já na década de 70 o estudo nesta linha expandiu para achados em 1410 indivíduos sendo a maioria reportado em cetáceos. No mesmo período, foram realizados estudos com animais em cativeiro para melhor entendimento do mecanismo de detoxificação em mamíferos aquáticos (O'SHEA; TANABE, 2003). Em meados de 1980 começaram a ser executados estudos com o intuito de identificar os efeitos deletérios a saúde dos animais ocasionados pela contaminação por poluentes orgânicos, e foi ainda nesta década que as metodologias para identificação destes compostos químicos começaram a ser melhoradas, apresentando resultados mais refinados, e nesta década os estudos já abrangiam resultados para 2700 indivíduos em 47 espécies de mamíferos aquáticos (O'SHEA; TANABE, 2003).

Com o avançar das pesquisas, efeitos deletérios mais relevantes começam a ser conhecidos na década de 90 quando desreguladores endócrinos, patologias ósseas e hiperplasia adrenal configuravam entre os danos possivelmente relacionados à contaminação química. A imunossupressão e os baixos níveis de vitamina A estariam diretamente ligados a ocorrências de poluentes orgânicos persistentes (POPs) nestes animais (O'SHEA; TANABE, 2003). Estudos recentes tem como desafio conhecer melhor o mecanismo de ação destes compostos, relações dose-resposta, e os potenciais efeitos que estes componentes continuam causando nos mamíferos marinhos (ROSS et al., 2009).

Metais pesados já foram identificados em mais de 60 espécies de cetáceos (O'SHEA et al., 1999) e são comumente reportados em pinípedes (DIETZ et al., 1998; KAKUSCHE et al., 2005; KAKUSCHKE et al., 2010; KAKUSCHKE et al., 2008), mas ainda pouco estudados em sirênios (BELANGER et al., 2008). Contudo, são escassos registros na literatura que relacionam a problemática da contaminação ambiental por metais pesados aos efeitos deletérios na vida dos animais, bem como o efeito da variação temporal e espacial dos contaminantes no ambiente (O'HARA; O'SHEA, 2001). Isso torna difícil compreender as reais consequências que a contaminação acarreta de forma aguda ou crônica no corpo dos animais.

Apesar da grande dificuldade em relacionar diretamente a contaminação por metais a efeitos na saúde dos mamíferos aquáticos (BELANGER et al., 2008; BERTA et al., 2006), estudos desenvolvidos com pinípedes e golfinhos (a maioria em cativeiro) demonstraram haver uma relação entre a presença destes contaminantes encontrados nestes animais e diferentes tipos de efeitos deletérios à sua saúde (BERTA et al., 2006).

Kakuschke (2005, 2008 e 2010) afirma que exposições a metais pesados podem afetar parâmetros imunológicos seguidos da morte natural da atividade celular, fagocitose e proliferação de linfócitos, além de se relacionar com a mortalidade por doenças infecciosas. Em conformidade com estas informações Bennett (2001) ao analisar 86 carcaças de Toninha comum (*Phocoena phocoena*) relata que 49 destas tiveram traumas físicos como causa-morte, enquanto as outras 37 apresentaram alguma sintoma de morte por doenças infecciosas (parasitas, bactérias, fungos e vírus). As análises de mercúrio, selênio e zinco apresentaram-se significativamente mais altas em fígados de animais cuja causa-morte estava relacionada com doenças infecciosas, quando comparados os demais diagnósticos. Estes resultados apontaram uma possível correlação entre imunossupressão e presença de contaminantes nestes cetáceos.

Com experimento semelhante, mas pesquisando as proteínas do grupo das metalotioneínas e a enzima anti-oxidante superóxido dismutase (SOD) em fígado de lontra marinha (*Enhydra lutris nereis*), Kannan e colaboradores (2006) concluíram ainda que altas concentrações de metais podem contribuir para efeitos de estresse oxidativo nestes animais.

Em uma abordagem com biomarcador metalotioneína, Das (2006) verificou se existia associação entre a detecção de metalotioneínas e presença de altos índices de Zn, Cd, Cu e Hg em fígado e rim de 24 toninhas comum (*Phocoena phocoena*) encontradas na costa Belga. Os resultados revelaram que MTs possuem um papel fundamental na homeostase de Zn e Cu nesta espécie.

Apesar da grande relevância destes estudos citados acima, abordando a temática da consequência destas contaminações para a saúde dos animais, existe muita dificuldade em se estabelecer uma relação de causa-efeito entre o nível de contaminantes acumulados e seu efeito específico em mamíferos aquáticos. Esta dificuldade decorre da quase inviabilidade de se realizar estudos experimentais envolvendo contaminantes com mamíferos marinhos (DAS et al., 2006).

Muitos fatores podem influenciar na concentração individual de contaminantes em mamíferos aquáticos, entre eles a localização geográfica, dieta, idade, sexo, tecidos considerados e taxas metabólicas (DAS et al., 2006). As maiores variações são encontradas em função de fatores como a idade e sexo (ENDO et al., 2007). No caso de contaminantes persistentes como os organoclorados, as fêmeas geralmente possuem níveis mais baixos uma vez que estes contaminantes podem ser transferidos aos filhotes na lactação (WAGEMANN et al., 1998) e através da placenta (GREIG et al., 2007; HONDA K. et al., 1987).

Para alguns compostos como os organoclorados e organometais, como o metilmercúrio, as taxas de excreção tendem a ser bem menores que as taxas de acumulação

nos organismos. Esta característica leva a uma biomagnificação destes compostos ao longo das cadeias tróficas, e por isto mamíferos carnívoros tendem a apresentar maiores concentrações destes compostos com alto potencial de bioacumulação. Desta forma, fica claro entender que sirênios e cetáceos misticetos geralmente não apresentam valores elevados de contaminação pois não são animais pertencentes ao topo de cadeia trófica. Mamíferos aquáticos carnívoros (odontocetos e pinípedes) parecem ser potenciais indicadores do nível de alguns metais pesados acumulados no ambiente marinho, devido a sua bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica (ANDRÉ et al., 1991; BOUQUEGNEAU; JOIRIS, 1992; DIETZ et al., 1998).

1.7 Histórico de estudos de bioacumulação de contaminantes em sirênios

Em seu trabalho de revisão Belanger e Wittnich (2008) reportam que de 1954 a 2008 foram publicados 482 artigos com sirênios sendo 163 com peixes-bois, onde a maioria dos artigos abordou temas relacionados ao habitat, alimentação, estimativas de abundância e impactos de ações antropogênicas diversas. Somente poucos trabalhos recentes abordaram aspectos relacionados a contaminantes ambientais (AMES; VLEET, 1996; O'SHEA, 2003; O'SHEA et al., 1984; STAVROS; BONDE et al., 2008).

São escassas as informações abordando contaminantes em sirênios por vários motivos: as dificuldades logísticas e financeiras para estudá-los em seu habitat natural, dificuldades para validar as quantidades exatas ou tipos de contaminantes sendo liberados para o ambiente; alterações que estes elementos sofrem ao longo de grandes períodos, e as limitações para avaliar o real efeito dos contaminantes na saúde dos animais (BELANGER et al., 2008; O'HARA; O'SHEA, 2001; REEVES et al., 2002).

Sirênios, por serem mamíferos aquáticos herbívoros, apresentarem vida longa e habitarem áreas costeiras, são animais sujeitos à contaminação ambiental (BELANGER et al., 2008), estando mais propensos à contaminação por chumbo e cádmio através da ingestão da vegetação aquática que, segundo Mayes (1977), pode conter altos níveis destes metais pesados.

Contudo, é geralmente aceito que peixes-bois apresentam baixos níveis de contaminação por metais pesados, quando comparado a outros mamíferos aquáticos e que isso não acarretaria em um problema para o futuro destas espécies (BONDE et al., 2004). Porém,

até o momento, não existem pesquisas de longo prazo ou que abordem temática de relações causa-efeito em maior detalhe em sirênios.

O'Shea (1984) em estudo realizado com *Trichechus manatus* na Flórida, demonstrou a contaminação com PCBs relacionada a áreas relativamente urbanizadas, observando que a vegetação aquática local apresentava um alto índice de contaminação por Cobre. Em estudos realizados com Dugongos, estes apresentaram contaminação por Fe, Zn, Co, Cu, Ag (DENTON et al., 1980), e Butil-estanho (BT) (HARINO et al., 2007).

Stavros e colaboradores (2008) publicaram os primeiros resultados sobre a contaminação em peixes-bois em vida livre na Flórida, e afirmam que todos os elementos analisados em sangue e biópsias de pele dos animais estão dentro do limite já descrito para mamíferos aquáticos, com exceção de As e Zn no sangue e Al na pele, que apresentaram valores acima dos reportados para mamíferos aquáticos. Estes valores devem estar associados a diferentes dietas ou áreas de forrageamento utilizadas por estes sirênios.

A ausência de estudos realizados para avaliar a presença de contaminantes químicos em peixes-boi marinhos no Brasil, *Trichechus manatus*, alerta para necessidade de pesquisas, uma vez que estes animais estão criticamente ameaçados de extinção (IBAMA, 2001), sendo a população estimada em torno de 500 animais (LIMA, 1997; LUNA, 2001).

No Brasil, peixes-boi marinhos reabilitados são reintroduzidos nos estados de Alagoas e Paraíba, locais onde existe pressão antrópica relacionada as indústrias, cultivo de cana-de-açúcar, carcinicultura e ausência de saneamento público em muitas comunidades costeiras, sendo estas atividades fontes de contaminantes químicos com significativo potencial de lixiviar para os ambientes aquáticos freqüentados pelos animais reintroduzidos.

Desta forma, a busca por informações sobre a qualidade ambiental destas áreas de reintrodução ressalta a necessidade de realização de pesquisas que quantifiquem os níveis de contaminação destes ambientes e dos animais que habitam estes locais, de modo a favorecer as estratégias e recomendações do Plano de Ação Nacional para a Conservação de Sirênios (Portaria nº 85, de 27 de agosto de 2010), bem como subsidiar e incorporar informações técnicas pertinentes ao Protocolo de Reintrodução de Peixes-Bois Marinhos do Brasil (Lima et al., 2007)

1.8 Biomarcadores Hematológicos

O sangue é um dos maiores órgãos do corpo, podendo corresponder a 7% do peso total do animal e pode ser dividido em três elementos fundamentais: eritrócitos, leucócitos e

trombócitos. Os exames que detectam alterações hematológicas são geralmente focados em mudanças nos números de eritrócitos, leucócitos ou fatores de coagulação (ZAGO et al., 2005)

O estudo de doenças hematológicas e sua relação com exposições provenientes do ambiente ganharam impulso a partir do século XX, onde agravos revelaram-se um conspícuo problema de saúde pública. Dentre as patologias que apresentam forte correlação com exposição a contaminantes ambientais destacam-se a anemia aplásica e leucemias, ambas com alta letalidade (CAZARIN et al., 2007).

Os estudos relacionados ao sistema imune de mamíferos aquáticos são deficientes e grande parte deste fator é devido a estes abrangerem apenas casos isolados, não realizando uma avaliação de longo período. Faz-se necessário que as análises hematológicas e imunológicas sejam feitas em uma mesma localidade, dentro de uma mesma população de indivíduos, pois fatores ambientais, como dieta, temperatura e qualidade de água, podem exercer influência na produção celular (BRITT; HOWARD, 1983).

Análises hematológicas são uma ferramenta importante para acompanhar o estado geral da saúde de peixes-bois livres ou cativos em reabilitação (HARVEY et al., 2009). Os parâmetros eritrocitários são quantificados por meio da determinação dos valores globais de hemácias (hemácias/L), hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%), bem como da avaliação morfológica das células sangüíneas.

As hemácias dos peixes-bois, assim como de outros mamíferos aquáticos, possuem dimensões maiores e menor quantidade quando comparadas a mamíferos terrestres, o que os permite realizar uma maior troca gasosa (HARVEY et al., 2009; REIDARSON et al., 2000; WHITE et al., 1976).

As células brancas são classificadas como leucócitos mononucleares ou polimorfonucleares, possuindo algumas características morfológicas peculiares em mamíferos aquáticos. Em peixes-bois o número de leucócitos pode ser ligeiramente inferior quando comparados aos valores de mamíferos terrestres, mas são semelhantes aos valores reportados para baleias e golfinhos (HARVEY et al., 2009).

Na maioria destes animais, os neutrófilos são células ovais ou redondas, corando-se em rosa pálido quando submetidas a corantes de rotina. Em peixes-bois, essas células coram-se de maneira distinta, adquirindo uma coloração policromática, com grânulos rosados e/ou avermelhados, se assemelhando aos eosinófilos dos mamíferos terrestres (CONVERSE et al., 1994). Por esta razão, esse tipo celular é denominado heterófilo ou granulócito heterofílico (KIEHL; SCHILLER, 1994).

Enquanto alguns estudos reportam um baixo número de eosinófilos e basófilos para peixe-boi (BOSSART, 2001; REIDARSON et al., 2000), estudos que utilizam coloração específica para diferenciação de eosinófilos e heterófilos encontraram um valor considerável (HARVEY et al., 2009), demonstrando uma possível fragilidade na detecção destas células no tecido sanguíneo destes animais.

Os linfócitos são vistos em maior quantidade na medula óssea e nos demais tecidos linfóides, o que não ocorre em peixes-bois, que em decorrência de características anatomofisiológicas peculiares, referentes à produção de células sanguíneas, possuem um maior número de linfócitos circulantes na corrente sanguínea. Estes possuem morfologia similar a dos outros mamíferos aquáticos (HARVEY et al., 2009).

O monitoramento dos parâmetros hematológicos como ferramenta de acompanhamento da saúde de mamíferos aquáticos pode ser uma ferramenta relevante para relacionar biomarcadores e presença de contaminantes ambientais na interpretação do efeito nas populações selvagens de mamíferos marinhos (VOS et al., 2003).

Dados hematológicos são ferramentas não-destrutivas de avaliação de efeitos na ecotoxicologia (FOSSI et al., 1999) que fornecem informações importantes sobre o estado de saúde de um animal, corroborando com diagnóstico clínicos de diferentes doenças, onde é possível detectar alterações imunológicas, anemias, estado de hidratação entre outros (IBAMA, 2005). Desta forma, estas informações podem ser utilizadas como indícios de potenciais efeitos decorrentes desta contaminação nestes organismos.

1.9 Biomarcadores enzimáticos

A exposição a poluentes pode ser observada pela análise de sistemas enzimáticos envolvidos em processos de biotransformação de xenobióticos. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas por reduções sucessivas do oxigênio molecular, como por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil (OH). Estas moléculas são subprodutos do metabolismo normal das células, mas a sua formação pode ser estimulada por diversas condições de estresse, entre as quais, presença de oxidantes químicos, metais pesados e estresse térmico (VAN DER OOST et al., 2003). Além disso, uma disfunção metabólica em virtude da infecção por patógenos pode por si só ocasionar um desequilíbrio no fluxo de oxigênio celular, originando EROs.

Qualquer uma das situações mencionadas acima pode causar um aumento das defesas antioxidantes para proteger o hospedeiro dos efeitos deletérios das EROs. Estes sistemas antioxidantes são compostos por um grupo de enzimas, tais como a enzima superóxido dismutase (SOD) que converte o ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio, as enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que detoxificam o peróxido de hidrogênio (GÓMEZ-ANDURO et al., 2006) e enzimas complementares, como, por exemplo, a glutathione reductase (GR) que catalisa a redução de glutathione oxidada (GSSG) à reduzida (GSH).

Produtos lipofílicos oriundos das reações da fase I (biotransformação de compostos tóxicos) podem ainda ser conjugados com GSH pela enzima glutathione S-transferase (GST) (reações da fase II), formando produtos mais solúveis e, portanto, mais fáceis de serem excretados. Quando há um desequilíbrio entre a formação de EROs e sua inativação pelos sistemas de defesa antioxidantes, favorecendo a formação de lesões oxidativas às biomoléculas, estabelece-se uma situação deletéria denominada estresse oxidativo (AHMAD et al., 2000; ÜNER et al., 2005).

Os organismos aeróbicos possuem uma diversidade de defesas antioxidantes para proteger a célula contra os danos ocasionados pela produção de EROs. A maioria destes antioxidantes acompanham a adaptação dos organismos a diferentes condições respiratórias encontradas na natureza (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Muitos mamíferos aquáticos toleram grande período de apnéia ao executar grandes mergulhos (SCHREER; KOVACS, 1997), devido a adaptações morfológicas, fisiológicas (especialmente vasoconstrição periférica e bradicardia) e bioquímicas (BERTA et al., 2006). Estas adaptações permitem a estes animais que alguns órgãos vitais, como músculo esquelético, rins e fígado sofram rotineiramente uma diminuição de fluxo sanguíneo (CASTELLINI et al., 2001), e portanto, lidem frequentemente com altos níveis de EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Wilhelm Filho e colaboradores (2002) demonstram que mamíferos aquáticos possuem maior capacidade antioxidante quando comparada com mamíferos terrestres, pois para evitarem a exposição dos tecidos a mudanças súbitas nos níveis de oxigênio e formação de EROs, estes animais requerem um maior sistema anti-oxidante de forma natural durante a vida.

O sistema antioxidante pode ser enzimático e não-enzimático. O não-enzimático é composto por substâncias como a glutathione, o ácido ascórbico, o tocoferol etc. As enzimas antioxidantes mais reportadas em organismos aquáticos são a superóxido dismutase (SOD), a

catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase (GST) (CLASEN, 2009).

As enzimas CAT e GPx têm papéis complementares na destoxificação do peróxido de hidrogênio, sendo que elas têm diferentes localizações celulares e moléculas alvo (BARATA et al., 2005). A CAT é uma das mais importantes enzimas do sistema antioxidante, descrita em 1901 por Loew (FRUGOLI et al., 1996), é uma enzima tetramérica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. A CAT é a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o H_2O_2 formado nas células sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000). Ocorrem primariamente nos peroxissomos e a proliferação peroxissômica é a principal causa para a elevação da atividade catalásica nos tecidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005). Quando sua atividade aparece aumentada em determinados tecidos, isso pode significar uma possível resposta compensatória do organismo a insultos oxidativos.

A enzima glutathione-S-transferase (GST) desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos, incluindo agroquímicos. Elas incluem três famílias de enzimas (citoplasmática, mitocondrial e microsomal), e possuem potente efeito protetor contra as EROs (ROBERTA et al., 2005). Sua estimulação envolve reações de conjugação na presença de glutathione. Assim, animais aquáticos que habitam ambientes poluídos podem estar expostos a xenobióticos os quais sofrem detoxificação mediada pela glutathione na sua forma reduzida, catalisada pela enzima GST. Esta enzima de biotransformação tem sido estudada em trabalhos de campo no monitoramento de poluentes de origem industrial e agrícola (CHO et al., 1999; FENET et al., 1998).

Estudos mostram que quando as enzimas CAT e GST apresentam aumento de suas atividades em tecidos animais, elas podem ser usadas como indicadores de exposição aos poluentes aquáticos como os pesticidas (AHMAD et al., 2000; LI et al., 2003; MORAES et al., 2007).

Atualmente, muitos inseticidas usados em plantações são pertencentes à classe dos organofosfatos ou carbamatos, conhecidos por agirem inibindo as colinesterases, sendo estes produtos considerados neurotóxicos, podendo causar déficits na fisiologia, comportamento e ainda afetar a reprodução dos animais (GRUE et al., 1997; VIRGO, 1984). A medida da atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em sangue é extensamente estabelecida com um método para diagnosticar exposição a carbamatos e efeito tóxico destes compostos em mamíferos (WILSON; HENDERSON, 2007).

A Acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) são enzimas que catalisam a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, processo fundamental na regulação do sistema colinérgico (DARVESH et al., 2003). A BChE foi descoberta há mais de 70 anos, porém, sua importância fisiológica ainda é pouco conhecida. Neste contexto, foi levantada a hipótese de que efeitos deletérios da homocisteína como um pró-oxidante pode ser devido a suas ações em colinesterases (STEFANELLO et al., 2003). Por outro lado, um estudo recente mostra que a BChE pode rapidamente hidrolisar a acetilcolina, e que aparentemente pode substituir a AChE na manutenção da integridade estrutural e funcional das vias centrais colinérgicas (MESULAM et al., 2002), resultando em efeitos deletérios as vias colinérgicas periféricas. Desta forma é possível presumir que a redução da atividade deste enzima pode estar associado a sintomas neurológicos (STEFANELLO et al., 2003).

A BChE também conhecida como pseudocolinesterase é inibida por pesticidas do grupo dos organofosforados e carbamatos. Sua inibição é amplamente utilizada como indicador de exposição em programas de biomonitoramento de contaminação por pesticidas inibidores das colinesterases (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2004).

Biomarcadores ainda são pouco explorados dentro do grupos dos mamíferos aquáticos, por tratarem-se de animais dificilmente encontrados em cativeiro e pela dificuldade em ter acesso a carcaças frescas ou amostras de animais vivos (sangue e pele).

Dentre os escassos estudos podem ser destacados os trabalhos com pinípedes onde Fossi (1997), em um dos seus trabalhos executados com biomarcadores em mamíferos aquáticos quantificou o teor de porfirinas total, as enzimas do grupo das P450 EROD, PROD, BROD, os compostos químicos organoclorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e Hg total em determinados órgãos e tecidos de pinípedes. Os resultados confirmaram um desequilíbrio metabólico entre o potencial de alta toxicidade e baixa detoxificação em pinípedes, como relatado para outros mamíferos aquáticos.

Munro Jenssen e colaboradores (1995) realizaram pesquisa em filhotes de foca cinzenta (*Halichoerus grypus*), e utilizando amostras não-invasivas de pele e sangue, conseguiram demonstrar que a dosagem de vitamina A (retinol), e a razão entre tiroxina total e tiroxina livre (TT4/FT4) são importantes biomarcadores plasmáticos para exposição a níveis baixos e moderados de PCB. No entanto o efeito que isso acarreta no indivíduo ou na população permanece desconhecido.

Vários outros trabalhos já citados anteriormente neste contexto abordam a temática da indução de proteínas e enzimas do grupo P450 em várias espécies de pinípedes (NYMAN et

al., 2003; ROSS et al., 1996; TANABE, 2002; TERAMITSU et al., 2000; TROISI; MASON, 1997).

Já biomarcadores em cetáceos são menos explorados, podendo ser destacado estudo de Goksoyr (1995) que estudou enzimas de detoxificação em espécies de mamíferos aquáticos, entre elas a baleia minke (*Balaenoptera acutorostrata*), e descreveu as subfamílias de proteínas CYP1A, CYP2B, CYP3A e CYP4A encontradas no sistema citocromo P450.

A presença de vitamina A e E foram determinadas em fígado, pele, gordura e soro de *Balaena mysticetus* na tentativa de obter uma correlação com contaminantes organoclorados, porém esta espécie apresentou uma baixa concentração destes elementos, menor do que concentrações reportadas para outros mysticetus, e desta forma não houve uma correlação significativa (ROSA et al., 2007).

Fossi e colaboradores (2008) obtiveram sucesso na proposta de detecção de CYP1A1 e CYP2B em biópsias de pele de *Stenella coerulealba* e *Tursiops truncatus* para detecção de exposição a organoclorados (OCs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e éteres de bifenilas polibrominadas (PBDEs), demonstrando que esta é uma ferramenta não destrutiva passível de ser utilizada como indicador de exposição.

Enfim, com base no levantamento bibliográfico dos trabalhos citados é possível visualizar que a maioria das publicações relacionadas aos biomarcadores foram realizados com pinípedes, uma fração menor com cetáceos e até o momento, nenhum relato envolvendo sirênios.

O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento oferece vantagens, pois são geralmente as primeiras alterações a serem detectadas, são bastante sensíveis à presença de determinados poluentes, apresentam especificidade razoável, e fornecem informações a respeito do possível mecanismo de efeito causado pelo xenobiótico ou mistura de xenobióticos (AMORIM, 2003; WALKER et al., 1996).

3. Objetivos

Objetivo geral

- Determinar as concentrações de metais pesados e analisar biomarcadores em sangue de peixes-boi marinhos na região nordeste do Brasil e seus potenciais efeitos patológicos.

Objetivos Específicos

- Analisar a contaminação por metais pesados dos animais cativos em oceanários e em cativeiro de ambiente natural;
- Avaliar biomarcadores enzimáticos através do teste das enzimas Butirilcolinesterase, GST e Catalase no sangue dos animais;
- Identificar possíveis diferenças nos níveis de contaminação entre idade e sexo dos animais;
- Relacionar os níveis de contaminação com perfil hematológico e biométrico de cada indivíduo;
- Buscar relações entre níveis de contaminação e alterações comportamentais dos animais.

4. Capítulo I

Análise de contaminantes e suas potenciais relações com biomarcadores bioquímicos e hematológicos em sangue de peixes-bois marinhos (Trichechus manatus)

4.1 Introdução

As espécies pertencentes à ordem dos Sirênios apresentam vida longa, baixa taxa reprodutiva e encontram-se distribuídos em mais de 90 países, porém apresentam o menor número de espécies de todas as ordens dos mamíferos (REYNOLDS; ODELL, 1991). Incluídos nesta ordem está o peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*), animal herbívoro, com distribuição descontínua nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, sendo o mamífero aquático mais ameaçado de extinção do país, com uma população estimada em torno de 500 animais (LIMA, 1997; LUNA, 2001).

Entre os problemas que têm levado as populações de peixes-boi marinhos a esta situação podem ser evidenciados a captura acidental em redes de pesca, encalhes de filhotes (PARENTE et al., 2004), o atropelamento por embarcações (BORGES et al., 2007) e alguns agentes etiológicos como bactérias do grupo das Salmonelas (*Salmonella panama*) (VERGARA-PARENTE et al., 2003).

Para tentar restabelecer as populações de peixes-bois a níveis sustentáveis foi criada por meio do Projeto Peixe-Boi uma estratégia de conservação no âmbito nacional, a qual tem como uma de suas iniciativas o resgate de filhotes órfãos. De maneira integrada, os espécimes resgatados são encaminhados para a Unidade de Reabilitação localizada em Itamaracá - PE, onde permanecem recebendo cuidados médico-veterinários e alimentação até a idade média de seis anos. Posteriormente estes animais são translocados para cativeiros de readaptação à natureza e reintroduzidos ao seu habitat natural, tendo como áreas de adaptação e soltura os estados de Alagoas e Paraíba.

Nos referidos estados vem sendo constatada pressão antrópica nos ambientes costeiros relacionada ao cultivo de cana-de-açúcar, carcinicultura e ausência de saneamento público em muitas comunidades litorâneas. Na agricultura de cana existem inúmeros agroquímicos que vem sendo utilizados, a exemplo do carbofuran, pertencente a classe dos carbamatos, utilizado no controle de nematóides da cana-de-açúcar, e que tem significativo potencial de lixiviar para os ambientes aquáticos (PLESE, 2005), que podem ser freqüentados pelos peixes-boi reintroduzidos e causar neurotoxicidade nos animais (GRUE et al., 1997; VIRGO, 1984). Estudos realizados com exposição de aves e mamíferos a este grupo de contaminantes demonstraram certos distúrbios no comportamento dos animais tais como alterações de atividade, agressão, forrageio, capacidade de aprender e memorizar e déficit reprodutivo (GRUE et al., 1997).

Além da possibilidade de exposição aos contaminantes orgânicos, os metais pesados, como o mercúrio, podem causar diminuição de imunidade em mamíferos marinhos (BENNETT et al., 2001), enquanto outros elementos não essenciais, como o cádmio, níquel, chumbo e estanho têm sido encontrados em concentrações significativas em mamíferos marinhos, podendo causar efeitos deletérios a saúde destes animais e ainda podem estar relacionados à morte por doenças infecciosas (DAS et al., 2003; KANNAN et al., 2006).

Na tentativa de relacionar a acumulação de contaminantes químicos em mamíferos marinhos com indicadores de efeito biológico decorrentes desta exposição, os biomarcadores tem sido utilizados, e estes podem ser definidos como medidas biológicas de efeito dos compostos químicos variando de níveis subcelulares de organização biológica até o nível de indivíduos, e abrangem efeitos bioquímicos, fisiológicos, histológicos, morfológicos e comportamentais (WALKER et al., 2005).

Neste contexto, a medida da atividade da enzima butirilcolinesterase em sangue é um biomarcador clássico que tem sido usado para diagnosticar exposição a carbamatos e efeito tóxico destes compostos em vertebrados (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2004). De modo semelhante, enzimas indicadoras de estresse oxidativo como a catalase e a glutathione-S-transferase são frequentemente relacionadas à exposição dos animais a contaminantes químicos orgânicos como os hidrocarbonetos aromáticos, dentre outros (GUTTERIDGE; QUINLAN, 1993).

Parâmetros hematológicos são biomarcadores não-destrutivos de avaliação de efeitos na ecotoxicologia (FOSSI et al., 1997), que fornecem informações importantes sobre o estado de saúde de um animal, corroborando o diagnóstico clínico de diferentes doenças, sendo possível detectar alterações imunológicas, anemias, estado de hidratação, entre outros (IBAMA, 2005). Desta forma, estas informações podem ser utilizadas como indícios de potenciais efeitos decorrentes da contaminação destes organismos (ADHIKARI et al., 2004).

Estudos utilizando biomarcadores não destrutivos em mamíferos marinhos são escassos, decorrente dos poucos espécimes mantidos em cativeiros, das dificuldades em ter acesso a carcaças frescas ou ainda das limitações em avaliar os animais em vida livre. Entre as poucas informações existentes a esse respeito podem ser destacados os trabalhos com pinípedes (FOSSI et al., 2008; FOSSI et al., 2006; FOSSI et al., 1997; NYMAN et al., 2003; TANABE, 2002; TROISI; MASON, 1997) e cetáceos (FOSSI et al., 2000; TERAMITSU et al., 2000). Entretanto não foi encontrado nenhum relato envolvendo biomarcadores de contaminação química em sirênios.

Em seu trabalho de revisão Belanger e Wittnich (2008) reportam que de 1954 a 2008 foram publicados 482 artigos com sirênios, sendo 163 com peixes-bois. A maioria dos artigos abordou temas relacionados ao habitat, alimentação, estimativas de abundância e impactos de ações antropogênicas em geral, e somente poucos trabalhos recentes abordaram contaminantes ambientais.

Considerando o crescente desenvolvimento e a potencial contaminação química em regiões costeiras do litoral nordestino, que são habitat natural dos peixes-bois marinhos, torna-se de fundamental importância para a estratégia de conservação da espécie a geração de informações sobre os níveis de contaminantes nestes animais, para que se possa iniciar uma avaliação detalhada do risco ecológico envolvido e dos potenciais efeitos deletérios na saúde dos espécimes.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a contaminação por metais pesados de peixes-boi marinhos cativos nos estados de Pernambuco, Alagoas e Paraíba, e analisar os potenciais efeitos biológicos com base em biomarcadores bioquímicos, hematológicos, biométricos e comportamentais.

4.2 Metodologia

4.2.1 Animais e Área de Estudo

Os 16 animais estudados estavam mantidos em cativeiros localizados nos estados de Pernambuco, Paraíba e Alagoas. No estado de Pernambuco o cativeiro é localizado nas instalações do Centro de Reabilitação do Projeto Peixe-Boi, em forma de oceanário, vinculado ao Centro Nacional de Pesquisa, Conservação e Manejo de Mamíferos Aquáticos (CRAS/CMA/ICMBio) na Ilha de Itamaracá (ITA). Neste local foram avaliados cinco fêmeas e três machos, com idades entre três e seis anos. Estes animais foram mantidos em oceanários de reintrodução, com capacidade de aproximadamente 67,84 m³ e 31,80 m³ água.

Os animais avaliados no estado da Paraíba (PAR) e Alagoas (ALA) representam indivíduos ao final do período de readaptação aos respectivos ambientes naturais, aproximadamente 6 meses após sua transferência do cativeiro de Itamaracá. O cativeiro na Paraíba foi construído em uma área de estuário localizada no rio Mamanguape, com

aproximadamente 2500m², e estavam presentes nestas instalações uma fêmea e três machos, com idades entre seis e quinze anos. O cativeiro no estado de Alagoas (ALA) foi construído também em uma área de estuário com aproximadamente 1050 m², localizado no rio Tatuamunha, e os quatro animais incluíram uma fêmea e três machos, com idades entre seis e oito anos (Tabela 1). Todos peixes-bois estudados faziam parte do programa de reintrodução, e por isso possuem faixa etária e condições de saúde semelhante, conforme as orientações de Lima et al. (2007).

Nome	Local	Data de resgate	Sexo	Origem
Arani	Alagoas	19/10/2002	Macho	Barro Preto Aquiraz-CE
Atol	Alagoas	9/4/2002	Macho	Ponta do Mel - RN
Cristal	Alagoas	31/1/2004	Fêmea	Coqueirinho - PB
Tinga	Alagoas	20/5/2002	Macho	Icapuí - Ceará
B4	Pernambuco	19/2/2005	Fêmea	Aracati - CE
B6	Pernambuco	18/7/2007	Fêmea	Lucena - PB
Canoa	Pernambuco	15/9/2006	Fêmea	Aracati - CE
Maya	Pernambuco	20/11/2007	Fêmea	Porto do Mangue - RN
Noel	Pernambuco	24/12/2006	Macho	Areia Branca - RN
Telinha	Pernambuco	14/10/2007	Fêmea	Areia Branca - RN
Tupã	Pernambuco	22/1/2005	Macho	Beberibe-CE
Zoé	Pernambuco	5/1/2005	Macho	Praia de Diogo Lopes - RN
Guape	Paraíba	8/12/1995	Macho	Coqueirinho - PB
Mel	Paraíba	30/3/2001	Fêmea	Ponta Grossa - CE
Puã	Paraíba	21/11/2004	Macho	Porto de Mangues - RN
Tico	Paraíba	18/3/2001	Macho	Prainha Canto verde - CE

4.2.2 Coleta do material biológico

Foram coletadas uma amostra de sangue de cada um dos 16 peixes-boi marinhos mantidos nos três cativeiros distintos, por veterinários do Projeto Peixe-Boi durante as avaliações clínicas dos animais manejados. Para este procedimento foi realizada a venopunção da veia braquial localizada na nadadeira peitoral e o sangue coletado foi

armazenado em dois tubos distintos de “vacutainer”, sendo um destes apresentava anticoagulante Heparina (para as amostras destinadas à análise de metais pesados) e o outro com anticoagulante EDTA (no caso das amostras destinadas a análises de biomarcadores). Posteriormente, as amostras foram transferidas a microtubos de 2mL (“eppendorfs”) devidamente identificados, sendo que as amostras destinadas à análise de metais pesados foram armazenadas em freezer a -20°C até o processamento. As amostras destinadas às análises de biomarcadores foram centrifugadas imediatamente após a coleta a uma rotação de 7.000 rpm com centrífuga Baby I marca Fanen, sendo separado o plasma de eritrócitos, ambas frações foram armazenadas em microtubos de 2ml, e imediatamente transferidas para cilindro de nitrogênio líquido, onde permaneceram até as análises. Este período variou de 10 a 5 meses de armazenamento, conforme a data da coleta.

4.2.3 Análise de metais

As análises dos metais alumínio (Al), magnésio (Mg), ferro (Fé), zinco (Zn), cobre (Cu), cadmio (Cd), cromo (Cr), estanho (Sn) e chumbo (Pb) foram realizadas em amostras de sangue total dos animais, através da espectrofotometria de massa de dupla focalização com fonte de plasma indutivamente acoplado (HR-ICPMS), Element 1 com a geometria reversa de Finnigan MAT, Bremen, Alemanha, no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), da Universidade de São Paulo – USP.

As medidas de quantidade de amostras foram sempre tomadas em peso através de balança analítica modelo BK 600 da GEHAKA (Ind. e Com. Gehaka Ltda. SP - Brasil). Para todo procedimento de pesagem sempre foi executado certificação prévia da calibração da balança através de pesos padrão.

Foram realizadas preparações de solução padrão dos mesmos analitos a serem quantificados no HR-ICPMS. Estas soluções foram preparadas a partir de transferência, com micropipetas previamente calibradas, de alíquotas de três soluções padrão elementar SPEX (cat CLMS-2, cat PLSN5-2Y e cat JB 188).

Para obtenção da curva de calibração foram preparadas soluções de cinco concentrações diferentes, sendo elas de 0,1; 0,5; 1; 2 e 5 ppb. Esta preparação foi realizada a partir da diluição da solução original (1000 µg/L) até uma concentração intermediária, para então ser obtida a concentração final, evitando assim a manipulação de quantidade de material muito pequena, o que acarretaria em maior nível de incerteza das dosagens.

O processo de digestão das amostras consistiu da adição de 100 µl de sangue a 400 µl de ácido nítrico concentrado HNO₃ suprapuro em tubos Falcon, e a mistura foi colocada em banho maria em chapa aquecedora a uma temperatura de 40°C por um período de aproximadamente 20 minutos, ou até que fosse possível identificar um clareamento da amostra. Após a digestão da amostra, foram adicionados 1ml de Índio (In) 10 ppb (padrão interno), e 0,25% EDTA em água deionizada MiliQ (18,2 MΩ.cm a 25°C), sendo o volume total aferido até 10ml.

Foram realizadas seis leituras de brancos das amostras através da análise de água MiliQ inserida em tubos de heparina do modelo utilizado na coleta do sangue, que foram transferidas para microtubos de 2ml onde permaneceram congelados por três meses para posterior análise. Os resultados foram certificados pelo padrão Seronorm Trace Elements Whole Blood III (404109) os valores de recuperação ficaram entre 86,3% a 97%.

4.2.4 Análise de biomarcadores enzimáticos

Para avaliação de biomarcadores foram realizados testes da atividade da Butirilcolinesterase (BChE) em plasma, e testes da Catalase e glutathione-S-transferase (GST) em eritrócitos.

Foram realizadas dosagem de proteínas no plasma através do Método de Peterson (Lowry modificado), onde foram processadas alíquotas de 5 µl de plasma.

A dosagem de hemoglobina foi realizada através do Kit Padrão Hemoglobina Bioclin (L 0053 V. 06/2011), sendo utilizado 2,5 ml do reagente de trabalho e 10 µl do padrão e processados de acordo com descrição da bula, disponível em <http://www.bioclin.com.br/iuso/padraohemoglobina.pdf>.

O teste de inibição da enzima Butirilcolinesterase foi realizado baseado no trabalho de Franz Worek (1999). Foram utilizados 50 µl de amostra e reagente colorimétrico DTNB (5,5'-ditio-bis-ácido 2-nitrobenzóico), sendo realizadas leituras em duplicatas a 412 nm em aparelho ELISA Pharmacia Biotech - Ultrospec 3000 - UV/Visible Spectrophotometer.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), sendo analisada a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio. Foram utilizados 5 µl de amostras diluídos em 995 µl de tampão, a leitura da absorbância foi realizada em 240 nm, e a atividade foi expressa em µmol.min⁻¹.mg de

hemoglobina⁻¹. A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Keen et al., (KEEN et al., 1976), seguindo-se a complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDB). A leitura da absorbância foi realizada em 340 nm, e a atividade expressa em nmol.min⁻¹.mg de hemoglobina⁻¹.

4.2.5 Biomarcadores hematológicos

Foram coletados tubos de 4ml de sangue total em tubos “vacutainer” com anti-coagulante (EDTA), sendo um tubo para cada animal e a coleta realizada da mesma forma que foi descrita para as análises destinadas a contaminantes. O tubo foi invertido várias vezes para perfeita homogeneização. As análises de hemácias (He: 10⁶/μL) hemoglobina (Hb: g/dL), hematócrito (Ht: %), volume corpuscular médio (VCM: fl), hemoglobina corpuscular média (HCM: pg/He), volume da hemoglobina corpuscular média (VHCM g/dL), e leucócitos (Le 10³/μL) foram realizadas no laboratório de hematologia do CMA, no mesmo dia da coleta, através de contador automático de células sanguíneas (Analisador Celm® CC 550 – CELM). Para análise diferencial foram feitas lâminas de estirado sanguíneo, posteriormente coradas com corante panótico rápido (Instant Prov kit corante rápido, Newprov). As lâminas foram lidas em microscópio ótico a um aumento de 400x a 1.000x.

4.2.6 Análise comportamental

Para o monitoramento etológico o método animal focal (ALTMANN, 1974) foi utilizado em sessões de três minutos, durante um período de 30 dias de observação em cada base, onde foram realizadas 8 horas de esforço por dia. O total de horas de observação foi de 202,2h para os quatro animais mantidos na Base de Porto de Pedras, Alagoas (ALA) durante o mês de setembro de 2009, 188,2 h de monitoramento para os 8 animais na base de reabilitação em Itamaracá-PE no mês de dezembro de 2009, e 159,05h para os 4 animais na base de readaptação da Barra de Mamanguape (PAR) no mês de março de 2010.

As condutas comportamentais foram divididas em quatro categorias, sendo elas individual, agonística, afiliativa e estereotipia. A categoria individual abrange os comportamentos onde os animais executam atividades essenciais de locomoção, alimentação,

repouso e conforto, tais como beber água, coçar, explorar etc.. A categoria agonística está relacionada a comportamentos que envolvem agressividade entre os indivíduos, tais como empurrar, bater nadadeira, bater cauda entre outros. Já a categoria afiliativa indica alguma forma de afiliação entre os indivíduos através de interações como abraçar, beijar, tocar focinho, tocar nadadeira e por último a categoria estereotipia que expressa comportamentos repetitivos sem uma função lógica reconhecida, sendo estas condutas geralmente relacionadas ao estresse de confinamento e podem ser indicadas por natação em círculo, movimentos em vai e vem e bater com a cabeça ou focinho em estrutura delimitante do cativeiro.

Os resultados da análise comportamental estão representados em frequência da conduta comportamental expressa em minutos, tendo sido contabilizado o tempo em que o animal executou a atividade, e este valor foi dividido pelo tempo total de observação.

4.2.7 Análise de Dados

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software Sigmapstat, a um alfa de 5% para todas as análises. A ANOVA um fator foi utilizada para os dados que apresentaram uma distribuição normal e homogeneidade de variância. Para os dados que não apresentaram uma distribuição normal ou heterodasticidade foi utilizada a análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis. Em ambas as situações foram avaliadas diferenças entre as concentrações de metais pesados, de atividades enzimáticas, dos parâmetros hematológicos e comportamentais entre os tratamentos representados por animais mantidos nos cativeiros de ITA, PAR e ALA.

Havendo diferença significativa entre os tratamentos, foram aplicados testes de comparação múltipla de Tukey com correção de Bonferroni, no caso da análise de variância paramétrica, e de Dunn no caso da análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis. A avaliação da existência de correlações entre os parâmetros foi realizada com base na correlação de Spearman.

4.3. Resultados

4.3.1 Metais

Todos os metais analisados, Al, Mg, Fe, Zn Cu, Cd, Cr, Sn e Pb foram detectados no sangue dos peixes-bois marinhos.

Os elementos essenciais detectados em maiores concentrações nos animais das três regiões foram Fe, com médias entre 216 e 235 µg/g, Mg, com médias entre 36 e 40 µg/g, e Zn, com médias entre 9,5 e 11,0 µg/g (Tabela 1). Outros metais essenciais analisados e detectados numa faixa mais baixa de concentrações foram o Cu, com médias entre 0,70 e 0,92 µg/g, e Cr, que apresentou médias entre 0,007 e 0,010 µg/g. Dentre os metais não essenciais, as médias de Cd variaram entre 0,0015 e 0,0019 µg/g, as médias de Sn variaram entre 0,018 e 0,049 µg/g, as médias de Pb variaram entre 0,043 e 0,100 µg/g e as médias de Al entre 0,407 e 0,112 µg/g (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de metais em sangue (µg/g peso úmido) de peixes-boi marinhos *Trichechus manatus* (média ± desvio padrão) nas regiões de Pernambuco, Alagoas e Paraíba

Elemento	Pernambuco				Alagoas				Paraíba			
	Média	±	desvio	Máx.- Mín	Média	±	desvio	Máx.- Mín	Média	±	desvio	Máx.- Mín
Fe	235,3	^a ±	60,2	341,8 - 172,0	216,4	^a ±	14,1	241,0 - 207,8	229,0	^a ±	45,6	278,8 - 169,4
Mg	36,3	^a ±	4,9	42,0 - 27,1	40,3	^a ±	5,9	48,27 - 34,15	36,2	^a ±	3,9	41,86 - 32,95
Zn	10,1	^a ±	2,5	14,9 - 7,6	9,5	^a ±	1,6	12,21 - 7,87	11,0	^a ±	2,2	13,31 - 9,016
Cu	0,90	^a ±	0,5	1,804 - 0,387	0,70	^a ±	0,1	0,788 - 0,571	0,92	^a ±	0,4	1,461 - 0,695
Cr	0,010	^a ±	0,0	0,015 - 0,006	0,007	^a ±	0,0	0,010 - 0,004	0,009	^a ±	0,0	0,013 - 0,007
Cd	0,0017	^a ±	0,0	0,004 - 0,001	0,0019	^a ±	0,0	0,004 - 0,001	0,0082	^a ±	0,0	0,030 - 0,001
Sn	0,019	^a ±	0,0	0,020 - 0,017	0,018	^a ±	0,0	0,018 - 0,017	0,049	^b ±	0,1	0,133 - 0,018
Pb	0,050	^a ±	0,0	0,094 - 0,029	0,043	^a ±	0,0	0,049 - 0,032	0,100	^b ±	0,1	0,192 - 0,052
Al	0,27	^a ±	0,1	0,407 - 0,112	0,19	^a ±	0,1	0,298 - 0,116	0,37	^b ±	0,1	0,489 - 0,277

a, b: letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias (Anova seguido de Tukey, $p < 0,05$).

Animais da região da Paraíba apresentaram concentrações estatisticamente diferentes para os elementos Sn (Kruskal-Wallis, $H = 8,1$, 2 graus de liberdade, $p = 0,017$), Pb (ANOVA I, $F_{2,16} = 4,179$, $p = 0,038$) e Al (ANOVA I, $F_{2,16} = 3,87$, $p = 0,046$), sendo detectados valores mais elevados para estes elementos, quando comparados aos animais dos outros estados (Alagoas e Pernambuco) (Anova seguida de testes de Tukey e Dunn, $p < 0,05$) (Tabela 1).

Não foram detectadas correlações entre presença de metais e dados biométricos de peso ($p=0,205$) e comprimento ($p=0,274$) entre os animais.

Foram verificadas relações lineares crescentes entre as concentrações no sangue dos elementos Zn e Fe ($r^2 = 0,798$, $p < 0,001$) (Figura 1), e Mg e Fe ($r^2 = 0,23$, $p=0,047$) (Figura 2).

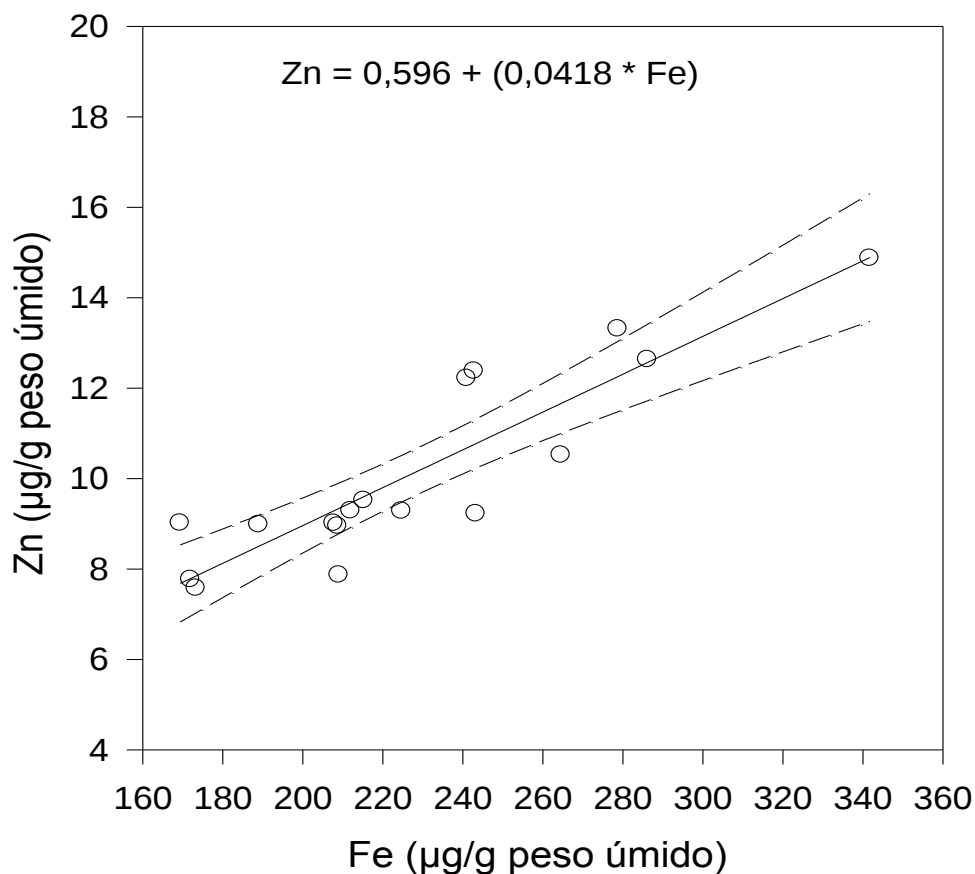


Figura 1. Regressão linear entre a concentração de zinco e de ferro no sangue de peixes-bois marinhos ($R^2 = 0,798$, $p < 0,001$), linhas pontilhadas indicam limite de confiança de 95% da regressão.

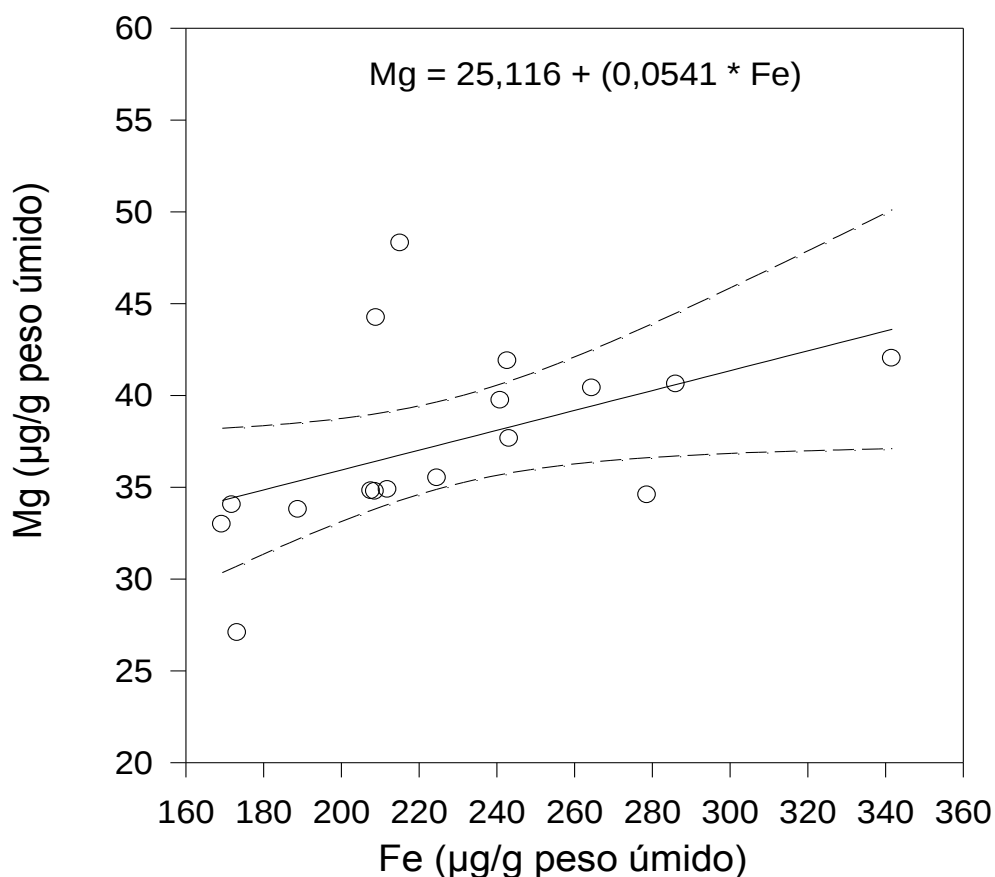


Figura 2. Regressão linear entre a concentração de magnésio e de ferro no sangue de peixes-bois marinhos ($R^2 = 0,23$, $p = 0,047$), linhas pontilhadas indicam limite de confiança de 95% da regressão.

4.3.2 Biomarcadores Enzimáticos

Foi evidenciada uma inibição da atividade da enzima Butirilcolinesterase (BChE) nos animais cativos nos estados de Alagoas e Paraíba, tendo como referência ou controle os animais cativos no estado de Pernambuco (Anova seguido de Tukey, $p < 0,05$). A atividade da butirilcolinesterase foi de $0,0016 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nos animais cativos em Pernambuco, e decresceu para $0,0010$ e $0,0009 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nos animais cativos em Alagoas e na Paraíba, respectivamente (Tabela 2 e Figura 3).

A atividade das enzimas GST e CAT não apresentaram diferenças significativas entre os animais mantidos nas três regiões (Tabela 2).

Tabela 2: Biomarcadores enzimáticos representados pela atividade das enzimas catalase (CAT: U.mg hemoglobina⁻¹), glutathiona-S-transferase (GST: U.mg hemoglobina⁻¹) e butirilcolinesterase (BChE: $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) quantificados em sangue de peixes-boi *Trichechus manatus* das regiões de Pernambuco, Alagoas e Paraíba.

Enzimas	Pernambuco			Alagoas			Paraíba		
	Média	±	desvio	Média	±	desvio	Média	±	desvio
CAT	75,5	a ±	20,6	56,7	a ±	17,9	85,1	a ±	9,6
GST	25,7	a ±	4,9	26,2	a ±	4,6	25,3	a ±	6,1
BChE	0,0016	a ±	0,0004	0,0010	b ±	0,0004	0,0009	b ±	0,0004

a, b: letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias (Anova seguido de Tukey, $p < 0,05$).

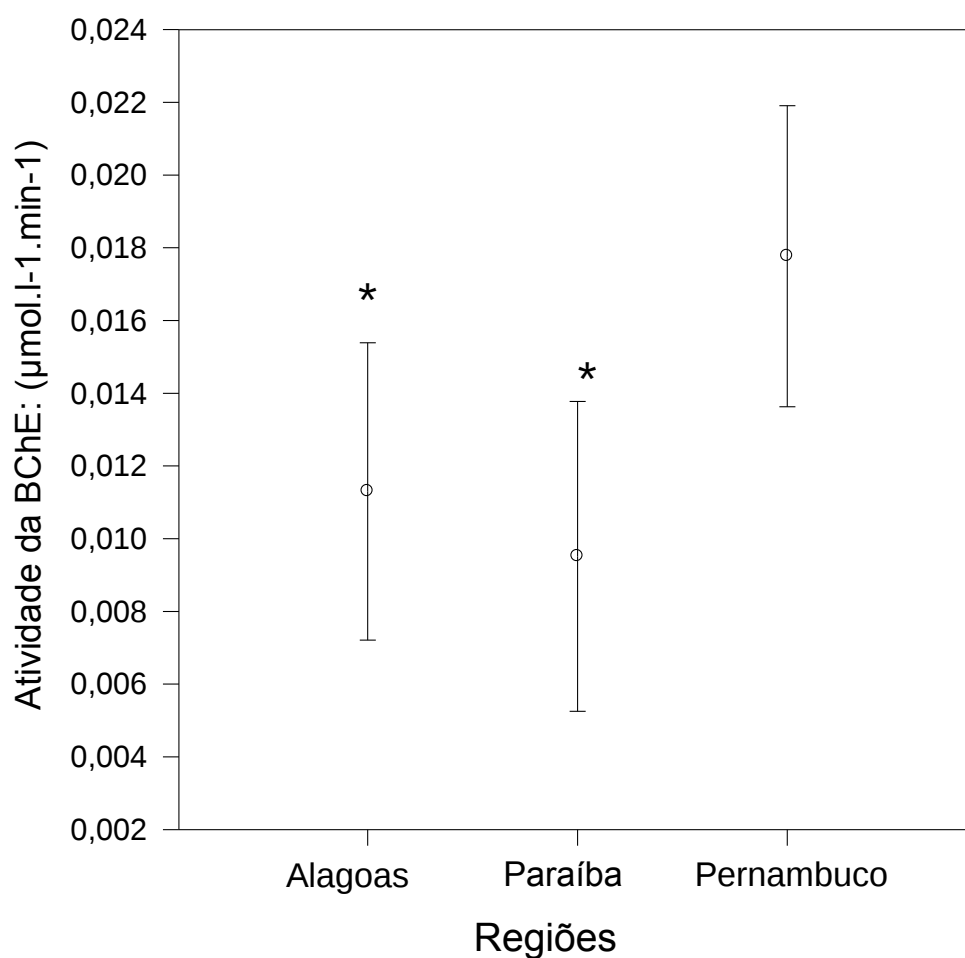


Figura 3. Atividade da enzima Butirilcolinesterase em plasma de peixes-bois mantidos em cativeiros naturais nos estados de Alagoas e Paraíba e mantidos em oceanários no estado de Pernambuco (ANOVA I, $F_{2,16} = 6,690$, $p = 0,009$).

*: diferença estatisticamente significativa com relação aos animais cativos em Itamaracá, Pernambuco - teste de Bonferroni $P < 0,05$).

4.3.3 Biomarcadores hematológicos

Não foi detectada diferença no número de hemáceas, no teor de hemoglobina e no número de leucócitos quantificados nos animais das diferentes regiões. Os valores situaram-se ao redor de 2×10^6 hemáceas/mL, 9 g hemoglobina/dL e $4,5 \times 10^3$ leucócitos/mL (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros hematológicos (média $\pm$ desvio padrão) de peixes-boi *Trichechus manatus* cativos nos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco comparados com peixes-boi marinhos da Flórida: hemácias (He: 10^6 /mL) hemoglobina (Hb: g/dL), hematócrito (Ht: %), Volume corpuscular médio (VCM: fl), Hemoglobina corpuscular média (HCM: pg/He), Volume da hemoglobina corpuscular média (VHCM: g/dL) e Leucócitos (Le: 10^3 /mL).

	H e		H b		H t		VCM		HCM		VHCM		Le	
Alagoas	2,25	a $\pm$ 0,09	9,40	a $\pm$ 0,45	28,25	a $\pm$ 1,26	126,25	a $\pm$ 4,92	38,75	a $\pm$ 4,99	32,50	a $\pm$ 0,58	4,90	a $\pm$ 1,02
Paraíba	2,69	a $\pm$ 0,30	9,40	a $\pm$ 1,81	40,55	b $\pm$ 5,44	150,35	b $\pm$ 5,07	34,83	a $\pm$ 4,73	23,25	b $\pm$ 2,38	4,55	a $\pm$ 0,47
Pernambuco	2,49	a $\pm$ 0,37	9,60	a $\pm$ 1,16	29,13	a $\pm$ 3,40	117,75	a $\pm$ 9,79	38,88	a $\pm$ 2,53	33,13	a $\pm$ 1,36	4,58	a $\pm$ 2,14
Flórida	2,81		11,2		16		124		40		32		6,64	

a e b: letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias (Anova seguido de Bonferroni, $p < 0,05$)

* Valores de peixes-bois marinhos da Flórida com base em Stavros (2008)

Por outro lado, foi possível visualizar diferenças significativas na região da Paraíba quando comparada às demais regiões nos parâmetros Hematócrito, que foi igual a 40,5% na Paraíba, enquanto nas outras regiões este situou-se ao redor de 29% (ANOVA I, $F_{2,15} = 15,421$, $p < 0,001$), Volume corpuscular médio (ANOVA I, $F_{2,15} = 22,557$, $p < 0,001$) e volume da hemoglobina corpuscular média (ANOVA I, $F_{2,15} = 59,256$, $p < 0,001$).

Foram verificadas relações lineares decrescentes entre as atividades da GST e o teor de hemoglobina no sangue dos animais ($r^2 = 0,49$, $p < 0,001$) (Figura 4), e entre atividade da CAT e o teor de hemoglobina no sangue dos animais ($r^2 = 0,17$, $p = 0,08$) (Figura 5).

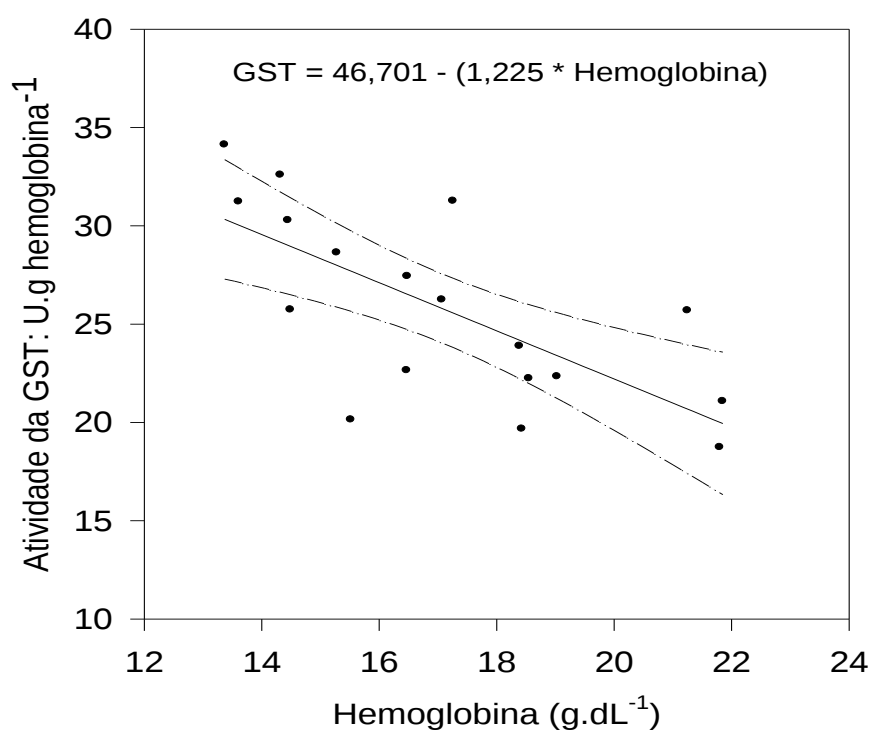


Figura 4. Regressão linear entre a atividade da enzima glutationa-S-transferase em plasma de peixes-bois mantidos nos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco e o teor de hemoglobina no sangue ($r^2 = 0,49$, $p < 0,001$); linhas pontilhadas indicam limite de confiança de 95% da regressão.

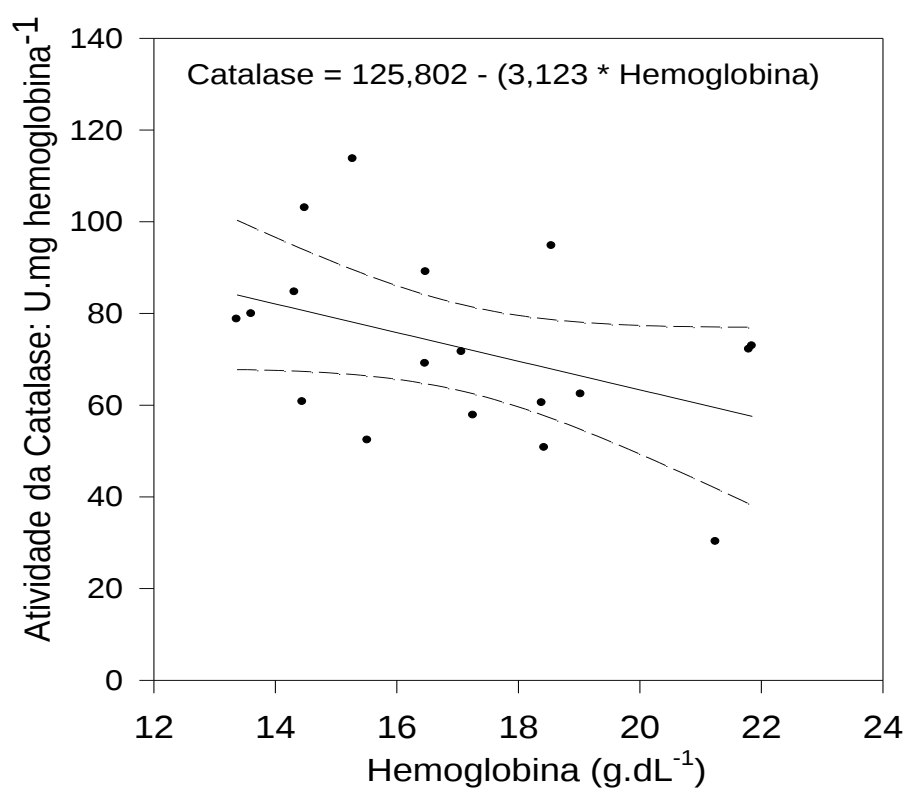


Figura 5. Regressão linear entre a atividade da enzima catalase em plasma de peixes-bois mantidos nos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco e o teor de

hemoglobina no sangue ($r^2 = 0,17$, $p=0,08$); linhas pontilhadas indicam limite de confiança de 95% da regressão.

4.3.4 Análise comportamental

As condutas de estereotipia representadas por atividades repetitivas sem função conhecida, como “natação em círculo”, “Vai-e-Vem” e “Bater Cabeça Contra Estrutura Limitante do Recinto”, apresentaram resultados significativamente maiores em animais cativos em Itamaracá, Pernambuco, perfazendo até 3,6% do tempo total de monitoramento dos animais, enquanto nos animais de Alagoas e Paraíba estas condutas não passam de 0,5% do tempo de monitoramento (Tabela 4). Esta diferença também foi detectada nas condutas de repouso, que foi maior nos animais de Itamaracá, e na conduta de coprofagia, que foi detectada em 0,1% do tempo monitorado somente nos animais de Itamaracá. Não foram detectadas diferenças nas outras condutas comportamentais nas categorias afiliativa, individuais e agonística (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência de condutas comportamentais (atividades afiliativas, individuais, agonísticas, estereotípicas, repouso e coprofagia) de peixes-boi *Trichechus manatus* cativos nos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco expressa pela proporção tempo em minutos em que o animal executou a atividade dividido pelo tempo total de observação

Conduta comportamental	Pernambuco			Alagoas			Paraíba		
	Média	±	desvio	Média	±	desvio	Média	±	desvio
Afiliativo	0,042	a ±	0,022	0,037	a ±	0,015	0,090	a ±	0,085
Individuais	0,260	a ±	0,065	0,303	a ±	0,012	0,400	a ±	0,268
Agonístico	0,004	a ±	0,006	0,025	a ±	0,041	0,106	a ±	0,197
Estereotipia	0,036	b ±	0,032	0,004	a ±	0,005	0,002	a ±	0,003
Repouso	0,220	b ±	0,067	0,076	a ±	0,011	0,145	a ±	0,030
Coprofagia	0,001	b ±	0,001	0,000	a ±	0,000	0,000	a ±	0,000

a, b: letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias (Anova seguido de Tukey, $p<0,05$).

4.4. Discussão

As análises de contaminantes e o uso de biomarcadores em sangue total são de especial importância por possibilitarem amostragens não letais nesta matriz que pode ser utilizada em estudos de animais em que a exposição experimental não é viável e nem recomendada. Nos estudos de contaminantes em mamíferos, especialmente o peixe-boi marinho, trata-se de uma análise pouco invasiva onde é possível avaliar possíveis níveis de contaminantes circulando no corpo dos animais, e tentar relacioná-los com algum parâmetro de efeito biológico. Em humanos o sangue total é considerado um fluido biológico recomendado para detecção de exposição recente de elementos tóxicos (POLKOWSKA et al., 2004).

Os resultados encontrados com os peixes-bois marinhos no nordeste apresentaram níveis mais elevados de contaminação para os elementos não essenciais como Al, Cd, e Pb, quando comparamos as informações publicadas com a espécie na Flórida/EUA (STAVROS; BONDE et al., 2008). Para melhor visualização desta diferença foi calculada a razão entre as medidas obtidas, através da divisão dos valores encontrados neste estudo pelos valores encontrados na Flórida para cada elemento. O mesmo foi realizado para comparação com golfinhos nariz de garrafa (BRYAN et al., 2007; GRIESEL et al., 2008; STAVROS; BOSSART et al., 2008) foca comum (GRIESEL et al., 2008; KAKUSCHKE et al., 2010) e elefante marinho (BARAJ et al., 2001). Todos estes resultados podem ser visualizados na Tabela 5 em $\mu\text{g/g}$.

Tabela 5: Comparação entre a concentração média de metais em sangue ($\mu\text{g/g}$ peso úmido) de peixe-boi *Trichechus manatus* deste estudo com concentrações em sangue registradas para outras espécies de mamíferos aquáticos, através da razão entre as médias encontradas neste estudo e as médias registradas para outras espécies disponíveis na literatura.

Espécies	<i>Trichechus manatus</i>					<i>Tursiops truncatus</i>					<i>Phoca vitulina</i>					<i>Mirounga Leonina</i>				
	Média Alagoas e Itamaracá (A)	Média Paraíba (B)	Média Flórida (C)	Razão A/C	Razão B/C	Média Flórida (D)	Razão A/D	Razão B/D	Média Flórida (E)	Razão A/E	Razão B/E	Média Wadden Sea (F)	Razão A/F	Razão B/F	Média Wadden Sea (G)	Razão A/G	Razão B/G	Média Antártica (H)	Razão A/H	Razão B/H
Fe	226	229	388	0,6	0,6	449	0,5	0,5	467	0,5	0,5	733	0,3	0,3	702*	0,3	0,3	700	0,3	0,3
Mg	38,3	36,2										54,9*				0,7	0,7			
Zn	9,8	11,0	11,3	0,9	1,0	5,27	1,9	2,1	2,7	3,6	4,0	3,4	2,9	3,2	3,6*	2,7	3,1	3,1	3,1	3,5
Cu	0,80	0,92	0,77	1,0	1,2	0,72	1,1	1,3	0,80	1,0	1,1	0,95*	0,8	1	1,1*	0,7	0,8	1,04	0,8	0,9
Cr	0,009	0,009										0,009	1	1,1	0,005*	1,8	1,8	0,007	1,3	1,3
Cd	0,002	0,008	0,001	2,00	8,20							0,002*	1,1	5,3	0,0008*	2,5	10,3	0,004	0,5	2,1
Sn	0,018	0,049	0,002	9,0	24,7							0,0003*	67,1	182,5	0,0012*	15,0	41,1			
Pb	0,047	0,100	0,013	3,6	7,7							0,001	64,2	137,6	0,007*	6,7	14,3			
Al	0,23	0,37	0,03	6,9	11,2	0,03	8,7	14,3	0,03	8,4	13,7	0,25*	0,9	1,5	0,018*	12,6	20,6			

A- Concentração média de metais para os animais das regiões avaliadas neste estudo de Alagoas e Itamaracá.

B- Concentração média de elementos para os animais da Paraíba.

* médias calculadas a partir da média entre o mínimo e máximo disponibilizado pelo autor.

Fontes: (C) Stavros et al 2008 (a), (D) Bryan et al 2007, (E) Stavros et al 2008 (b), (F) Griesel et al 2008, (G) Kakuschke et al 2010 e (H) Baraj et al 2001 .

Elementos essenciais, como Zn, Cu, e Cr apresentaram valores semelhantes aos encontrados na literatura para peixes-bois da Flórida (STAVROS; BONDE et al., 2008) e outros mamíferos aquáticos (BRYAN et al., 2007; FUJISE et al., 1988; GRIESEL et al., 2008; STAVROS; BOSSART et al., 2008), onde as razões entre as médias encontradas neste estudo e as disponibilizadas na literatura mantiveram-se entre 0,9 e 1,2 para as espécies de 'peixes-boi e 0,7 e 4 quando comparadas as outras espécies de mamíferos aquáticos.

Já os elementos não essenciais, Al, Sn, Pb e Cd, foram marcados por valores mais altos encontrados em animais no Brasil. As razões variaram de 2,0 a 24,7 vezes quando comparados com peixes-bois da Flórida e de 0,5 a 182,5 quando comparados com outros mamíferos aquáticos. A razão entre os elementos não essenciais encontrados nos animais das diferentes regiões estudadas nesta pesquisa apontam para uma preocupação com a área de manutenção e reintrodução de peixes-bois marinhos no estado da Paraíba.

Apesar de peixes-bois serem considerados animais com baixa taxa de contaminação por metais pesados pela sua posição na cadeia trófica (O'SHEA, 2003), por serem mamíferos aquáticos herbívoros, apresentarem vida longa e habitarem áreas costeiras, são animais sujeitos à contaminação ambiental (BELANGER et al., 2008), estando mais propensos à contaminação por Chumbo e Cádmio, através da ingestão da vegetação aquática, que segundo Mayes (1977), pode conter altos níveis destes metais pesados.

Dentre os itens alimentares ofertados aos peixes-bois marinhos objeto deste estudo, em especial na região da Paraíba, podemos destacar as espécies de macroalgas *Gracilaria lemaneiformis* e *Hypnea musciformis*, espécies que tem alta capacidade de adsorção de metais pesados, apresentando elevados valores de metais na região de Itamaracá, entre eles Cd e Pb (GUEDES, 2007). Apesar de não ter sido quantificado o teor de metais nestas macroalgas neste estudo, é possível que elas sejam fonte significativa destes metais não essenciais que se acumularam significativamente no sangue dos animais.

Macroalgas são frequentemente utilizadas como bioindicadores pela sua alta capacidade de absorver metais. A parede celular das algas é constituída de polissacarídeos e mucoproteínas, ricos em grupos fosfatos, sulfatos e carboxílicos, que funcionam como uma verdadeira esponja de adsorção para os cátions, absorvendo-os de forma passiva. Com isso os metais são bioacumulados no interior da célula, através do transporte ativo, que envolve grupos ligantes como aminoácidos e citratos, que se complexam com os metais, cruzam as membranas biológicas e os internalizam (HASHIM; CHU, 2004; MUSE et al., 1999).

As concentrações de Chumbo (Pb) encontrados neste estudo estão entre 3,6 e 7,7 vezes superiores aos valores relatados em sangue de peixes-boi da Flórida, e entre 6,7 e 137

vezes superiores às concentrações registradas em *Phoca vitulina* (Tabela 5). O Pb é um elemento não essencial que se acumula no organismo e é considerado altamente tóxico. Entre os efeitos causados pelos altos níveis deste elemento no organismo podemos destacar anemia, doenças renais, disfunções reprodutivas e perturbações neurológicas (EISLER, 2000). Apesar do principal alvo para a toxicidade do chumbo ser o sistema neurológico, efeitos no sistema imune têm sido detectados em mamíferos (DE GUISE et al., 2003).

O sistema nervoso, a medula óssea e os rins são sítios críticos na exposição ao chumbo, enquanto que os distúrbios na função do sistema nervoso e os desvios na síntese da hemoglobina são considerados como efeitos tóxicos críticos (EISLER, 2000). Os desvios hematológicos que levam à anemia pelo chumbo são considerados resultado da sua ação tóxica sobre as células vermelhas e eritrócitos na medula. Estes efeitos incluem inibição da síntese da hemoglobina (Hb) por inibição da desidratase delta-aminolevulínica ácida (ALAD), enzima que cataliza a síntese de porfirobilinogênio (PBG), um precursor da hemoglobina (BUEKERS et al., 2009). Este efeito leva a diminuição do tempo de vida dos eritrócitos circulantes, resultando na estimulação da eritropoese. Apesar da presença de altos níveis de Pb estar diretamente ligada a alterações hematológicas, não foi possível estabelecer uma correlação direta entre estes resultados com parâmetros hematológicos em peixes-bois marinhos estudados. No entanto, nos animais mantidos no estado da Paraíba e que apresentaram uma maior concentração de Pb no sangue foi possível detectar maiores valores de hematócrito e Volume corpuscular médio (VCM), acompanhado pela diminuição do volume da hemoglobina corpuscular média VHCM. Os valores de hematócrito aumentados podem indicar um possível quadro de desidratação dos animais (COSTILL; FINK, 1974).

Se por um lado as razões entre as concentrações de Pb quantificadas neste estudo e as concentrações registradas para outros mamíferos marinhos indica uma contaminação significativa dos peixes-boi objeto deste estudo (Tabela 5), esta abordagem estritamente química sem levar em conta qualquer potencial de efeito biológico pode conter incertezas significativas sobre o real risco que estes animais estão sofrendo desta exposição ao chumbo. Este aspecto pode ser evidenciado se levarmos em consideração o valor de concentração de chumbo no sangue que protegeria 95% das espécies de mamíferos terrestres que foram calculados por Buekers (2009). Estes autores se basearam em estudos que avaliaram efeitos de diferentes concentrações de chumbo no sangue de mamíferos terrestres em parâmetros de efeito biológico relacionados a efeitos no crescimento e reprodução, efeitos fisiológicos, efeitos hematológicos e efeitos bioquímicos. A partir desta análise “Tissue Residue Approach – TRA”, que pode ser traduzida para uma “abordagem de efeitos com base em resíduos

quantificados em tecidos”, chegaram a uma estimativa de que a concentração de 18 $\mu\text{gPb/dL}$ sangue, ou 0,18 $\mu\text{gPb/g}$ sangue, seria a concentração em que seria atingido o limiar inicial de efeitos biológicos em 5% das espécies consideradas. Esta concentração portanto é considerada segura para 95% das espécies, e é 80% superior à concentração de chumbo no sangue de peixes-boi objeto deste estudo na região da Paraíba, com teores de chumbo significativamente superiores comparados a outros mamíferos marinhos relatados acima. Seria interessante gerar informações sobre outros parâmetros de efeito nos peixes-boi da Paraíba com os maiores teores de chumbo como a inibição da ALAD, para avaliar se este parâmetro bastante sensível diretamente ligado ao mecanismo fundamental de toxicidade deste metal estaria sendo afetado diferencialmente já nesta faixa de concentrações.

Com base nos dados de Buekers (2009), podemos supor que os níveis de Pb nos peixes-boi estudados são possivelmente seguros, considerando-se que a sensibilidade dos mamíferos marinhos ao Pb é semelhante a dos mamíferos terrestres que compuseram a base de dados que foi usada para gerar a concentração segura de 0,18 $\mu\text{g Pb/g}$ sangue para mamíferos terrestres. De qualquer forma, esta discussão é interessante para salientar a importância fundamental de se transpor o paradigma frequente para estudos de contaminantes em mamíferos marinhos baseado na análise exclusiva de contaminantes químicos, que é sabidamente insuficiente para análises de risco do efeito de contaminantes que sejam consistentes e com incertezas aceitáveis (O’SHEA, 2003).

A contaminação por Al é frequentemente relacionada a alterações neurológicas em mamíferos (SAVORY et al., 2006), e dentre estas as mais importantes incluem Alzheimer e mal de Parkinson (RAJASEKARAN, 2000). Apesar deste elemento não essencial estar relacionado com alterações comportamentais e estresse oxidativo (RAJASEKARAN, 2000; XIE et al., 1996), em nosso estudo não obtivemos uma correlação entre concentrações de alumínio e os biomarcadores quantificados.

Com relação Sn, é notório que as características físicas, químicas e propriedades bioquímicas de compostos inorgânicos de estanho diferem radicalmente das dos compostos organoestânicos. Existe um consenso geral de que compostos inorgânicos de estanho não são altamente tóxicos devido à sua má absorção e taxa de eliminação rápida nos tecidos (EISLER, 2000)

Os peixes-bois marinhos deste estudo apresentaram concentrações de Sn no sangue significativamente altas, entre 9 e 24 vezes superiores às concentrações de Sn nos peixes-boi da Flórida, e entre 15 e 182 vezes superiores às concentrações de Sn no sangue de *Phoca vitulina* (Tabela 5). A contaminação por estanho inorgânico pode estar ligada a uma variedade

de processos industriais, tais como o reforço de vidro, como catalisadores em várias reações químicas, como estabilizadores em perfumes e sabonetes e como base para tintas coloridas e anticrustantes (EISLER, 2000). Estas últimas são intensamente relacionadas a efeitos adversos em diversos organismos aquáticos, pois esta tinta é extensamente utilizada em embarcações para prevenção de incrustação por invertebrados.

Os principais efeitos sistêmicos da exposição ao Sn incluem ataxia, espasmos dos membros, paralisia, atraso de crescimento e diminuição dos níveis de hemoglobina (EISLER, 2000). Apesar destas relações conhecidas, não encontramos correlação entre a concentração deste metal com biomarcadores hematológicos.

Compostos organoestânicos de butil-estanho são potentes agentes imunotóxicos, segundo trabalho publicado por Kannan (2009) que apresentou valores de experimentação em sangue de vários mamíferos aquáticos in vitro, a proliferação de linfócitos foi suprimida significativamente a uma concentração de 0,077 μg de dibutil-estanho (DBT)/g peso úmido de sangue (0,039 μg Sn/g peso úmido considerando-se a concentração do elemento inorgânico), e a uma concentração de 0,089 μg de tributil-estanho (TBT)/g peso úmido de sangue (0,036 μg Sn/g peso úmido considerando-se a concentração do elemento inorgânico) (KANNAN; TANABE, 2009).

Uma vez que as formas inorgânicas de Sn não são absorvidas pelo trato gastrointestinal e são prontamente excretadas, podemos considerar que o Sn na forma inorgânica total que foi quantificado nas amostras de sangue de peixes-bois deste estudo pudesse estar na forma orgânica no sangue destes indivíduos avaliados. Com esta consideração a concentração imunotóxica de aproximadamente 0,03 μg Sn/g peso úmido estaria sendo atingida no sangue dos animais na Paraíba, e estaria 50% acima das concentrações detectadas nas outras regiões avaliadas. Por outro lado, estas concentrações no sangue em que foi detectada imunotoxicidade em mamíferos são significativamente superiores aos valores detectados em outros mamíferos marinhos na Tabela 5.

Dorneles e colaboradores (2008) avaliaram a exposição de cetáceos a compostos organoestânicos com base nos teores de Sn total no fígado, e encontraram um elevado nível de contaminação por organoestânicos nas espécies analisadas em comparação com cetáceos de outras regiões do mundo. Segundo estes autores, os valores encontrados no fígado do golfinho *Sotalia guianensis* oscilaram entre uma mediana de 4,9 μg Sn/g peso úmido na Baía da Guanabara e 0,34 μg Sn/g peso úmido no Espírito Santo. Considerando-se que o Sn na forma inorgânica total que foi quantificado nas amostras de fígado destes golfinhos estivesse na forma orgânica neste tecido, a concentração imunotóxica de aproximadamente 0,1 μg Sn/g

peso úmido estaria sendo atingida no fígado dos animais tanto na região menos contaminada do Espírito quanto nos animais altamente contaminados por Sn na Baía de Guanabara, com concentrações quase 50 vezes superiores a esta concentração imunotóxica relatada.

Em relação aos biomarcadores bioquímicos representados pelas enzimas catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), que são enzimas antioxidantes induzidas em condições de estresse oxidativo, este estudo não detectou diferenças significativas nestes parâmetros entre as regiões estudadas. Isso pode ser explicado pelo fato de mamíferos aquáticos possuírem uma capacidade de lidar com a supersaturação de nitrogênio e tolerar longos períodos de apnéia através de várias alterações morfo-fisiológicas, o que implica ainda na capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio de forma muito mais satisfatória, ou seja, mamíferos aquáticos possuem elevado índice de defesa antioxidante quando comparados a mamíferos terrestres (WILHELM FILHO et al., 2002).

Entretanto, independente das regiões de origem dos animais avaliados, foi detectada uma relação linear inversa entre a atividade da GST e da CAT, e o teor de hemoglobina no sangue dos animais avaliados. A liberação de hemoglobina para o plasma e sua decomposição a partir da lise de eritrócitos pode gerar estresse oxidativo (ROTHER et al., 2005), e esta situação poderia estar ocorrendo nestes animais com menor teor de hemoglobina, em que a atividade da GST e da CAT são nitidamente mais altas, conforme pode ser verificado pelas regressões lineares nas Figuras 3 e 4.

A Butirilcolinesterase desempenha um importante papel no apoio das atividades da Acetilcolinesterase e regulação colinérgica quando a AchE está ausente (LI et al., 2000). A inibição da BChE poderia resultar no acúmulo de acetilcolina nas sinapses neuronais, o que pode perturbar o funcionamento normal do sistema nervoso (WANG et al., 2010). Portanto, elementos que interferem no metabolismo da BChE podem estar alterando o funcionamento normal do sistema nervoso central e causando então algum tipo de neurotoxicidade. Além disso, a BChE é o marcador mais útil para a exposição de poluentes como pesticidas organofosforados e carbamatos em organismos (LETICIA; GERARDO, 2008). A detecção de uma inibição estatisticamente significativa da enzima butirilcolinesterase (BChE) nos animais mantidos nos cativeiros de reintrodução nos estados de Alagoas e Paraíba, relativa à atividade desta enzima em Itamaracá, Pernambuco (Figura 3) indica uma possível exposição destes animais a pesticidas deste grupo, uma vez que há agricultura de cana-de-açúcar em ambas regiões, em especial no cativeiro no estado da Paraíba.

Em 2004 a Superintendência de Administração do Meio Ambiente (SUDEMA) do estado da Paraíba realizou um inventário de resíduos sólidos industriais no estado e concluiu

que as maiores quantidades de resíduos sólidos gerados, com 63,3 % do total analisado, está o vinhoto; em segundo lugar, com 22,3% o bagaço de cana e em terceiro lugar aparece os resíduos minerais não metálicos com 12,50%, neste caso comum agravante, o passivo ambiental deixado com as áreas degradadas.

A região onde está localizada o cativeiro dos animais no estado da Paraíba fica localizada no município de Rio Tinto e próxima ao município de Cabedelo, onde destaca-se a presença de um porto marítimo-industrial e registro de 47 indústrias no referido município (SUDEMA, 2004). Na Paraíba a grande maioria das indústrias está localizada na região litorânea e possuem planos de gerenciamento de resíduos dispondo seus resíduos sólidos sem nenhum controle ambiental, tendo como destino final, os lixões, os corpos d'água e terrenos baldios das cidades (SUDEMA, 2004), podendo ser esta uma das razões dos altos índices de contaminação encontrada nos animais da região.

No que diz respeito a parâmetros hematológicos estes apresentaram valores semelhantes aos relatados em trabalho recente para peixes-bois marinhos cativos na Flórida (HARVEY et al., 2009), com pequenas ressalvas. Alguns animais apresentaram valores de VCM (volume corpuscular médio) aumentado, esta referência ajuda no diagnóstico do tipo de anemias quando esta é detectada, porém quando detectado de forma isolada a causa é desconhecida, mas é possível considerar a existência de diferença no metabolismo do ferro.

Animais deste estudo apresentaram ainda uma diminuição do número de leucócitos (média $4,58 \times 10^9/L$) quando comparados aos animais da Flórida ($6,64 \times 10^9/L$), porém, com exceção de três animais cativos nos oceanários de Itamaracá que apresentaram uma leucopenia ($2,7; 2,3; 2,5 \times 10^9/L$) os valores variaram entre 4 e $8,7 \times 10^9/L$, sendo considerados normais para espécie (HARVEY et al., 2009). Estas Leucopenias não apresentaram nenhuma correlação com metais ou biomarcadores em questão.

Os dados de monitoramento do comportamento animal não permitiram estabelecer uma conexão com qualquer outro parâmetro estudado. O peixe-boi marinho é um animal de grande porte e baixas taxas metabólicas, isso estabelece o comportamento de repouso como uma de suas principais características comportamentais (HARTMAN, 1979). Para tanto, fica difícil detectar alterações neurocomportamentais nestes animais a ponto estabelecer uma conexão com presença de elementos tóxicos, uma vez que parte destes animais estudados estava em condições de cativeiro sem enriquecimento ambiental, podendo estas estar diretamente ligada a este tipo de alteração comportamental (MASON, 1991).

Os resultados deste estudo ajudam a preencher uma importante lacuna para o conhecimento da contaminação aquática em sangue de peixes-bois marinhos no país. Os

níveis encontrados geram subsídios para maiores esforços de investigação da qualidade do habitat dos animais, especialmente os que habitam a região da Paraíba. É preciso investigar as possíveis fontes de contaminação e monitorar o ambiente para a garantia de proporcionar uma eficiente readaptação dos animais a natureza e desenvolvimento dos mesmos após a reintrodução, e ainda, lutar para a preservação destas áreas que estão entre as de principais ocorrências da espécie. Esperamos que estas informações auxiliem no desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação da espécie no Brasil.

5. Capítulo II

Comportamento Estereotipado em Peixes-bois marinhos cativos

5.1 Introdução

Mamíferos aquáticos são mantidos em cativeiro em várias partes do mundo. Por se tratarem de animais marinhos, que habitam águas turvas e deslocam-se entre estuários e mar aberto, a réplica do habitat de vida do peixe-boi marinho não é uma tarefa fácil, o que pode resultar em um recinto pobre e previsível. Segundo Wemelsfelder (1997), ambientes assim podem induzir um animal a diferentes respostas comportamentais negativas, tais como frustração, apatia e comportamentos estereotipados.

As estereotipias têm uma importância especial, pois elas podem ser indicadores comportamentais confiáveis de um baixo nível do bem-estar animal (MASON, 1991; MASON; LATHAM, 2004), consideradas como uma cicatriz de ambientes inadequados (SWAISGOOD; SHEPHERDSON, 2005). Alguns estudos sugerem uma relação de estereotipia com técnicas de manejo (GRANDIA et al., 2001), período do dia (GRANDIA et al., 2001), período do ano (CARLSTEAD et al., 1991), frequência de interação social (FISCHBACHER; SCHMID, 1999) e tamanho do habitat de vida na natureza (CLUBB; MASON, 2003).

O termo “estereotipia” pode ser definido a partir de três características: (i) possuírem um padrão definido, (ii) serem frequentemente repetidos e (iii) não possuírem uma razão conhecida para sua execução (KEIPER, 1969; MARRINER; DRICKAMER, 1994; MASON, 1991).

Infelizmente, um número reduzido de estudos abordam a temática da estereotipia em cativeiro para mamíferos aquáticos, entre eles podemos ressaltar trabalhos com o Urso Polar, *Ursus maritimus* (GRITTINGER, 2004; ROSS, 2006; WECHSLER, 1991), pinípedes *Odobenus rosmarus* (KASTELEIN et al., 2007; KASTELEIN; WIEPKEMA, 1988; 1989; MASON, 2010), *Eumetopias jubatus* e *Phoca vitulina* (GRINDROD; CLEAVER, 2001). Até o momento, nenhum trabalho abordou o grupo dos sirênios.

O peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*), animal herbívoro e pertencente à ordem sirênia, se distribui ao longo de estuários, lagos e costa oceânica da Flórida, limite norte, até a costa nordestina do Brasil, seu limite sul (LEFEBVRE et al., 2001). Do ponto de vista de sua conservação no mundo, ele é classificado como "Vulnerável" (IUCN, 2010). No Brasil, ele é o mamífero aquático mais ameaçado de extinção (IBAMA, 2001).

A literatura revela estudos comportamentais deste sirênio são realizados internacionalmente (BLAIR IRVINE, 1983; HARTMAN, 1979; KING; HEINEN, 2004;

MARSHALL et al., 1998; MARSHALL et al., 2003; NOWACEK et al., 2004; O'SHEA; KOCHMAN, 1990; REYNOLDS; ODELL, 1991) mas com poucos registros para o Brasil (ARAUJO; MARCONDES, 2003; GOMES et al., 2008). Essa é uma lacuna que deve ser imediatamente preenchida pois estudos comportamentais podem ser utilizados como ferramentas de acompanhamento do bem estar animal, bem como auxiliar em estratégias de manejo e conservação da espécie.

No Brasil o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA/ICMBio) e a Fundação Mamíferos Aquáticos (FMA) atuam em atividades de resgate, reabilitação e reintrodução de sirênios através do Projeto Peixe-Boi. Animais resgatados na costa nordestina do Brasil são encaminhados ao projeto onde permanecem em um período de reabilitação em oceanários artificiais. Após aproximadamente 4 anos nesse tipo de cativeiro, ou até que sejam considerados aptos pela equipe de veterinários, eles são translocados para cativeiros em ambiente natural, os quais, por fornecem condições idênticas às da natureza, servem para a readaptação dos animais antes da soltura definitiva.

A presente pesquisa teve como objetivo investigar a presença de estereotipia em três grupos de peixes-bois (*Trichechus manatus*) criado em dois tipos de ambientes: oceanário e cativeiro inserido em ambiente natural. Esperamos que o nosso estudo venha a auxiliar nos esforços de melhoria quanto ao bem-estar e a conservação desses sirênios não apenas localmente como também internacionalmente, através de informações acerca de possíveis respostas negativas ao cativeiro.

5.2 Metodologia

5.2.1 Animais e Cativeiros

Os animais selecionados para o estudo formavam três grupos distintos, sendo um grupo mantido em oceanário na base de reabilitação do Projeto Peixe-Boi (Ilha de Itamaracá/PE), sendo este composto por sete animais, e os outros dois grupos mantidos em cativeiros construídos no ambiente natural nas bases de readaptação, nos estados da Paraíba e Alagoas, sendo cada um destes compostos por quatro animais. Todos os peixes-bois marinhos estudados faziam parte do programa de reintrodução por isso possuem acompanhamento veterinário constante e condições de saúde semelhantes (LIMA et al., 2007).

O monitoramento dos animais cativos de Itamaracá (Grupo 1), foi realizado em dezembro de 2009, o grupo era formado por quatro fêmeas e três machos que estavam em período de reabilitação e foram mantidos nos oceanários de reintrodução. O mesmo é formado por duas estruturas interligadas, onde cada uma destas apresentava a capacidade de $67,84 \text{ m}^3$ e $31,80 \text{ m}^3$ (respectivamente $5,30\text{m}$ comprimento x 4m de largura x $3,20\text{m}$ de profundidade e $5,30\text{m}$ comprimento x 4m de largura x $1,50\text{m}$ de profundidade).

Os animais mantidos no cativeiro em ambiente natural da Paraíba (Grupo 2) foram monitorados em março de 2010 e estavam no recinto há aproximadamente seis meses sendo constituído por uma fêmea e três machos. O cativeiro natural localiza-se na gamboa Caracabú, no estuário do Rio Mamanguape do referido estado. A instalação é circundada por uma extensa área de manguezal e possui 36m de largura na sua porção posterior, 30m de largura na parte anterior e 63m de comprimento, resultando em uma área de 2500m^2 .

Já o Grupo 3, formados por uma fêmea e três machos, foi monitorado no mês de setembro de 2009 e os animais estavam mantidos no recinto de readaptação, localizado em um braço do rio Tatuamunha, na cidade de Porto de Pedras, estado de Alagoas. Este local, com aproximadamente 1.260 m^3 de volume mínimo, estava circundado por uma área de aproximadamente, 1.050 m^2 , onde todos os animais estavam no recinto há aproximadamente 3 meses.

Procedimentos

5.2.2 Alimentação

Os animais do grupo 1 eram alimentados com fanerógamas marinhas (capim-agulha) e vegetais (cenoura e beterraba) como suplemento alimentar somente após as 17 horas, através de canos submersos em 3 pontos do oceanário.

Ao que concerne os animais dos grupos 2 e 3 a alimentação era ofertada de duas a três vezes ao dia, sendo estes itens dispostos em locais diferentes através de canos submersos na tentativa de simular a forma de fixação dos itens alimentares encontradas na natureza.

5.2.3 Observações dos animais

Para o monitoramento etológico o método animal focal (ALTMANN, 1974) foi utilizado em sessões de três minutos, em um período de 30 dias de observação em cada um

dos três grupos. Foram realizadas oito horas de esforço por dia (Tab. 1). O total de esforço de observação foi de 549,45 horas, sendo 202,2h desprendidas com os animais do grupo 3, durante o mês de setembro de 2009, 188,2 h de monitoramento do grupo 1, no mês de dezembro de 2009 e 159,05h no grupo 2, no mês de março de 2010.

5.2.4 Etograma

Foram registrados 36 comportamentos durante todo período de monitoramento (Anexo 1), sendo, quatro destes, indicadores de estereotipia de cativeiro:

Bater Cabeça em Estrutura Limitante (CABEL) – O animal bate a cabeça com força em estruturas limitantes do recinto (parede de fibra ou cerca madeira) de maneira constante, que pode ser variável e durar alguns minutos (Medina, 2008).

Natação em Círculo (NAD CIRC) - O animal desloca-se no recinto, ao redor de um eixo, em movimento circular contínuo, durante tempo variável (Medina, 2008).

Vai e Vem (VAI VEM) - O animal realiza o movimento de vai-vem, balançando o corpo de maneira constante para frente e para trás, durante tempo indeterminado (Medina, 2008).

Bater Focinho (BF) – O animal fica com corpo imóvel próximo a objeto fazendo movimentos com focinho (apenas a parte muscular) rapidamente para cima e para baixo tocando em objeto ou na linha da água. A cabeça não acompanha o movimento.

5.2.5 Análise dos dados

Para obtenção da razão da frequência da estereotipia foi contabilizado a quantidade de vezes em que um animal apresentava tal comportamento por sessão, dividido pelo número total de sessões para aquele mesmo animal (posteriormente, os dados dos animais nos três ambientes foram comparados entre si). Para se verificar uma possível diferença na quantidade de tipos de estereotipia entre os três ambientes somou-se o número máximo de estereotipias apresentado por cada um dos animais e procedeu-se a comparação entre os ambientes. Para as análises foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltipla comparação de Dunn. Foram considerados significativos os resultados cujo $p \leq 0.05$ (bilateral). As análises estatísticas foram realizadas através do programa Instat 3.0 (GraphPad, Inc.).

5.3 Resultados

O número de tipos de comportamentos indicadores de estereotípias em Pernambuco (PE) foi significativamente maior do que os obtidos em Alagoas (AL) e na Paraíba (PB) (Kruskal-Wallis: $N=15$; $KW=10,61$; $p=0,0050$; teste de Dunn: PE vs. PB, $p<0,05$; PE vs. AL: $p<0,05$). No entanto, não houve diferença estatística entre Alagoas e Paraíba quanto ao número dos tipos de estereotipia (teste de Dunn: AL vs. PB, n.s.) (Fig. 1).

De uma forma semelhante, a quantidade de vezes que os indivíduos apresentaram os comportamentos estereotipados, por sessão, foi significativamente maior em Pernambuco (PE) do que nos dois outros locais (Alagoas, AL e Paraíba, PB) (Kruskal-Wallis: $N=15$; $KW=10,81$; $p=0,0048$; teste de Dunn: PE vs. PB, $p<0,05$; PE vs. AL: $p<0,05$). Não houve diferença significativa quanto a esse aspecto entre Alagoas e Paraíba (teste de Dunn: AL vs. PB, n.s.) (Fig. 2).

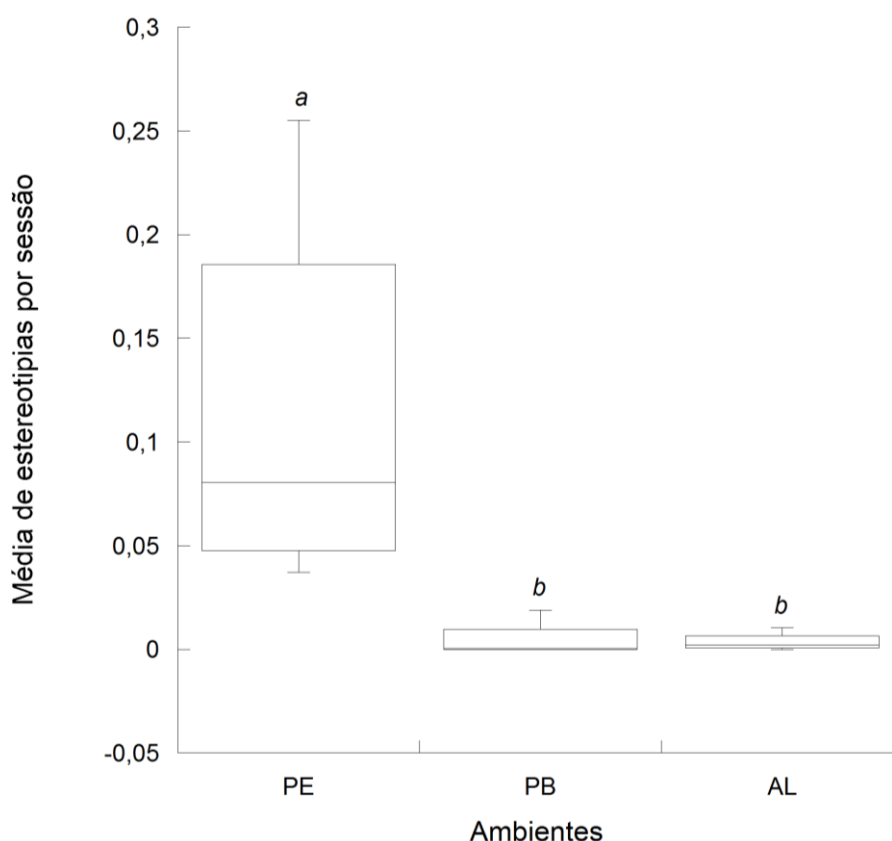


Fig. 1. Número médio de estereotípias, por sessão, apresentado pelos peixes-bois de acordo com os ambientes estudados. Os dados são mostrados como medianas e amplitude interquartis. Estatística: Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn (letras diferentes: $p\leq 0,05$; letras iguais: n.s.). $n=16$. Ambientes: PE = Pernambuco; PB = Paraíba; AL = Alagoas.

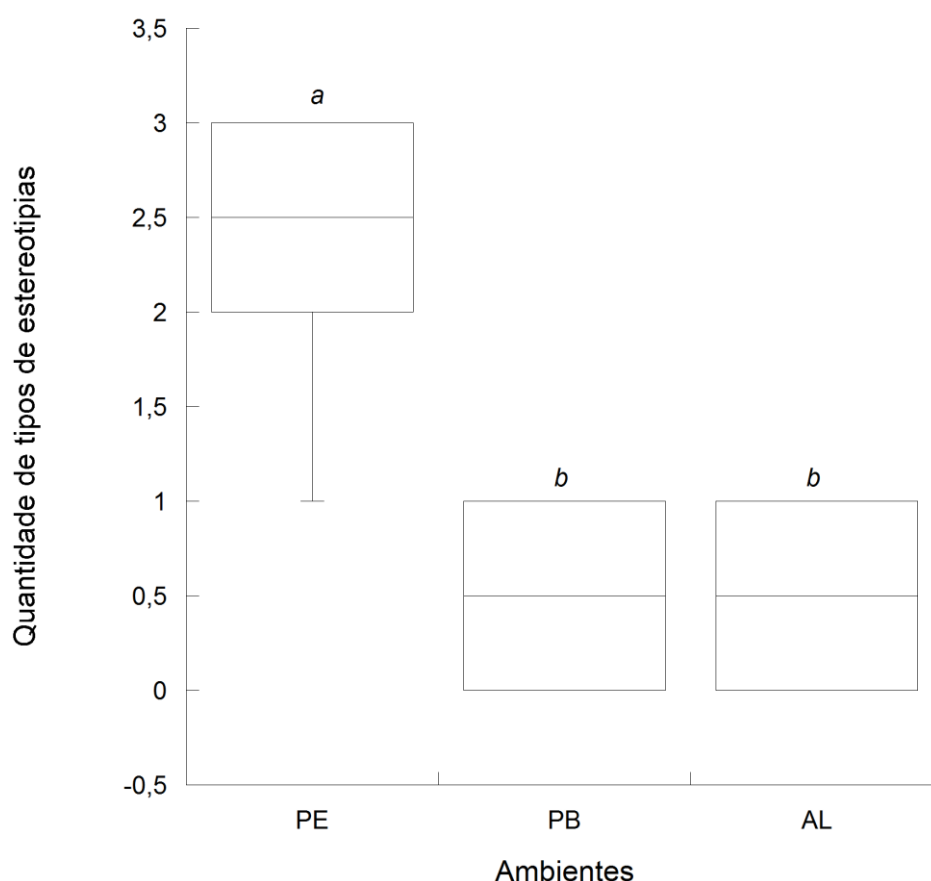


Fig. 1. Quantidade de tipos de estereotípias apresentado pelos peixes-bois de acordo com os ambientes estudados. Os dados são mostrados como medianas e amplitude interquartis. Estatística: Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn (letras diferentes: $p \leq 0,05$; letras iguais: n.s.). $n=16$. Ambientes: PE = Pernambuco; PB = Paraíba; AL = Alagoas.

Os comportamentos “Vai e Vem”(Vai Vem) e “Bater Cabeça em Estrutura Limitante” (CABEL) só foram encontrados em animais que estavam nos oceanários, dos quais, de um total de sete animais, dois apresentaram registros de CABEL e três de Vai Vem. Já o registro de “Natação em Círculo” foi encontrado em todas as bases (Tab 1). Embora presente na quase totalidade dos animais de PE (85%), não houve uma diferença significativa entre "Nadar em Círculo" em PE e nos outros dois ambientes (presente em 50% dos animais) (teste exato de Fisher: $N=15$; $p=n.s.$).

Tabela 1. Presença dos comportamentos estereotipados nas três áreas de estudos, onde X indica presença e – indica ausência do comportamento.

	Animais	Sexo	Idade	CABEL	NAD CIRC	VAI VEM
Grupo 1 (PE)	B6	Fêmea	3	-	X	X
	Canoa	Fêmea	4	X	-	-
	Maya	Fêmea	3	-	X	-
	Noel	Macho	4	-	X	X
	Telinha	Fêmea	3	X	X	-
	Tupã	Macho	6	-	X	-
	Zoé	Macho	6	-	X	X
Grupo 2 (PB)	Guape	Macho	15	-	X	-
	Mel	Fêmea	10	-	-	-
	Tico	Macho	10	-	-	-
	Puã	Macho	6	-	X	-
Grupo 3 (AL)	Atol	Macho	8	-	-	-
	Tinga	Macho	8	-	-	-
	Arani	Macho	8	-	X	-
	Cristal	Fêmea	6	-	X	-

5.4 Discussão

Neste trabalho foi possível visualizar um maior registro de comportamentos de estereotipia em animais cativos em oceanário sem enriquecimento ambiental algum quando comparado a animais cativos em ambientes naturais, onde existem recursos de interação, pontos de fuga, vegetação e turbidez da água idênticos ao habitat de vida livre do animal. Antes da introdução do conceito de enriquecimento ambiental por Markowitz (1982), a maioria dos ambientes artificiais eram estruturalmente simples e sem resposta ao comportamento. Normalmente, esses ambientes não fornecem aos animais a oportunidade de interagir com o meio de forma a estimular o desenvolvimento das habilidades sensoriais e cognitivas, ou permitir a execução de comportamentos típicos da espécie (MORGAN; TROMBORG, 2007).

Os animais cativos em oceanários (Grupo 1) apresentaram registros de todos os comportamentos estereotipados registrados no estudo, onde os animais em algum momento apresentaram algum destes comportamentos. Isso pode ser explicado pelo tamanho da área não ser suficiente para que o animal realize atividades básicas como deslocamento e exploração do ambiente, ou ainda por se tratar de um ambiente previsível onde animal não precisa procurar comida, nem lutar pela própria reprodução (WEMELSFELDER, 1997).

Foi visível a menor frequência de comportamentos estereotipados em animais mantidos em cativeiros naturais quando comparado aos cativos em oceanários. Apesar dos espécimes mantidos em cativeiro natural (grupo 2 e 3) terem passado parte de suas vidas nos oceanários e possivelmente terem sofrido as mesmas influências do ambiente desfavorecido, este resultado aponta uma possível recuperação do bem estar dos mesmos com a mudança de ambiente. Ross (2006) confirma que mudanças no ambiente e melhoramento do recinto de exposição dos animais têm apresentado resultados positivos nos animais em curto espaço de tempo.

Estudos prévios realizados com ursos polares em cativeiro sugerem que o comportamento estereotipado não precisa estar necessariamente relacionado a altos níveis de atividade (WECHSLER, 1991) e pode diminuir com o tempo (GRITTINGER, 2004).

Neste estudo podemos observar que os animais do grupo 2 e 3, que estavam mantidos em um cativeiro com grande quantidade de áreas cobertas por manguezais, que proporcionam pontos de fuga, e dispondo de visitação restrita apenas a uma das margens do recinto, apresentaram menos frequência do comportamento estereotipado. Enquanto os animais do grupo 1, que apresentaram um “pior” resultado em relação a comportamentos que demonstram o bem-estar animal, não são expostos a visitação, porém são mantidos em um oceanário sem recursos de fuga e sem enriquecimento ambiental algum. Estes resultados corroboram com achados por Stephen Ross (2006), que demonstra um efeito significativo em relação ao comportamento e bem estar dos animais e a oportunidade a ocuparem uma área restrita, um “ponto de fuga”. Em seu estudo ele comprova que os animais aumentaram o comportamento social, a frequência de natação e investigação ambiental o que pode ser indicativo de melhora na qualidade de vida do animal.

A natação em círculo foi encontrada em animais de todos os grupos, mas com maior frequência nos espécimes do grupo 1. O comportamento de estereotipia mencionado é muito conhecido em mamíferos aquáticos. Kastelein e Wiepkema (1989), já reportavam manifestações de nado em círculo como movimentos estereotipados em morsas (*Odobenus rosmarus divergens*) e obtiveram uma diminuição desta estereotipia com enriquecimento ambiental voltado a alimentação dos animais em vários outros estudos (KASTELEIN et al., 2007; KASTELEIN; WIEPKEMA, 1988; 1989).

Em relação à influência no período de alimentação, observamos que o grupo 1, que só recebia alimentação após as 16 horas, apresentou maior ocorrência de estereotipia em relação aos demais grupos, os quais eram alimentados durante o dia. Segundo Bassett e Buchanan-Smith (2007), algumas medidas podem ser tomadas para aumentar a frequência de eventos

positivos na vida dos animais em cativeiro, tais como o fornecimento de uma alimentação variada e a introdução de enriquecimento ambiental. Os autores sugerem que a variação espacial e temporal do oferecimento dos alimentos, simulando a situação de forrageamento em vida livre, estimula comportamentos exploratórios e aumenta o bem-estar dos animais em cativeiro.

Peixes-bois marinhos consomem cerca de 8% de sua massa corporal em plantas aquáticas por dia (REYNOLDS; ODELL, 1991), isso confere sua principal ocupação, a alimentação (HARTMAN, 1979). Desta forma, a falta de oferta alimentícia diurna para os espécimes do grupo 1 pode ter contribuído para a situação de estresse detectada em todos os animais cativos desta base.

Nas últimas décadas, procurando propiciar melhores condições a animais cativos, os pesquisadores têm desenvolvido inúmeras estratégias para tornar os recintos semelhantes ao habitat de vida natural dos animais, através da interactividade dos ambientes tradicionais e artificiais sobre o comportamento e a saúde dos animais em cativeiro (MARKOWITZ, 1982; SHEPHERDSON et al., 1998; WEERD et al., 1997).

O enriquecimento ambiental é uma técnica de manejo animal com estratégias temporais, físicas, sociais e sensoriais que visam oferecer uma série de estímulos que possa aumentar o conforto e a capacidade de adaptação tanto fisiológica quanto psicológica do animal ao cativeiro (FOX et al., 2006). Segundo Rabin (2003) é ainda um meio de encorajar os animais a expressarem comportamentos naturais típicos da espécie. Desta forma, com os resultados do presente estudo reforçamos as recomendações de cativeiros com enriquecimento ambiental apropriados para os peixes-bois marinhos, de forma a contribuir para o bem-estar animal e a conservação dessa espécie, bem como acompanhamento das mudanças comportamentais no período de translocação destes animais para natureza

6. Considerações Finais

Os resultados deste estudo apresentaram os primeiros relatos de contaminantes por metais pesados em peixes-bois marinhos no Brasil enquanto a enzima butirilcolinesterase foi testada pela primeira vez no grupo dos mamíferos aquáticos até onde tivemos acesso. Os resultados preencheram uma importante lacuna para o conhecimento da contaminação aquática em sangue de mamíferos marinhos no país. Animais de diferentes regiões mostraram-se afetados conforme o local em que são mantidos, apresentando valores considerados altos especialmente para elementos não essenciais. Apesar dos níveis relatados serem consideravelmente maiores que os encontrados em muitas espécies de mamíferos aquáticos, não foi possível estabelecer uma correlação efetiva com efeitos deletérios a saúde dos animais baseados nos parâmetros analisados.

Estes resultados despertam para uma maior atenção na qualidade ambiental das áreas onde são mantidos estes animais, recomendando esforços em pesquisas futuras para verificar níveis de contaminação nestes ambientes, bem como quantificação dos níveis de metais encontrados nos itens alimentares ofertados aos animais.

Os resultados encontrados no teste da enzima Butirilcolinesterase sugerem a continuidade de pesquisas de forma a abordar investigações em compostos da classe dos organofosforados e carbamatos que estão diretamente relacionados a inibição desta enzima, bem como efetuar testes de inibição da enzima acetilcolinesterase também amplamente aplicada neste contexto.

Em relação aos comportamentos estereotipados identificados nos animais mantidos em oceanários na Ilha de Itamaracá-PE, fica claro compreender a associação destas condutas a cativeiro previsíveis e sem enriquecimento ambiental. Estes resultados apontam para maiores investimentos no bem estar dos animais cativos, a literatura dispõe de vários estudos que comprovam a diminuição de estereotipia em animais cativos a partir do investimento em atividades de enriquecimento ambiental. A introdução de novas estratégias de busca de alimento nos oceanários, bem como tentativa de replicar o ambiente natural dos animais de forma mais semelhante possível, através de pontos de fuga e inserção de itens que permitam a interação dos animais pode proporcionar uma melhoria no bem estar dos animais cativos.

Estudos que monitorem o comportamento dos animais em período prévio as atividades de enriquecimento ambiental e sigam durante o período de execução podem

assegurar a qualidade e eficácia dos investimentos de forma a proporcionar melhor qualidade de vida aos animais e aumentar a chance de readaptação dos mesmos à natureza.

Esperamos que os resultados deste estudo possam contribuir nas estratégias de manejo e conservação do peixe-boi marinho no país.

7. Referências Bibliográficas

ADDISON, R. F.; ZINCK, M. E.; ACKMAN, R. G. Residues of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in some commercially produced Canadian marine oils. Journal of the Fisheries Research Board of Canada v. 29, p. 349–355, 1972.

ADHIKARI, N. P.; PEHG, X.; ALIZADEH, A.; GANTI, S.; NAYAK, S. K.; KUMAR, S. K. Multiscale modeling of the surfactant mediated synthesis and supramolecular assembly of cobalt nanodots. Physical Review Letters, v. 93, p. 18301 – 18304, 2004.

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H. S.; JAIN, S. K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1523, n. 1, p. 37-48, 2000.

ALBUQUERQUE, C. MARCOLVALDI, G. M. Ocorrência e distribuição do peixe-boi marinho no litoral brasileiro (SIRENIA, Trichechidae, *Trichechus manatus*, Linnaeus, (1758). . *SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A UTILIZAÇÃO DE ECOSISTEMAS COSTEIROS: Planejamento, Poluição e Produtividade*. Rio Grande 1982. p. 27.

ALTMANN, J. Observational Study of Behavior: Sampling Methods. Behavioural v. 49, n. 3-4, p. 227-267 1974.

AMES, A. L. VLEET, E. S. V. Organochlorine Residues in the Florida Manatee, *Trichechus manatus latirostris*. Marine Pollution Bulletin, v. 32, n. 4, p. 374-377, 1996.

AMORIM, L. C. A. O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. Rev. Brás. Med. Trab. Belo Horizonte v. 1, p. 124-132, 2003.

ANDRÉ, J. M.; BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Mercury accumulation in Delphinidae. . Water, Air and Soil Pollut, v. 56, p. 187–201, 1991.

ANDRE, J. M.; RIBEYRE, F.; BOUDOU, A. Mercury contamination levels and distribution in tissues and organs of delphinids from eastern tropical Pacific, in relation to biological and ecological factors. . Marine Environmental Research, v. 30, p. 43–72, 1990.

ARAUJO, J. P. MARCONDES, M. C. Comportamento de dois peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus manatus*) em Sistema de Cativeiro no Ambiente Natural da Barra de Mamanguape, Estado da Paraíba, Brasil. Bioikos, v. 17, p. 21- 32, 2003.

BAINY, A. C. D.; MEDEIROS, I. D.; MEZZARI, M. P.; VENTURA, E.; MULLER, I. C.; MARQUES, M. R. F. Análise de biomarcadores bioquímicos de contaminação aquática em

peixes coletados no litoral do Rio de Janeiro. *I simpósio de monitoramento do ambiente marinho*. Arraial do Cabo 1998.

BARAJ, B.; BIANCHINI, A.; NIENCHESKI, L. F. H.; CAMPOS, C. C. R.; MARTINEZ, P. E.; ROBALDO, R. B. The performance of ZEISS GFAAS-5 instrument on the determination of trace metals in whole blood samples of southern elephant seals (*Mirounga leonina*) from Antarctica. Fresenius Environ Bull, v. 10, n. 12, p. 859–862, 2001.

BARATA, C.; VARO, I.; NAVARRO, J. C.; ARUN, S.; PORTE, C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 140, n. 2, p. 175-186, 2005.

BASSETT, L. BUCHANAN-SMITH, H. M. Effects of predictability on the welfare of captive animals. Applied Animal Behaviour Science, v. 102, n. 3-4, p. 223-245, 2007.

BELANGER, M. P.; WITTNICH, C.; . Contaminant Levels in Sirenians and Recommendations For Future Research and Conservation Strategies Journal of Marine Animals and Their Ecology v. 1, n. 1, 2008.

BENNETT, P. M.; JEPSON, P. D.; LAW, R. J.; JONES, B. R.; KUIKEN, T.; BAKER, J. R.; ROGAN, E.; KIRKWOOD, J. K. Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. Environmental Pollution, v. 112, n. 1, p. 33-40, 2001.

BERTA, A.; SUMICH, J. L.; KOVACS, K. M. Exploitation and Conservation. In: PRESS, A. (Ed.). Marine Mammals: Evolutionary Biology Amsterdam, 2006.

BEST, R. C. T., D. M. Notas sobre a distribuição e “status” aparente dos peixes-bois (Mammalia: Sirênia) nas costas amapenses brasileiras. . Boletim Informativo da Fundação Brasileira para Conservação da Natureza, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1 p. 41-47, 1982.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, 1975.

BLAIR IRVINE, A. Manatee metabolism and its influence on distribution in Florida. Biological Conservation, v. 25, n. 4, p. 315-334, 1983.

BONDE, R.; AGUIRRE, A.; POWELL, J. A. Manatee as sentinels of marine ecosystem health: are they the 2000-pound canaries? EcoHealth, v. 1, p. 255-262, 2004.

BORGES, J. C. G.; VERGARA-PARENTE, J. V.; ALVITE, C. M. C.; MARCONDES, M. C. C.; LIMA, R. P. Embarcações motorizadas: Uma ameaça aos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) no Brasil. Biota Neotropica v. 7, n. 3, p. 199-204, 2007.

BOSSART, G. D. Manatees. In: PRESS, C. (Ed.). Handbook of marine mammal medicine. Florida, 2001. p. 939-960.

BOUQUEGNEAU, J. M. JOIRIS, C. Ecotoxicology of stable pollutants in cetaceans: organochlorines and heavy metals. . In: Whales Biology – Threats – Conservation. Symposium Proceedings, Brussels. 1992. p.247–250.

BRASIL. Portaria Nº 1.522, de 19 de dezembro de 1989. Lei Nº 7.735 de 22 de fevereiro de 1989. Resolve reconhecer como Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. [http: www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br) Acesso em:1 dez 2010. , 1989.

BRASIL. Instrução Normativa MMA n. 3, de 27 de maio de 2003. Lista Oficial das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção., 2003.

BRITT, J. O. HOWARD, E. B. The hematopoietic system. In: SAUNDERS (Ed.). The pathobiology of marine mammal diseases. Philadelphia, 1983. p. 65-78.

BRYAN, C. E.; CHRISTOPHER, S. J.; BALMER, B. C.; WELLS, R. S. Establishing baseline levels of trace elements in blood and skin of bottlenose dolphins in Sarasota Bay, Florida: Implications for non-invasive monitoring. Science of The Total Environment, v. 388, n. 1-3, p. 325-342, 2007.

BUEKERS, J.; STEEN REDEKER, E.; SMOLDERS, E. Lead toxicity to wildlife: Derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. Science of The Total Environment, v. 407, n. 11, p. 3431-3438, 2009.

CARLSTEAD, K.; SEIDENSTICKER, J.; BALDWIN, R. Environmental enrichment for zoo bears. Zoo Biology, v. 10, p. 3–16, 1991.

CASTELLINI, M. A.; CASTELLINI, J. M.; RIVERA, P. M. Adaptations to pressure in the RBC metabolism of diving mammals. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 129, n. 4, p. 751-757, 2001.

CAZARIN, G.; AUGUSTO, L. G. D. S.; MELO, R. A. M. Efetivação da vigilância epidemiológica e da saúde para grupos expostos. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 10, n. 3, p. 380-390, 2007.

CHAPMAN, P. M.; ALLEN, H.; GODTFREDSEN, K.; GRAGGEN, M. N. Evaluation of Bioaccumulation Factors in Regulating Metals. Environ, Science & Technol. In: RIMA (Ed.). Ecotoxicologia, Perspectivas para o século XXI. São Carlos: 30, 2000. p. 448A-452A.

CHO, J. R.; KIM, Y. J.; HONG, K. J.; YOO, J. K.; LEE, J. O.; AHN, Y. J. Resistance Monitoring and Enzyme Activity in Field-collected Populations of the Spiraean Aphid, *Aphis citricola* van der Goot. Journal of Asia-Pacific Entomology, v. 2, n. 2, p. 113-119, 1999.

CLASEN, B. E. *Biomarcadores de estresse oxidativo em Carpas (cyprinus carpio) expostas aos inseticidas carbofuran e fipronil em condições de lavoura de arroz*. Santa Maria, p. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica - UFSM. 2009

CLUBB, R. MASON, G. Captivity effects on wide-ranging carnivores. Nature, v. 425, p. 473-474, 2003.

CONVERSE, L. J.; FERNANDES, B. S.; MACWILLIAMS, P. S.; BOSSART, G. D. Hematology, serum chemistry and morphometric reference values for Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*). . Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 25, n. 3, p. 423-431, 1994.

COSTILL, D. L.FINK, W. J. Plasma volume changes following exercise and thermal dehydration. Journal of Applied Physiology, v. 37, n. 4, p. 521-525, 1974.

DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. Nat Rev Neurosci, v. 4, n. 2, p. 131-138, 2003.

DAS, K.; DEBACKER, V.; PILLET, S.; BOUQUEGNEAU, J. M. Heavy metals in marine mammals. Toxicology of Marine Mammals, p. 135 - 167, 2003.

DAS, K.; GROOF, A. D.; JAUNIAUX, T.; BOUQUEGNEAU, J. M. Zn, Cu, Cd and Hg binding to metallothioneins in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from the southern North Sea. BMC Ecology v. 6, n. 2, 2006.

DE GUISE, S.; BECKMEN, K. B.; HOLLADAY, S. D. Contaminants and marine mammal immunotoxicology and pathology. In: FRANCIS, T. E. (Ed.). Toxicology of Marine Mammals. London, 2003.

DENTON, G. R. W.; MARSH, H.; HEINSOHN, G. E.; BURDON-JONES, C. The unusual metal status of the Dugong *Dugong dugong*. . Marine Biology v. 57, p. 201-219, 1980.

DEPLEDGE, M. H. Genotypic toxicity implications for individuals and populations. Environmental Health Perspectiver, v. 102, p. 101-104, 1994.

DIETZ, R.; J., N.; HANSEN, J. C. Have arctic mammals adapted to high cadmium levels? . Mar. Pollut. Bull, v. 36, n. 6, p. 490–492, 1998.

DOMNING, D. P. Comercial exploitation of manatees *Trichechus* in Brazil c. 1785-1973. . Biological Conservation, v. 22, p. 101-126, 1982.

DORNELES, P. R.; LAILSON-BRITO, J.; FERNANDEZ, M. A. S.; VIDAL, L. G.; BARBOSA, L. A.; AZEVEDO, A. F.; FRAGOSO, A. B. L.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Evaluation of cetacean exposure to organotin compounds in Brazilian waters through hepatic total tin concentrations. Environmental Pollution, v. 156, n. 3, p. 1268-1276, 2008.

EISENBERG, J. F. The Mammalian radiations: An Analysis of Trends in Evolution, Adaptation and Behavior. The University of Chicago Press, p. 70, 1981.

EISLER, R. Chemical risk assessment handbook of Health Hazards to Humans, Plants, and Animals. Boca Raton, 2000. (Metals).

ENDO, T.; KIMURA, O.; HISAMICHI, Y.; MINOSHIMA, Y.; HARAGUCHI, K. Age-dependent accumulation of heavy metals in a pod of killer whales (*Orcinus orca*) stranded in the northern area of Japan. Chemosphere, v. 67, n. 1, p. 51-59, 2007.

FENET, H.; CASELLAS, C.; BONToux, J. Laboratory and Field-Caging Studies on Hepatic Enzymatic Activities in European Eel and Rainbow Trout. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 40, n. 1-2, p. 137-143, 1998.

FISCHBACHER, M. SCHMID, H. Feeding enrichment and stereotypic behavior in spectacled bears. Zoo biology, v. 18, p. 363-371, 1999.

FOSSI, M. C.; CASINI, S.; BUCALOSSI, D.; MARSILI, L. First detection of CYP1A1 and CYP2B induction in Mediterranean cetacean skin biopsies and cultured fibroblasts by Western blot analysis. Marine Environmental Research, v. 66, n. 1, p. 3-6, 2008.

FOSSI, M. C.; CASINI, S.; MARSILI, L. Nondestructive biomarkers of exposure to endocrine disrupting chemicals in endangered species of wildlife. Chemosphere, v. 39, n. 8, p. 1273-1285, 1999.

FOSSI, M. C.; MARSILI, L.; CASINI, S.; BUCALOSSI, D. Development of new-tools to investigate toxicological hazard due to endocrine disruptor organochlorines and emerging contaminants in Mediterranean cetaceans. Marine Environmental Research, v. 62, n. Supplement 1, p. S200-S204, 2006.

FOSSI, M. C.; MARSILI, L.; JUNIN, M.; CASTELLO, H.; LORENZANI, J. A.; CASINI, S.; SAVELLI, C.; LEONZIO, C. Use of nondestructive biomarkers and residue analysis to assess the health status of endangered species of pinnipeds in the south-west Atlantic. Marine Pollution Bulletin, v. 34, n. 3, p. 157-162, 1997.

FOSSI, M. C.; MARSILI, L.; NERI, G.; CASINI, S.; BEARZI, G.; POLITI, E.; ZANARDELLI, M.; PANIGADA, S. Skin biopsy of Mediterranean cetaceans for the investigation of interspecies susceptibility to xenobiotic contaminants. Marine Environmental Research, v. 50, n. 1-5, p. 517-521, 2000.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. Behavioural Brain Research, v. 175, n. 1, p. 1-8, 2006.

FRUGOLI, J. A.; ZONGH, H. H.; NUCCIO, M. L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M. A.; THOMAS, T. L.; MCCLUNG, C. R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Physiol, v. 112, p. 327-336, 1996.

FUJISE, Y.; HONDA, K.; TATSUKAWA, R.; MISHIMA, S. Tissue distribution of heavy metals in Dall's porpoise in the northwestern Pacific. Marine Pollution Bulletin, v. 19, n. 5, p. 226-230, 1988.

GOKSØYR, A. Cytochrome P450 in marine mammals: isozyme forms, catalytic functions, and physiological regulations Developments in Marine Biology: Elsevier Science, 1995. p. 629-639.

GOMES, F. F. A.; VERGARA-PARENTE, J. E.; FERRARI, S. F. Behaviour Patterns in Captive Manatees (*Trichechus manatus manatus*) at Itamaracá Island, Brazil. Aquatic Mammals v. 34, n. 3, p. 269-276, 2008.

GÓMEZ-ANDURO, G. A.; BARILLAS-MURY, C.-V.; PEREGRINO-URIARTE, A. B.; GUPTA, L.; GOLLAS-GALVÁN, T.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. Developmental & Comparative Immunology, v. 30, n. 10, p. 893-900, 2006.

GRANDIA, P. A.; VAN DIJK, J. J.; KOENE, P. Stimulating natural behavior in captive bears. Ursus, v. 12, p. 199–202, 2001.

GREIG, D. J.; YLITALO, G. M.; HALL, A. J.; FAUQUIER, D. A.; GULLAND, F. M. D. Transplacental transfer of organochlorines in California sea lions (*Zalophus californianus*) Environmental Toxicology and Chemistry, v. 26, n. 1, p. 37-44, 2007.

GRIESEL, S.; KAKUSCHKE, A.; SIEBERT, U.; PRANGE, A. Trace element concentrations in blood of harbor seals (*Phoca vitulina*) from the Wadden Sea. Science of The Total Environment, v. 392, n. 2-3, p. 313-323, 2008.

GRINDROD, J. A. E. CLEAVER, J. A. Environmental enrichment reduces the performance of stereotypic circling behaviour in captive common seals (*Phoca vitulina*). . Animal Welfare, v. 10, p. 53-63, 2001.

GRITTINGER, T. Changes in behaviour and enclosure use by polar bears over time. Int. Zoo News v. 51, n. 1, p. 6-12, 2004.

GRUE, C. E.; GIBERT, P. L.; SEELEY, M. E. Neurophysiological and Behavioral Changes in Non-Target Wildlife Exposed to Organophosphate and Carbamate Pesticides: Thermoregulation, Food Consumption, and Reproduction. American Zoologist, v. 37, n. 4, p. 369-388, 1997.

GUEDES, R. C. C. Uso das macroalgas (*Gracillaria lemaneiformis* e *Hypnea musciformis*) como espécies bioindicadoras da poluição por metais pesados. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), v. UFPE, 2007.

GUTTERIDGE, J. M. C. QUINLAN, G. J. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. . Bioch. et Biophys. Acta, v. 1156, n. 144-150, 1993.

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. M. C. Antioxidant defenses. In: PRESS, O. U. (Ed.). Free radicals in biology and medicine. New York, 1999. p. 134–231.

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. M. C. Free Rad. Biol. Med. Oxford, 2005. (Oxford University Press).

HARINO, H.; OHJI, M.; WATTAYAKORN, G.; ADULYANUKOSOL, K.; ARAI, T.; MIYAZAKI, N. Concentrations of Organotin Compounds in Tissues and Organs of Dugongs from Thai Coastal Waters. Arch Environ Contam Toxicol v. 53, p. 495–502 2007.

HARTMAN, D. S. Ecology and behavior of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida. In: PUBLICATION, D. O. C. C. U. S. (Ed.). *The American Society of Mammalogists*: 5, 1979. p. 153.

HARVEY, J. W.; HARR, K. E.; MURPHY, D.; WALSH, M. T.; NOLAN, E. C.; BONDE, R. K.; PATE, M. G.; DEUTSCH, C. J.; EDWARDS, H. H.; CLAPP, W. L. Hematology of healthy Florida manatees (*Trichechus manatus*). Veterinary Clinical Pathology, v. 38, n. 2, p. 183-193, 2009.

HASHIM, M. A. CHU, K. H. Biosorption of cadmium by brown, green, and red seaweeds. Chemical Engineering Journal, v. 97, p. 249-255, 2004.

HONDA K.; Y., Y.; H., K.; R., T. Heavy metal accumulations and their recent changes in Southern minke whales *Balaenoptera acutorostrata*. Environ. Contam. Toxicol, v. 16, p. 209-216, 1987.

HUGGET, R. J.; UNGER, M. A.; SELIGMEN, P. F.; VALKIRS, A. O. The marine biocide tributyltin. Environmental Science & Technology, v. 26, p. 233-410, 1992.

HUSAR, S. L. *Trichechus inunguis*. Mammalia Species, n. 72, p. 1-4, 1977.

HUSAR, S. L. *Trichechus manatus*. Mammalia Species, n. 93, p. 1-5, 1978.

IBAMA. Mamíferos aquáticos do Brasil: Plano de ação. Brasília, DF, p. 61, 1997.

IBAMA. Mamíferos aquáticos do Brasil: Plano de ação. Brasília, DF, v. 2, p. 61, 2001.

IBAMA. Protocolo de conduta para encalhes de mamíferos Aquáticos/REMANE. Recife, 2005.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>> Acesso em 03 de dezembro de 2010., 2010.

KAKUSCHE, A.; VALENTINE-THON, E.; GRIESEL, S.; FONFARA, S.; SIEBERT, U.; PRANGE, A. Immunological impact of metals in harbor seals (*Phoca vitulina*) of the North Sea. . Environ. Sci. Technol, v. 39, p. 7568-7575, 2005.

KAKUSCHKE, A.; VALENTINE-THON, E.; GRIESEL, S.; GANDRASS, J.; LUZARDO, O. P.; BOADA, L. D.; PEÑA, M. Z.; GONZÁLEZ, M. A.; GREBE, M.; PRÖFROCK, D.; ERBSLOEH, H.-B.; KRAMER, K.; FONFARA, S.; PRANGE, A. First health and pollution study on harbor seals (*Phoca vitulina*) living in the German Elbe estuary. Marine Pollution Bulletin, v. 60, n. 11, p. 2079-2086, 2010.

KAKUSCHKE, A.; VALENTINE-THON, E.; GRIESEL, S.; ROSENBERGER, T.; MUNDRY, R.; SIEBERT, U.; PRANGE, A. Blood metal levels and metal-influenced immune functions of harbour seals in captivity. Marine Pollution Bulletin, v. 56, n. 4, p. 764-769, 2008.

KANNAN, K.; AGUSA, T.; PERROTTA, E.; THOMAS, N. J.; TANABE, S. Comparison of trace element concentrations in livers of diseased, emaciated and non-diseased southern sea otters from the California coast. Chemosphere, v. 65, n. 11, p. 2160-2167, 2006.

KANNAN, K.TANABE, S. Contamination by Organotin Compounds. In: SPRINGER (Ed.). Ecotoxicology of Antifouling Biocides. Japan, 2009.

KASTELEIN, R. A.; JENNINGS, N.; POSTMA, J. Feeding Enrichment Methods for Pacific Walrus Calves. Zoo Biology v. 26, p. 175-186, 2007.

KASTELEIN, R. A.WIEPKEMA, P. R. The significance of training for the behaviour of Stellar Sea Lions (*Eumetopias jubatus*) in human care. Aquatic Mammals v. 14, p. 39-41, 1988.

KASTELEIN, R. A.WIEPKEMA, P. R. A digging trough as occupational therapy for Pacific Walruses (*Odobenus rosmarus divergens*) in human care. Aquatic Mammals v. 15, p. 9-17, 1989.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JACOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-Transferases. J. Biol. Chem, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KEIPER, R. R. Causal factors of stereotypies in caged birds. . Animal behaviour, v. 14, n. 1, p. 114-119, 1969.

KEMPER, C.; GIBBS, P.; OBENDORF, D.; MARVANEK, S.; LENGHAUS, C. A review of heavy metal and organochlorine levels in marine mammals in Australia. Science of The Total Environment, v. 154, n. 2-3, p. 129-139, 1994.

KIEHL, A. R.SCHILLER, C. A. A study of manatee leucocytes using Peroxidase stain. Veterinary Clinical Pathology, v. 23, n. 2, p. 50-53, 1994.

KING, J. M.HEINEN, J. T. An assessment of the behaviors of overwintering manatees as influenced by interactions with tourists at two sites in central Florida. Biological Conservation, v. 117, n. 3, p. 227-234, 2004.

LAILSON-BRITO, J. J.; AZEVEDO, M. A. A.; SALDANHA, M. F. C.; FERNANDEZ, M. A.; HERMS, F. Estudo Ecotoxicológico das concentrações de cádmio em tecidos de golfinhos (Cetacea, Delphinidae) de hábitos costeiros e oceânicos, de águas do Estado do Rio de Janeiro. In: CARLOS, E. S. (Ed.). Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI., 2000.

LEFEBVRE, L.; MARMONTEL, M.; REID, J.; RATHBUN, G.; DOMNING, D. Status and Biogeography of the West Indian Manatee Biogeography of the West Indies: CRC Press, 2001. p. 425-474.

LETICIA, A.-G.GERARDO, G.-B. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 71, n. 3, p. 787-797, 2008.

LI, B.; STRIBLEY, J. A.; TICU, A.; XIE, W.; SCHOPFER, L. M.; HAMMOND, P.; BRIMIJOIN, S.; HINRICHS, S. H.; LOCKRIDGE, O. Abundant Tissue

Butyrylcholinesterase and Its Possible Function in the Acetylcholinesterase Knockout Mouse. Journal of Neurochemistry, v. 75, n. 3, p. 1320-1331, 2000.

LI, W.-M.; YIN, D.-Q.; ZHOU, Y.; HU, S.-Q.; WANG, L.-S. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 56, n. 2, p. 251-255, 2003.

LIMA, R. P. Levantamento da distribuição, ocorrência e status de conservação do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758) no litoral nordeste do Brasil. Peixe-Boi: Coletânea de Trabalhos de Conservação e Pesquisa de Sirênios no Brasil. . MMA/IBAMA, v. 1, n. 1, p. 47-72, 1992.

LIMA, R. P. Peixe-Boi Marinho (*Trichechus manatus*): Distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais ao longo do litoral nordeste do Brasil. . Dissertação de mestrado (Mestrado em Oceanografia Biológica) v. Universidade Federal de Pernambuco, n. Recife, 1997.

LIMA, R. P.; ALVITE, C. M. C.; VERGARA-PARENTE, J. E. Protocolo de Reintrodução de Peixes-Bois no Brasil. São Luís: Ibama-MA, 2007.

LINHARES, K. V. Processos associativos e estratégias de conservação em peixe-boi marinho, *Trichechus manatus manatus* (MAMMALIA: SIRENIA). Monografia (Bacharelado em ciências Biológicas)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, v. Pernambuco, p. 56, 2001.

LUNA, F. O. Distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais do Peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral norte do Brasil. . Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) v. Universidade Federal de Pernambuco, n. Recife, 2001.

MALLICK, N. MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. J. Plant Physiol., v. 157, p. 183-193, 2000.

MARKOWITZ, H. Behavioral Enrichment in the Zoo. New York: Van Nostrand Reinhold, 1982.

MARRINER, L. M. DRICKAMER, L. C. Factors influencing stereotyped behavior of primates in a zoo. . Zoo biology, v. 13, p. 267– 275, 1994.

MARSH, H. LEFEBVRE, L. W. Sirenian status and conservation efforts. Aquatic Mammals, v. 20, p. 155-170, 1994.

MARSH, H. O. S., T. J.; BEST, R. C. Research on Sirenians. AMBIO. A Journal of the Human Environment, v. 15, n. 3, p. 177-180, 1986.

MARSHALL, C. D.; HUTH, G. D.; EDMONDS, V. M.; HALIN, D. L.; REEP, R. L. Prehensile use of perioral bristles during feeding and associated behaviors of the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*). Marine Mammal Science, v. 14, n. 2, p. 274–289, 1998.

MARSHALL, C. D.; MAEDA, H.; IWATA, M.; FURUTA, M.; ASANO, S.; ROSAS, F.; REEP, R. L. Orofacial morphology and feeding behaviour of the dugong, Amazonian, West African and Antillean manatees (Mammalia: Sirenia): functional morphology of the muscular-vibrissal complex. Journal of Zoology, v. 259, n. 03, p. 245-260, 2003.

MASON, G. J. Stereotypies: a critical review. Animal Behaviour, v. 41, p. 1015–1037, 1991.

MASON, G. J. Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. Trends in Ecology and Evolution v. 1, n. 9, 2010.

MASON, G. J. LATHAM, N. R. Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator? . Animal Welfare, v. 13, p. 57-69, 2004.

MAYES, R. A.; MCINTOSH, A. W.; ANDERSON, V. L. Uptake of cadmium and lead by a rooted aquatic macrophyte (*Elodea canadensis*). Ecology, v. 58, p. 1176-1180, 1977.

MEDINA, V. E. H. Comportamento do peixe-boi (*Trichechus manatus manatus*) nos oceanários de Itamaracá: manejo e condições abióticas Dissertação de mestrado, 2008.

MEIRELLES, A. C. O. Mortality of the Antillean manatee, *Trichechus manatus manatus*, in Ceará State, North-eastern Brazil. . Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 88, n. 6, p. 1133–1137, 2008.

MESULAM, M. M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E. G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. Neuroscience, v. 110, n. 4, p. 627-639, 2002.

MMA. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. . Brasília, DF, 2008. (Ministério do Meio Ambiente - MMA).

MOELLER, J. REEH, U. Degradation of Nonylphenol Ethoxylates (NPE) in Sewage Sludge and Source Separated Municipal Solid Waste Under Bench-Scale Composting Conditions Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 70, n. 2, p. 0248-0254, 2003.

MORAES, B. S.; LORO, V. L.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; DE OLIVEIRA MACHADO, S. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). Chemosphere, v. 68, n. 8, p. 1597-1601, 2007.

MORGAN, K. N. TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. Applied Animal Behaviour Science, v. 102, n. 3-4, p. 262-302, 2007.

MUNRO JENSSSEN, B.; SKAARE, J. U.; WOLDSTAD, S.; NASTAD, A. T.; HAUGEN, O.; KLØVEN, B.; SØRMO, E. G.; ARNOLDUS SCHYTTÉ BLIX, L. W.; ØYVIND, U. Biomarkers in blood to assess effects of polychlorinated biphenyls in free-living grey seal pups Developments in Marine Biology: Elsevier Science, 1995. p. 607-615.

MUSE, J. O.; STRIPEIKIS, J. D.; FERNANDEZ, F. M.; D'HUIEQUE, L.; TUDINO, M. B.; CARDUCCI, C. N.; TROCECILI, O. E. Seaweeds in the assesment of heavy metal pollution in the Gulf San Jorge, Argentina. Environmental Pollution, v. 104, p. 315-322, 1999.

NOWACEK, S. M.; WELLS, R. S.; OWEN, E. C. G.; SPEAKMAN, T. R.; FLAMM, R. O.; NOWACEK, D. P. Florida manatees, *Trichechus manatus latirostris*, respond to approaching vessels. Biological Conservation, v. 119, n. 4, p. 517-523, 2004.

NYMAN, M.; BERGKNUT, M.; FANT, M. L.; RAUNIO, H.; JESTOI, M.; BENGIS, C.; MURK, A.; KOISTINEN, J.; BÄCKMAN, C.; PELKONEN, O.; TYSKLIND, M.; HIRVI, T.; HELLE, E. Contaminant exposure and effects in Baltic ringed and grey seals as assessed by biomarkers. Marine Environmental Research, v. 55, n. 1, p. 73-99, 2003.

O'SHEA, T. J. KOCHMAN, H. I. Florida manatees: Distribution, geographically referenced data sets, and ecological and behavioral aspects of habitat use. . Florida marine research publications, 1990.

O'HARA, T. M. O'SHEA, T. J. Toxicology. In: PRESS, C. (Ed.). CRC Handbook of Marine Mammal Medicine Boca Raton, 2001. p. 471-520.

O'SHEA, T. J. Toxicology of sirenians. In: FRANCIS, T. (Ed.). Toxicology of Marine Mammals. New York, 2003.

O'SHEA, T. J.; MOORE, J. F.; KOCHMAN, H. I. Contaminant concentrations in manatees in Florida. J. Wildl. Manage, v. 1, n. 3, p. 741-748, 1984.

O'SHEA, T. J.; REEVES, R. R.; LONG, A. K. Marine mammals and persistent ocean contaminants. . *Marine Mammal Commission*. Washington 1999. p. 150.

O'SHEA, T. J. TANABE, S. Persistent ocean contaminants and marine mammals: A retrospective overview. In: FRANCIS, T. (Ed.). Toxicology of Marine Mammals. New York, 2003.

OLIVEIRA, E. M. A. Mortalidade do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) na costa Nordeste do Brasil. . *DE TRABAJO DE ESPECIALISTAS EN MAMÍFEROS ACUATICOS DA AMÉRICA DEL SUR*. v. 4191-196. Valdivia 1994.

PALUDO, D. LANGGUTH, A. Use of space and temporal distribution of *Trichechus manatus* Linnaeus in the region of Sagi, Rio Grande do Norte State, Brazil (Sirenia, Trichechidae) Revta bras. Zoo, v. 19, n. 1, p. 205 - 215, 2002.

PARENTE, C. L.; VERGARA-PARENTE, J. E.; LIMA, R. P. Strandings of Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in northeastern Brazil. The Latin American Journal of Aquatic Mammals, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2004.

PASCALICCHIO, A., A. E. . Contaminação por metais pesados: saúde pública e medicina ortomolecular. São Paulo: Annablume, 2002.

PLESE, L. P. M. Kinetics of carbosulfan hydrolysis to carbofuran and the subsequent degradation of this last compound in irrigated rice fields. . Chemosphere, v. 60, p. 149-156, 2005.

POLKOWSKA, Z.; KOZŁOWSKA, K.; NAMIEŚNIK, J.; PRZYJAZNY, A. Biological fluids as a source of information on the exposure of man to environmental chemical agents. Crit. Rev. Anal. Chem., v. 34, n. 2, p. 105–119, 2004.

RABIN, L. A. Maintaining behavioural diversity in captivity for conservation: natural behaviour management. Animal Welfare, v. 12, p. 85-94, 2003.

RAJASEKARAN, K. Effects of combined exposure to aluminium and ethanol on food intake, motor behaviour and a few biochemical parameters in pubertal rats. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 9, n. 1-2, p. 25-30, 2000.

REEVES, R. R.; STEWART, B. S.; CLAPHAM, P. J.; POWELL, J. A. Sirenians. In: KNOPF, A. A. (Ed.). Guide to Marine Mammals of the World. New York, 2002. p. 474-492.

REIDARSON, T. H.; DUFFIELD, D. A.; MCBAIN, J. Normal hematology of marine mammals. In: WILKINS, L. W. (Ed.). Veterinary hematology. Philadelphia: 5, 2000. p. 1164-1173.

REYNOLDS, J. E. ODELL, D. K. Manatees and Dugongs. Facts on file, v. New York, p. 192, 1991.

REYNOLDS, J. E. P., J. . Manatees. In: PRESS, A. (Ed.). PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, H. G. M. Encyclopedia of marine mammals. Florida, 2002. p. 709-721.

ROBERTA, M.; ROBERTA DI, B.; ROSARIA, V.; CARMELA, F.; CLAUDIO, G. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. The Journal of nutritional biochemistry, v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.

ROSA, C.; BLAKE, J. E.; MAZZARO, L.; HOEKSTRA, P.; YLITALO, G. M.; O'HARA, T. M. Vitamin A and E tissue distribution with comparisons to organochlorine concentrations in the serum, blubber and liver of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 148, n. 4, p. 454-462, 2007.

ROSS, P. S.; COUILLARD, C. M.; IKONOMOU, M. G.; JOHANNESSEN, S. C.; LEBEUF, M.; MACDONALD, R. W.; TOMY, G. T. Large and growing environmental reservoirs of Deca-BDE present an emerging health risk for fish and marine mammals. Marine Pollution Bulletin, v. 58, n. 1, p. 7-10, 2009.

ROSS, P. S.; DE SWART, R. L.; VAN LOVEREN, H.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; VOS, J. G. The immunotoxicity of environmental contaminants to marine wildlife: A review. Annual Review of Fish Diseases, v. 6, p. 151-165, 1996.

ROSS, S. R. Issues of choice and control in the behaviour of a pair of captive polar bears (*Ursus maritimus*). Behavioural Processes, v. 73, n. 1, p. 117-120, 2006.

ROTHER, R. P.; BELL, L.; HILLMEN, P.; GLADWIN, M. T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. JAMA, v. 293, p. 1653-1662, 2005.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J. C.; CARBONELL, R.; HENRÍQUEZ PÉREZ, A.; MONTEALEGRE, M.; GÓMEZ, L. Inhibition of plasma butyrylcholinesterase activity in the lizard *Gallotia galloti palmae* by pesticides: a field study. Environmental Pollution, v. 132, n. 3, p. 479-488, 2004.

SAVORY, J.; HERMAN, M. M.; GHRIBI, O. Mechanisms of aluminum-induced neurodegeneration in animals: Implications for Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's Disease, v. 10, n. 2, p. 135-144, 2006.

SCHREER, J. F. KOVACS, K. M. Allometry of diving capacity in air-breathing vertebrates. Can. J. Zool., v. 35, p. 339-358, 1997.

SHEPHERDSON, D. J.; MELLEN, J. D.; HUTCHINS, M. Second Nature: Environmental Enrichment for Captive Animals. Washington: Smithsonian Institution Press, 1998.

SOUZA, J. R. B. CARVALHO, P. S. M. Bioindicadores e Biomarcadores no sistema bêntico. In: UFPE (Ed.). Monitoramento Ambiental Marinho. Recife: Leitão, S.N. , 2009.

SOUZA LIMA, R. S. F., G. A. B. . A bioacústica como ferramenta na análise comportamental e no manejo de sirênios no Brasil. *Reunião de trabalho de especialistas em mamíferos aquáticos da américa do sul*. Olinda: 8, 1998. p. 212.

STAVROS, H.-C. W.; BONDE, R. K.; FAIR, P. A. Concentrations of trace elements in blood and skin of Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). Marine Pollution Bulletin, v. 56, n. 6, p. 1221-1225, 2008.

STAVROS, H.-C. W.; BOSSART, G. D.; HULSEY, T. C.; FAIR, P. A. Trace element concentrations in blood of free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): Influence of age, sex and location. Marine Pollution Bulletin, v. 56, n. 2, p. 371-379, 2008.

STEFANELLO, F. M.; ZUGNO, A. I.; WANNMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. S. Homocysteine Inhibits Butyrylcholinesterase Activity in Rat Serum. Metabolic Brain Disease, v. 18, n. 3, p. 187-194, 2003.

SUDEMA. Inventário de resíduos sólidos industriais do Estado da Paraíba - Brasil. João Pessoa - PB, 2004. (Superintendência de Administração do Meio Ambiente).

SWAISGOOD, R. R. SHEPHERDSON, D. J. Scientific approaches to enrichment and stereotypies in zoo animals: What's been done and where should we go next? . Zoo biology, v. 24, p. 499-518, 2005.

TANABE, S. Contamination and toxic effects of persistent endocrine disrupters in marine mammals and birds. Marine Pollution Bulletin, v. 45, n. 1-12, p. 69-77, 2002.

TERAMITSU, I.; YAMAMOTO, Y.; CHIBA, I.; IWATA, H.; TANABE, S.; FUJISE, Y.; KAZUSAKA, A.; AKAHORI, F.; FUJITA, S. Identification of novel cytochrome P450 1A genes from five marine mammal species. Aquatic Toxicology, v. 51, n. 2, p. 145-153, 2000.

THOMPSON, D. R. Metal levels in marine vertebrates. . In: RATON, B. (Ed.). Heavy metals in the marine environment, 1990. p. 143–182.

TROISI, G. M. MASON, C. F. Cytochromes P450, P420 & mixed-function oxidases as biomarkers of polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in harbour seals (*Phoca vitulina*). Chemosphere, v. 35, n. 9, p. 1933-1946, 1997.

ÜNER, N.; ORUÇ, E.; SEVGILER, Y. Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 20, n. 1, p. 99-106, 2005.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VERGARA-PARENTE, J. E.; SIDRIM, J. J. C.; TEIXEIRA, M. F. D. S.; MARCONDES, M. C. C.; ROCHA, M. F. G. Salmonellosis in an Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) calf: a fatal case. Aquatic Mammals, v. 29, p. 131-136, 2003.

VIANNA, J. A.; BONDE, R. K.; CABALLERO, S.; GIRALDO, J. P.; LIMA, R. P.; CLARK, A.; MARMONTEL, M.; MORALES-VELA, B.; DE SOUZA, M. J.; PARR, L.; RODRÍGUEZ-LOPEZ, M. A.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; POWELL, J. A.; SANTOS, F. R. Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation. Molecular Ecology, v. 15, n. 2, p. 433-447, 2006.

VIRGO, B. B. Pesticides and the neonate. In: PUBLISHERS, E. S. (Ed.). Toxicology and the Newborn. Amsterdam, 1984. p. 252–267.

VOS, J. G.; ROSS, P. S.; SWART, R. L.; LOVEREN, H. V.; OSTERHAUS, A. D. M. E. The effects of chemical contaminants on immunefunctions in harbour seals: Results of a semi-field study In: FRANCIS, E. T. (Ed.). Toxicology of Marine Mammals. New York, 2003.

WAGEMANN, R.; STEWART, R. E. A.; LOCKHART, W. L.; STEWART, B. E. Trace metals and methyl mercury: associations and transfer in har seal (*Phoca groelandica*) mothers and their pups. Marine Mammal Science, v. 4, n. 4, p. 339-355, 1998.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. Principles of ecotoxicology. Bristol, 1996.

WALKER, G. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. Principles of Ecotoxicology. London: Taylor and Francis, 2005.

WANG, Z.; ZHANG, K.; ZHAO, J.; LIU, X.; XING, B. Adsorption and inhibition of butyrylcholinesterase by different engineered nanoparticles. Chemosphere, v. 79, p. 86-92, 2010.

WECHSLER, B. Stereotypies and attentiveness to novel stimuli: a test in polar bears. Applied Animal Behaviour Science, v. 33, n. 4, p. 381-388, 1991.

WEERD, H. A. V. D.; VAN LOO, P. L. P.; VAN ZUTPHEN, L. F. M.; KOOLHAAS, J. M.; BAUMANS, V. Nesting Material as Environmental Enrichment Has No Adverse Effects on Behavior and Physiology of Laboratory Mice. Physiology & Behavior, v. 62, n. 5, p. 1019-1028, 1997.

WEMELSFELDER, F. Life in captivity: its lack of opportunities for variable behaviour. Applied Animal Behaviour Science, v. 54, n. 1, p. 67-70, 1997.

WHITE, J. R.; HARKNESS, D. R.; ISAACKS, R. E.; DUFFIELD, D. A. Some studies on blood of the Florida manatee *Trichechus manatus latirostris*. Comparative Biochemistry and Physiology - A, v. 55, p. 413-417, 1976.

WHITEHEAD, P. J. P. Registros antigos da presença do peixe-boi do Caribe (*Trichechus manatus*) no Brasil. Acta Amazônica, v. 8, n. 3, p. 497-506, 1978.

WILHELM FILHO, D.; SELL, F.; RIBEIRO, L.; GHISLANDI, M.; CARRASQUEDO, F.; FRAGA, C. G.; WALLAUER, J. P.; SIMÕES-LOPES, P. C.; UHART, M. M. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 133, n. 3, p. 885-892, 2002.

WILSON, B. W. HENDERSON, J. D. Determination of Cholinesterase in Blood and Tissue. Current Protocols in Toxicology, v. 37, n. 12, p. 1-12, 2007.

WILSON, J. Y.; WELLS, R.; AGUILAR, A.; BORRELL, A.; TORNERO, V.; REIJNDERS, P.; MOORE, M.; STEGEMAN, J. J. Correlates of Cytochrome P450 1A1 Expression in Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Integument Biopsies. Toxicological Sciences, v. 97, n. 1, p. 111-119, 2007.

WOREK, F.; MAST, U.; KIDERLEN, D.; DIEPOLD, C.; EYER, P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. Clinica Chimica Acta, v. 288, n. 1-2, p. 73-90, 1999.

XIE, C. X.; MATTSON, M. P.; LOVELL, M. A.; YOKEL, R. A. Intraneuronal aluminum potentiates iron-induced oxidative stress in cultured rat hippocampal neurons. Brain Research, v. 743, n. 1-2, p. 271-277, 1996.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Hematologia fundamentos e prática. São Paulo, 2005.

8. Anexo

Anexo 1

Fonte: Medina (2008); Linhares (2001)

Comportamento	Descrição
AL: Alimentar	Os animais pegam o alimento com os lábios, algumas vezes com a ajuda das nadadeiras e ingerem o alimento. Permanecem na posição vertical ou horizontal com alguma parte do corpo boiando, geralmente a cabeça.
AB: Abraçar	O animal, macho ou fêmea, utiliza uma ou ambas as nadadeiras peitorais para segurar o outro indivíduo pelo dorso ou região lateral de seu corpo.
Agarr.Oce: Agarrar Oceanário	O animal utiliza as nadadeiras peitorais (ambas ou uma só) para segurar as bordas do oceanário ou estrutura limitante do recinto, onde permanece agarrado por determinado tempo.
BA: Beber água	Os animais ingerem água doce proveniente de fonte artificial.
BJ: Beijar	O animal, macho ou fêmea, aproxima-se do outro, permanecendo com os lábios encostados por alguns minutos.
BC: Bater Cabeça	O animal bate cabeça na linha d'água ou contra outro animal.
BF: Bater Focinho	O animal bate o focinho inúmeras vezes em qualquer estrutura fixa do recinto. Ele permanece com o corpo imóvel movimentando apenas o focinho contra o objeto.
BN:Bater Nadadeira	O animal bate a nadadeira peitoral em outro animal ou na linha d'água.
Bolhas	O animal forma bolhas em baixo d'água, com liberação do ar pelas narinas.
CABP: Bater Cabeça em estrutura limitante	O animal bate a cabeça com força na parede de maneira constante, que pode ser variável e durar alguns minutos.
CAMB: Cambalhota	O animal gira em torno do próprio eixo corporal virando uma cambalhota.
CAU: Bater Cauda	O animal repele o outro com movimentos da nadadeira caudal, em diferentes angulações, podendo ou não atingir o corpo do outro animal.
COÇ: Coçar	O animal esfrega alguma parte do corpo: cabeça, focinho, ventre, olho, ou costas com uma ou ambas nadadeiras.

COPRO: Coprofagia	O animal ingere as fezes de outro animal ou aquelas que encontra boiando na superfície da água.
D: Deslocamento	O animal desloca-se pelo recinto com movimentos exploratórios.
DL: Deslocamento Lento	O animal desloca-se pelo recinto de maneira lenta.
EMP: Empurrar	O animal empurra com seu corpo ou com uma ou ambas nadadeiras peitorais o seu oponente, impedindo que o mesmo se aproxime do alimento, da torneira de água ou de outro animal.
I.O: Interagir com objeto	Animais interagem com objetos presentes no recinto.
L.C: Limpar Corpo	Os animais usam as nadadeiras peitorais e o focinho, para remover sobras de pele ou algas do corpo de outro animal; em algumas ocasiões, eles ingerem esses pedaços de pele ou algas.
MM: Mamando	Animal se alimenta de leite ofertado na mamadeira pelos tratadores.
Manejo	Animal está sendo manejado pela equipe técnica.
MERG: Mergulhar	Animal afunda na água do recinto por longo tempo.
MONT: Montar	O macho coloca-se sobre o dorso da fêmea e, nesse momento, geralmente apresenta o pênis.
MORD NAD: Morder nadadeira	Animal coloca nadadeira peitoral na boca e segura por certo tempo.
NAD O: Nadar em círculo	O animal desloca-se no recinto, ao redor de um eixo, em movimento circular contínuo, durante tempo variável.
OBS: Observação	O animal observa os tratadores ou qualquer outra pessoa próximo ao recinto.
PARAF: Parafuso	O animal desloca-se para frente, apresentando movimentos de giro em torno do próprio eixo corporal.
R: Repouso	O animal permanece imóvel e com os olhos fechados apresentando apenas movimentos de deslocamento do corpo em direção à superfície, para respirar em intervalos variáveis.
RJ: Repouso Juntos	Vários animais permanecem imóveis, em posição horizontal, com os olhos fechados, a cabeça ereta ou inclinada para baixo, durante tempo variável.
SENT: Sentar	O animal encosta a cauda curvada no fundo do recinto e permanece com parte do corpo para fora da linha da água. O corpo

	permanece vertical.
SUG: Sugar	O animal suga as bordas do recinto.
TENT MM: Tentando Mamar	O animal tenta mamar enquanto tratador oferta mamadeira a outro animal.
TF: Tocar Focinho	Os animais, de ambos os sexos, tocam com o seu focinho na região dorsal, na cabeça ou no focinho do outro animal.
TN: Tocar Nadadeira	Os animais, de ambos os sexos, tocam com uma de suas nadadeiras na região dorsal, na cabeça ou no focinho de outro animal.
VV: Vai e Vem	O animal realiza o movimento de vai-vem, balançando o corpo de maneira constante para frente e para trás, durante tempo indeterminado.
I.T: Interagir com tratador	Animal interage com tratador que se encontra na área do recinto.