

**CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DOUTORADO EM GEOCIÊNCIAS – GEOQUÍMICA AMBIENTAL**

ANA PAULA DE CASTRO RODRIGUES

**BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO DE MERCÚRIO EM
PEIXES: SISTEMA COSTEIRO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E BIOENSAIOS**

NITERÓI

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA PAULA DE CASTRO RODRIGUES

**BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO DE MERCÚRIO EM
PEIXES: SISTEMA COSTEIRO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E BIOENSAIOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Geociências da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do **Grau de Doutor**. Área de concentração: Geoquímica Ambiental.

NITERÓI

2010

R696 Rodrigues, Ana Paula de Castro

Biomarcadores para avaliação de risco ecológico de mercúrio em peixes: sistema costeiro do estado do rio de janeiro e bioensaios / Ana Paula de Castro Rodrigues. - Niterói: [s.n.], 2010.

Tese (Doutorado em Geoquímica Ambiental), Universidade Federal Fluminense.

213f.: il; 30 cm

1. Avaliação de risco. 2. Gestão Ambiental. 3. Contaminação por mercúrio. 4. Biomarcadores. 5. Peixe. 6. Baía de Guanabara (RJ). 7. Baía da Ribeira (RJ). 8. Teses. 9. Produção Intelectual. I. Título.

CDD: 333.956098153

ANA PAULA DE CASTRO RODRIGUES

BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO DE MERCÚRIO EM PEIXES: SISTEMA COSTEIRO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E BIOENSAIOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Geociências da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor. Área de

Aprovada em 25 de Março de 2010.

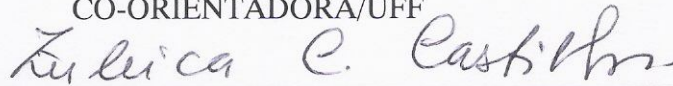
BANCA EXAMINADORA



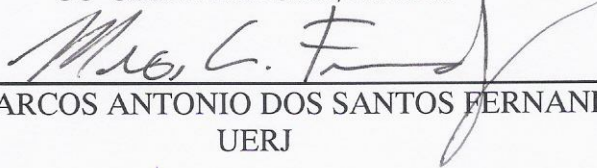
PROF. DR. EDISON DAUSACKER BIDONE
ORIENTADOR/UFF



PROF^a. DR^a. NADIA REGINA PEREIRA ALMOSNY
CO-ORIENTADORA/UFF



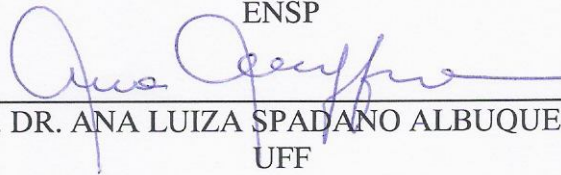
PROF^a. DR^a ZULEICA CARMEN CASTILHOS
CO-ORIENTADORA/CETEM



PROF. DR. MARCOS ANTONIO DOS SANTOS FERNANDEZ
UERJ



PROF^a. DR^a. SANDRA DE SOUZA HACON
ENSP



PROF. DR. ANA LUIZA SPADANO ALBUQUERQUE
UFF



PROF. DR. WILSON THADEU VALLE MACHADO
UFF

NITERÓI
2010

Aos meus pais, Horácio A. Rodrigues (*In Memoriam*) e Maria Celeste de C. Rodrigues, meu noivo, Rodrigo G. Carvalheira e amigos, pela compreensão, força e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edison Dausacker Bidone, meu orientador e amigo, com quem sempre pude contar nas mais diversas situações nos últimos seis anos e com quem aprendi a ser um pouco mais prática, especialmente em relação a novas ideias, por mais que esse aprendizado tenha sido bem sofrido e ainda o é... Obrigada por toda atenção e confiança!

À Dr^a. Zuleica Carmem Castilhos, minha mãe científica, co-orientadora e amiga, que desde a iniciação científica vem acompanhando meu amadurecimento como pessoa e como profissional, mesmo que às vezes eu ainda pareça a mesma menina que entrou em 2002 pela porta de uma sala pequenina no Cetem para uma entrevista. Obrigada por todo carinho, atenção, aprendizado durante esses anos de trabalho juntas.

À Dr^a. Nádia Regina Pereira Almosny, minha co-orientadora e amiga, que não mediu esforços para conseguir os velhos e novos cantinhos para a realização de todos os ensaios laboratoriais com peixes, que sempre abriu as portas da veterinária a qualquer dia e a qualquer hora para que essa tese pudesse ser realizada. Obrigada!

À Dr^a. Ana Rosa Linde Arias, minha co-orientadora, que abriu as portas de seu laboratório na Fiocruz para que boa parte deste trabalho fosse realizada, em especial a contaminação da ração a ser utilizada nos ensaios, sem a qual eles não teriam sido realizados. Obrigada, Ana!

Ao Prof. Dr. Emmanoel Silva-Filho e à Prof^a. Dr^a. Ana Luíza Albuquerque por toda paciência nas leituras de meus trabalhos e por toda ajuda e sugestões dadas até hoje durante esses anos no departamento em todas as avaliações de projeto, tanto de mestrado quanto de doutorado, bem como do exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bernardes, por ter aceitado participar da pré-banca de defesa de tese, colaborando para o melhoramento deste trabalho e ao CENA-USP pela realização em conjunto de toda a parte de isótopos estáveis.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio dos S. Fernandez e à Prof^a. Dr^a. Sandra S. Hacon por terem aceitado avaliar este trabalho, mesmo com os inúmeros outros compromissos marcados, contribuindo imensamente para o melhoramento deste com a revisão criteriosa e sugestões importantes.

Ao Prof. Dr. Wilson T. Machado, por ter aceitado o convite para participação na banca avaliadora da tese, mesmo com tão pouco tempo útil para avaliar o manuscrito, colaborando também para o melhoramento deste trabalho.

A toda a equipe do CETEM: Patrícia Araújo, Eliel, Viviane, que são os responsáveis por todos os resultados de mercúrio deste trabalho, sem vocês eu não teria tese. Ao amigo MSc. Ricardo César, que por mais que não entenda muito de peixe, sempre ajudou e ainda ajuda em tudo que pode. À amiga e ex-co-orientada, Paula Fernandes, por toda ajuda nas primeiras coletas, primeiras aberturas de peixes, limpeza dos primeiros aquários e pelas músicas no celular que animavam o ambiente.

Aos meus primeiros veterinários prediletos MSc. Luiz César Pereira Cavalcanti da Silva e MSc. Patrícia Oliveira Maciel, que tomaram conta muito bem dos primeiros peixinhos do bioensaio, mesmo quando o nosso canto na veterinária precisou entrar em obras (coisas de

prédio velho) e com os quais eu aprendi muito do que sei dentro do laboratório.

A todos da Faculdade de Veterinária da UFF, o meu muitíssimo obrigado:

- Prof. Renato Clapp, por ter cedido uma parte de seu laboratório para a realização dos experimentos;
- Aos ex-alunos de iniciação científica Bruno e Vinícius, por terem me ajudado nos cuidados com os peixes no primeiro bioensaio;
- Aos veterinários Alexandre e Renatinho, que sempre se preocupavam com os peixes e me ajudaram no que podiam;
- Aos Professores Daniel, Márcia e Nairo, que sempre permitiram a minha entrada no laboratório a qualquer hora;
- Em especial, aos alunos Celso Fasura e Francie Lima, que ajudaram tanto no segundo bioensaio quanto nas campanhas de campo, ficando até tarde na veterinária fazendo hemograma comigo;
- À Tandara, técnica do laboratório, por toda ajuda na bioquímica e paciência comigo e com os meninos quando a gente chegava com 50, 100 amostras para fazer no mesmo dia e ocupávamos os equipamentos que ela precisava durante horas;
- Às faxineiras, em especial a Maria, que além de conversar com os peixes, tomava conta das plantas do laboratório;
- Ao Prof. Felipe e suas alunas, que conseguiram arrumar um cantinho no galão de nitrogênio líquido para que eu pudesse guardar as minhas amostras;
- À Prof^a Dr^a Ana Ferreira e à Prof^a Dr^a Juliana Leite, que mesmo trabalhando com mamíferos, aceitaram o desafio de trabalhar com histologia de peixes, estando sempre disponíveis a novas propostas e novos trabalhos, e em especial à Juliana, que passou horas vendo e revendo os cortes histológicos.

A todos do Laboratório de Toxicologia Ambiental da FIOCRUZ (Alan Ferreira, Marina Freire, Vanessa e Ione), pela atenção e ajuda durante as análises de colinesterase.

Ao Prof. Dr. Alcir L. Dafré do Laboratório de Defesas Celulares e ao Prof. Afonso Bainy do Laboratório de Biomarcadores, ambos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelas determinações do grupo das glutatonas no sangue das amostras de bioensaio e ao aluno Rafael Trevisan, por ter feito as análises.

Ao Prof. Dr. Mark Sandheinrich, por toda paciência e atenção dada, quando começamos a trocar correspondências sobre como fazer os bioensaios, dando todas as dicas necessárias para que os ensaios fossem realizados com sucesso.

A todos os meus amigos da geoquímica da UFF, turma essa que vem junto desde o mestrado (Eduardo, Renato, Rodrigo, Marcelo...), somada a alguns adendos (Rafael, Luis, Leonardo, Ricardo, Leandro, Fernanda...) e a galera da antiga (Elisamara, Nilva, Helenice, Simone...), agradeço por todos os churrascos no quadradinho, por todas as alegrias na sala dos alunos, por todas as angústias repartidas, pois assim ficou mais fácil dissipar-las, por todos os dias de convivência que irão deixar saudades, afinal esta foi a minha segunda família durante 6 anos! Em especial, agradeço a algumas pessoas com participação ativa neste trabalho:

- Ao Dr. Daniel Loureiro, por toda ajuda na primeira coleta na Baía de Guanabara;
- A Dra. Ilene Matanó Abreu, pela ajuda em campo e no laboratório abrindo peixes em pleno feriado;
- A MSc. Raquel Pinhão, irmã científica, que ficou até 4h da manhã fazendo hemograma comigo;
- Ao MSc e futuro doutor Wellington Bandeira e sua digníssima Poliana, que me

ajudaram em praticamente todas as coletas de campo e suas respectivas análises de hemogramas, nas leituras infinitas de leucometria específica nas semanas de recesso, e nas coletas do bioensaio;

- A MSc. Christiane Sym, por abrir as portas da sua casa para servir de abrigo nas horas em que eu não aguentasse mais trabalhar nas madrugadas da veterinária, sempre deixando um sorvete de flocos no freezer para me animar.

Aos barqueiros Jeremias e Paulinho, sem eles eu não conseguiria pescar. Ao Sr. Mesquita, que se desdobrou para achar 30 apaiaris com a mesma idade, na época em que esses animais não reproduzem bem.

A todos os meus grandes amigos de faculdade, que sempre compreenderam as minhas ausências, minhas caras emburradas e que sempre, só por estarem perto de mim, me fizeram, me fazem e ainda me farão muitíssimo feliz e uma pessoa melhor do que eu sou. Agradeço a vocês, meus amigos, Fernanda Lemos, Renato Tottino, Angela Senna, Renatinha, Diogo Abreu, Alan, Diogo Jorge, Vinícius, Rachel Carvalho, Henrique Dias, Daniel Correa, Ricardo Freitas, Tarso Carvalho, Renata Pilar. É um privilégio ter vocês em minha vida e poder ver a família crescer com a chegada de Livia, Pedro Henrique, Catarina, Beatriz, Heitor e muitos outros que ainda virão.

Aos meus queridos amigos quase virtuais de tão longe que moram. Agradeço a Ana França, pela visita ao Rio, por todas as alegrias, "Gabrielas" e amizade; ao meu grande amigo Cassiano Souza (Pequeno hobbit), que mesmo de longe, sempre torceu por mim, sempre tentou me mostrar os lados bons da vida, quando eu não conseguia; ao amigo Tiago Jalowitzki pelas boas conversas, por ter me ensinado a tomar chimarrão e por ter torcido para o Grêmio perder para o Flamengo ser campeão; e ao Wolfgang Jansen, amigo de longa data, por se preocupar comigo, por tentar me ajudar de inúmeras formas, por ter paciência com meu inglês e às vezes até com o meu alemão, Danke Schön!

Aos meus amados amigos de infância, Daniel Bites, Eduardo Oliveira, Karine Esterque Fabiano Gonçalves, Higor Porto, Michele Gomes, que já não acreditam que eu existo de tão sumida que estou, mas continuam firmes e fortes na nossa amizade.

A todos os peixes, que doaram suas vidas em prol da ciência, em especial, aqueles que foram criados por mim e toda a equipe durante quase 1 ano nos bioensaios, trazendo alegria ao laboratório todas as vezes em que eles resolviam bagunçar os aquários (quase diariamente). Todos foram grandes companheiros e muito corajosos.

Aos meus tios, tias e primos que me amam e compreenderam cada aniversário, cada festa, cada batizado, que não pude comparecer por estar tratando de peixes na UFF, mesmo sem entender muito bem o que é um doutorado.

À minha amada mãe, que até hoje não entendeu porque eu faço tantos cálculos se eu nem queria estudar matemática, que sempre se preocupa mais com os meus prazos do que eu mesma, que deixa de ver a novela para poder me ajudar seja no que for, que nunca mediu esforços quando o assunto era eu. Até ajudar a numerar sacos para coleta vale. Obrigada, mãe! Sem o seu apoio tudo seria mais difícil. Amo-te muito.

Ao meu noivo, futuro marido e eterno namorado, Rodrigo Carvalheira, que foi a maior e a melhor surpresa da minha vida. Obrigada por tudo! Você foi o braço direito que eu precisava para fazer o bioensaio, foi você quem me apresentou ao Sr. Mesquita, foi você que perdeu dias

montando aquário, trocando água, medindo pH, alimentando e cuidando dos peixes comigo. Até aprender a puxar rede de arrasto, você aprendeu. Todas as madrugadas trabalhando, todos os fins de semana sacrificados em prol da minha tese. Isso não tem palavra que consiga explicar ou que seja suficiente para agradecer de forma justa toda a ajuda física e psicológica que você me deu nos últimos 2 anos. Espero que baste um simples, eu te amo!

A Deus, a quem agradeço sempre por todo dia vivido, por todo caminho oferecido, por todas as janelas abertas e pelo privilégio de conhecer tantas pessoas maravilhosas, com quem tenho aprendido o real sentido da vida.

“A natureza é o corpo inorgânico do homem, quer dizer, a natureza enquanto não é o corpo humano. O homem vive da natureza, isto é, a natureza é o seu corpo, e ele precisa manter um diálogo contínuo com ele se não quiser morrer. Dizer que a vida física e mental do homem está ligada à natureza significa simplesmente que a natureza está ligada a si mesma, pois o homem é parte da natureza.”

Manuscritos econômicos e filosóficos
Carl Marx, 1844

RESUMO

Em ecossistemas aquáticos, o mercúrio participa de múltiplas reações, sendo a metilação responsável pela formação do metilmercúrio, que entra na cadeia alimentar, atingindo peixes e outros organismos do topo cadeia alimentar. O presente trabalho teve como objetivo avaliar potenciais biomarcadores para avaliação de risco ecológico relacionado a exposição de mercúrio em peixes oriundos de dois sistemas aquáticos costeiros do Estado do Rio de Janeiro - Baía de Guanabara (área contaminada) e Baía da Ribeira (área de referência), bem como em bioensaios para verificação da inter-relação dose-resposta de efeitos observados nas áreas de estudo. Na Baía da Ribeira foram coletados 211 peixes de 3 espécies: 120 espécimes de *Genidens genidens*, 38 espécimes de *Aspistor luniscutis* e 53 espécimes de *Haemulon steindachneri*. Na Baía de Guanabara foram coletados 132 peixes sendo 65 espécimes de *Genidens genidens* e 67 espécimes de *Haemulon* sp.. Os níveis de Hg total em músculo tanto para a Baía da Ribeira quanto para a Baía de Guanabara estão abaixo do valor considerado de limite para consumo humano (500 ng/g), sendo maiores na Baía da Ribeira para ambas as espécies de bagres. Na Baía de Guanabara, as áreas de Gradim e da Praia da Bica apresentaram as maiores concentrações de Hg em peixes. Na baía da Ribeira, a área com maiores níveis foi a Enseada do Bracuí. As concentrações de mercúrio variaram de espécie para espécie, de acordo com o nível trófico, com a estação do ano, com o sexo e com o tamanho. Os percentuais de metilmercúrio em hemácias demonstraram uma igual exposição dos peixes a esta forma do mercúrio, mas os percentuais no músculo demonstraram diferentes comportamentos de sua absorção e provável excreção. A ocorrência de efeitos na hematologia e bioquímica dos espécimes estudados foi similar entre as áreas estudadas. Em bioensaios, foi observado que a exposição ao metilmercúrio causou alterações hematológicas, em especial no volume globular e concentração de hemoglobina, ativação de leucócitos, tendência a inibição enzimática de acetilcolinesterase e glutatona total, bem como aumento em efeitos genotóxicos e em danos aos tecidos hepático e de gônadas, sugerindo potenciais prejuízos a espécie estudada em bioensaio.

Palavras-chave: Baía da Ribeira, Baía de Guanabara, bioacumulação, distribuição interna do mercúrio, saúde animal.

ABSTRACT

In aquatic ecosystems, mercury is involved in multiple reactions, among them methylation seems to be the most important, producing methylmercury, capable to accumulate throughout food web, reaching fish species and other top predators. This study aimed to evaluate potential biomarkers for ecological risk assessment related to mercury exposure for fish from two coastal aquatic systems – Guanabara Bay (contaminated area) and Ribeira Bay (Reference area), as well as to assess the dose-response relationship by using bioassays investigating if all the effects found in field work would be found in laboratory experiments. At Ribeira Bay, 211 specimens of 3 species were collected: 120 specimens of *Genidens genidens*, 38 specimens of *Aspistor luniscutis* and 53 specimens of *Haemulon steindachneri*. At Guanabara Bay, a total of 132 specimens were collected being 65 specimens of *Genidens genidens* and 67 specimens of *Haemulon* sp.. Mercury levels in muscles in both areas were below of the limit for human consumption (500ng/g), being the highest values found for catfishes from Ribeira Bay. At Guanabara Bay, Gradim and Praia da Bica stations showed the highest concentrations of mercury in fish. At Ribeira Bay, the station with highest levels was Enseada do Bracuí. Mercury levels depended on species and trophic level (assessed using stable isotopes), and each species had oscillations on mercury levels according to seasons, sex and age (length). Mercury accumulation throughout exposure time is faster than the accumulation reported previously for catfishes from both areas. Methylmercury percentage showed that fishes have similar exposure to this organic form of mercury, but this percentage in muscles demonstrated that are different behavior in its absorption and possible excretion depending on species. Hematological and biochemical effects frequencies in the collected specimens were similar among areas. During the laboratory experiments, it was observed that methylmercury can cause hematological alterations, especially in corpuscular volume and in hemoglobin concentrations, can activate leukocytes production, can possibly inhibit acetylcholinesterase and glutathione activities, as well as increase genotoxic effects frequencies and damage on liver and gonad tissues.

KEYWORDS: Ribeira Bay, Guanabara Bay, bioaccumulation, internal distribution of mercury, animal health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama ilustrando o efeito do pH e da concentração de íons cloro na formação de complexos de mercúrio. Fonte: Sawyer <i>et al.</i> , 1994.	33
Figura 2 – Diagrama de estabilidade do mercúrio nas formas sólida e líquida a 25°C, 1 atm. Fonte: Hem, 1970	33
Figura 3 – Diagrama de estabilidade das formas aquosas do mercúrio a 25°C e 1 atm. Fonte: Hem, 1970	34
Figura 4 - Transformações do mercúrio em ambiente aquático. Fonte: Azevedo, Chasin, 2003	35
Figura 5 - Sistema circulatório de um teleósteo. Adaptado de: Satchell 1992 <i>apud</i> Bone <i>et al.</i> , 1999	46
Figura 6 – Possíveis rotas de uma substância (contaminante) após a absorção, alcançando a corrente sanguínea. Adaptado de Stout, 2003	47
Figura 7 – Relevância toxicológica e ecológica e a escala de tempo para aparecimento das respostas biológicas por níveis de organização biológica. Adaptado de Stout, 2003	54
Figura 8 – Circulação de águas na Baía de Guanabara (AMADOR, 1980 <i>apud</i> BARROCAS, WASSERMAN, 1995)	65
Figura 9 – Setores da Baía de Guanabara, estipulados por Mayr <i>et al.</i> , 1989, considerando o grau e o tipo de contaminação de subáreas da baía	66
Figura 10 – Circulação de águas na Baía da Ribeira em tempo bom (A) e em entradas de frente fria de pós-frontal (B). Fonte: Lima, 1985	67
Figura 11 - Classificação taxonômica das espécies estudadas (NELSON, 2006)	70

Figura 12 - Vista lateral do bagre <i>Genidens genidens</i> coletado na Baía da Ribeira, RJ	72
Figura 13 - Vista lateral do bagre <i>Aspistor luniscutis</i> coletado na Baía da Ribeira, RJ	72
Figura 14 - Vista lateral da cocoroca <i>Haemulon steindachneri</i> coletada na Baía da Ribeira, RJ	72
Figura 15 - Mapa de localização das áreas de estudo (Baías da Ribeira e de Guanabara, Rio de Janeiro) e dos respectivos pontos de coleta	74
Figura 16 - Coleta de sangue por punção venosa caudal em bagre <i>Genidens genidens</i> , coletado na Baía de Guanabara, RJ	75
Figura 17 - Dissecção dos espécimes de peixes coletados. Parte ventral de um espécime de bagre <i>A. luniscutis</i> após abertura com tesoura a partir do ânus	76
Figura 18 - Espécime de apaiari <i>Astronotus ocellatus</i> utilizado em bioensaio	90
Figura 19 - Aquários utilizados para os ensaios com apaiaris <i>Astronotus ocellatus</i>	91
Figura 20 - Composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em músculo de bagres (<i>Genidens genidens</i>), em azul, e de cocorocas (<i>Haemulon steindachneri</i>), em verde, oriundas da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. O número em cada ponto é referente ao número da amostra, vide tabela 11	113
Figura 21 - Composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e a estrutura trófica hipotética correspondente em um sistema dulcícola. Fora da escala, em verde, está representado o resultado obtido para a espécie de cocoroca <i>Haemulon steindachneri</i> e em azul, o resultado obtido para o bagre <i>Genidens genidens</i> . Adaptado de Ferraz <i>et al.</i> , 2009	114
Figura 22 - Relação entre as concentrações de mercúrio (Hg) total em músculo e o sinal isotópico para $\delta^{15}\text{N}$, em bagres (bolas azuis) e em cocorocas (bolas verdes), oriundos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. O número em cada ponto é referente ao número da amostra, vide tabela 11	117

Figura 23 - Relação entre as concentrações de mercúrio (Hg) total em músculo e o sinal isotópico para $\delta^{15}\text{N}$, em bagres (bolas azuis) e em cocorocas (bolas verdes), oriundos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. O número em cada ponto é referente ao número da amostra, vide tabela 11	118
Figura 24 - Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em bagres (<i>Genidens genidens</i>) oriundos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. (n)= número de espécimes	121
Figura 25 - Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em cocorocas (<i>Haemulon steindachneri</i>) oriundas da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. Em linha pontilhada, a curva referente à equação polinomial. Em linha inteira, a equação exponencial. (n)= número de espécimes.....	121
Figura 26 - Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em bagres (<i>Aspistor luniscutis</i>), oriundos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. (n)= número de espécimes	122
Figura 27 - Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em bagres (<i>Genidens genidens</i>), oriundos da Baía de Guanabara, RJ. (n)= número de espécimes	122
Figura 28 - Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em cocorocas (<i>Haemulon sp.</i>), oriundas da Baía de Guanabara, RJ. (n)= número de espécimes	123
Figura 29 - Relação entre tamanho e percentual de metilmercúrio em músculo de bagres <i>Genidens genidens</i> coletados na Baía de Guanabara, em março de 2008	128
Figura 30 - Relação entre tamanho e percentual de metilmercúrio em músculo de cocorocas <i>Haemulon sp.</i> coletadas na Baía de Guanabara, em março de 2008	128
Figura 31 - Concentração de mercúrio em sangue (ng/g, peso úmido) de acordo com a ingestão de alimento, levando-se em consideração espécimes com estômago vazio ou cheio, de bagre <i>G. genidens</i> e	139

cocoroça <i>H. sp.</i> capturados na Baía de Guanabara. (n)= número de espécimes	
Figura 32 - Concentração de mercúrio em sangue (ng/g, peso úmido) de acordo com a ingestão de alimento, levando-se em consideração espécimes com estômago vazio ou cheio, de bagre <i>G. genidens</i> e <i>A. luniscutis</i> e de cocoroça <i>H. sp.</i> capturados na Baía da Ribeira. (n)= número de espécimes	140
Figura 33. Concentração de mercúrio em músculo (ng/g, peso úmido) de acordo com o estágio de vida do animal, levando-se em consideração espécimes jovens e adultos, de bagre <i>G. genidens</i> e cocoroça <i>H. sp.</i> capturados na Baía de Guanabara. (n)= número de espécimes	141
Figura 34. Concentração de mercúrio em músculo (ng/g, peso úmido) de acordo com o estágio de vida do animal, levando-se em consideração espécimes jovens e adultos, de bagre <i>G. genidens</i> e <i>A. luniscutis</i> e de cocoroça <i>H. sp.</i> capturados na Baía da Ribeira. (n)= número de espécimes.	142
Figura 35. Concentração de mercúrio em músculo (ng/g, peso úmido) de acordo com o sexo do animal, levando-se em consideração espécimes machos e fêmeas de bagre <i>G. genidens</i> e de cocoroça <i>H. sp.</i> capturados na Baía de Guanabara	145
Figura 36. Concentração de mercúrio em músculo (ng/g, peso úmido) de acordo com o sexo do animal, levando-se em consideração espécimes machos e fêmeas de bagre <i>G. genidens</i> e <i>A. luniscutis</i> e de cocoroça <i>H. sp.</i> capturados na Baía da Ribeira	146
Figura 37. Modelo da planilha utilizada para o cálculo do índice. N= número de variáveis; S=soma dos valores	159
Figura 38: Células sanguíneas do sangue periférico de <i>Astronotus ocellatus</i> mantidos em laboratório na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. Eritrócito (Er); Trombócito arredondado (Tra); Trombócito fusiforme (Trf); Trombócito esférico (Tre); Linfócito (Lf); Monócito (Mn); Neutrófilo (Nt); Eosinófilo (Es); Neutrófilo POX-positivo (Nt`) e Eosinófilo POX-negativo (Es`). POX: Reação	164

<p>citoquímica de Peroxidase. Coloração Wrigth, Giemsa (Trf e Ter) e Peroxidase (Nt` e Es`)</p> <p>Figura 39. Hepatócitos irregulares com volume maior do que o normal, formando macrovacúolos, quase ausência de núcleos e de sinusóides oriundo de espécime do grupo teste após 6 meses de exposição ao metilmercúrio</p> <p>Figura 40. Área de necrose no tecido hepático oriundo de espécime do grupo teste após 6 meses de exposição ao metilmercúrio</p> <p>Figura 41. Áreas com degeneração vitelínica, presença de material protéico e degeneração de folículos oriundo de espécime do grupo teste após 6 meses de exposição ao metilmercúrio</p>	<p>.....</p> <p>181</p> <p>181</p> <p>185</p>
---	---

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quadro com valores de mercúrio total em águas naturais, em ppt (ng/L)	39
Tabela 2 - Quadro contendo médias de concentração de mercúrio em músculo (HgM, peso úmido) em diferentes espécies de peixes oriundos de baías ou estuários. (n) = número de espécimes coletados	44
Tabela 3. Quadro com concentrações de Hg (peso úmido) e percentuais de MeHg encontrados para diferentes tecidos/órgãos de peixes, segundo Lockhart <i>et al.</i> , 1972	48
Tabela 4 - Médias \pm desvio padrão dos parâmetros biométricos (peso – P, comprimento total - CT, comprimento padrão - CP) e das concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), hemácias (HgHe), plasma (HgPl); fígado (HgF), rim (HgR) e conteúdo estomacal (HgEt) de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= nº de espécimes	97
Tabela 5. Média \pm desvio padrão das concentrações de mercúrio total (ng/g; peso úmido) encontradas para as três espécies coletadas na Baía da Ribeira e na Baía de Guanabara padronizadas pelo peso dos animais	101
Tabela 6 - Médias \pm desvio padrão das concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), em fígado (HgF) e em rim (HgR) e parâmetros biométricos, peso (P), comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) de 02 espécies de peixes da Baía de Guanabara em cada estação de coleta. (n)= número de espécimes	103
Tabela 7. Médias da relação entre mercúrio em hemácias e mercúrio em plasma encontradas em cada estação de coleta para os bagres <i>Genidens genidens</i> e <i>Aspistor luniscutis</i> e para as cocorocas <i>Haemulon</i> sp. coletados na	

Baía de Guanabara e na Baía da Ribeira. (n)= número de espécimes	104
Tabela 8 - Concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), em fígado (HgF) e em rim (HgR) e parâmetros biométricos, peso (P), comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) de 03 espécies de peixes da Baía da Ribeira em cada estação de coleta. (n)= número de espécimes .	106
Tabela 9 - Médias±desvio padrão das concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM) e comprimento total (CT) de 02 espécies de peixes da Baía de Guanabara em cada estação do ano. (n)= número de espécimes ...	108
Tabela 10 - Concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), em fígado (HgF) e em rim (HgR) e parâmetros biométricos, peso (P), comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) de 03 espécies de peixes da Baía da Ribeira em cada estação do ano. (n)= número de espécimes	109
Tabela 11. Dados das amostras de músculo de peixes da Baía da Ribeira utilizadas para determinação da composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$	113
Tabela 12. Concentrações de mercúrio total (HgT) e metilmercúrio (ng/g; peso úmido) e seus respectivos percentuais de metilmercúrio (MeHg) em amostras de músculo e de hemácias de bagres <i>Genidens genidens</i> e cocorocas <i>Haemulon steindachneri</i> oriundas da Baía de Guanabara. (n)= número de espécimes	126
Tabela 13 - Médias \pm desvio padrão das relações (razões) entre as concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), hemácias (HgHe), plasma (HgPl); fígado (HgF), rim (HgR) e conteúdo estomacal (HgEt) de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= número de espécimes	136
Tabela 14 - Médias \pm desvio padrão dos valores encontrados para o hemograma de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. Hematimetria (H), volume globular ou hematócrito (VG), Hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e proteína plasmática total (PPT). (n)= número de espécimes	148
Tabela 15. Médias \pm desvio padrão dos valores encontrados para o leucograma de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira (BR) e de	

Guanabara (BG). Leucometria global (LG), leucometria específica em percentual (Lp), leucometria específica (L), trombócitos em percentual (Tp), trombócitos (T), frequência de linfócitos em percentual (Linfp), contagem de linfócitos (Linf), frequência de monócitos em percentual (Mop), contagem de monócitos (Mo), frequência de neutrófilos em percentual (Neup), contagem de neutrófilo (Neu), frequência de eosinófilos em percentual (Eosp) e contagem de eosinófilo (Eos). (n)= número de espécimes	149
Tabela 16. Médias ± desvio padrão dos valores encontrados para ALT, AST, creatinina e ureia de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= número de espécimes	154
Tabela 17. Médias ± desvio padrão das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase ($\mu\text{moles}/\text{min.}/\text{mg}$) em músculo (AChE-M) e em plasma (AChE-PI) e da butirilcolinesterase em plasma (BChE-PI) de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= número de espécimes	155
Tabela 18. Médias ± desvio padrão dos valores encontrados para as frequências de micronúcleo (MN) e núcleo bilobado (NB) em 1.000 células contadas de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= número de espécimes	157
Tabela 19. Valores utilizados como padrão de normalidade para as espécies de peixes estudadas, determinados de acordo com os dados obtidos no presente trabalho e com dados para peixes teleósteos (CAMPBELL, 2004; TAVARES-DIAS, MORAES, 2004	160
Tabela 20. Médias ± desvio padrão dos parâmetros acompanhados durante o experimento: peso (g); tamanho (cm); concentrações de mercúrio (peso úmido; ng/g) em sangue (HgSt), em hemácias (HgHe) e em plasma (HgPI); hematimetria (H) ($\text{H} \times 10^6/\text{mm}^3$); contagem de leucócitos ($\text{L} \times 10^3/\text{mm}^3$); contagem de trombócitos (T) ($\text{T} \times 10^3/\text{mm}^3$); leucometria global (LG) ($10^3/\text{mm}^3$); volume globular (VG) (%); volume globular médio (VGM) (fL); proteína plasmática total (PPT) (g/dL); Eosinófilos (%); Neutrófilos (%); Linfócitos (%); Monócitos (%); MN (n/1000 eritrócitos); NB (n/1000 eritrócitos). (n)= número de espécimes.	163
Tabela 21. Concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM),	

fígado (HgF) e gônada (HgG) e atividade enzimática de acetilcolinesterase em músculo (AChE_M) (μ moles/min./ mg) de apaiaris <i>Astronotus ocellatus</i> expostos artificialmente a metilmercúrio. (n)= número de espécimes	166
Tabela 22. Alterações histológicas em fígados de apaiaris <i>Astronotus ocellatus</i> expostos artificialmente a metilmercúrio por 6 meses	167
Tabela 23. Concentrações de mercúrio (Hg) em diferentes órgãos (ng/g; peso úmido) e as relações entre essas concentrações encontradas em apaiaris <i>Astronotus ocellatus</i> , após 6 meses de exposição a metilmercúrio. (n)= número de espécimes	169
Tabela 24. Percentuais de metilmercúrio em amostras de hemácias, plasma, músculo e fígado de indivíduos de apaiari <i>Astronotus ocellatus</i> do grupo teste, exposto a 7 ppm de metilmercúrio durante 6 meses. (n)= número de espécimes	170
Tabela 25. Resultados encontrados para hemograma, bioquímica sérica, concentração de mercúrio total (peso úmido) nos eritrócitos e parâmetros biométricos de apaiaris (<i>Astronotus ocellatus</i>) expostos a metilmercúrio (7ppm) em laboratório. (n)= número de espécimes	172
Tabela 26. Resultados encontrados para leucograma e frequência de micronúcleo e núcleo bilobado em apaiaris (<i>Astronotus ocellatus</i>) expostos a metilmercúrio (7ppm) em laboratório. (n)= número de espécimes	173
Tabela 27. Médias \pm desvio padrão das atividades enzimáticas encontradas para o grupo controle e para o grupo teste do ensaio de 6 meses realizado com apaiaris <i>Astronotus ocellatus</i> expostos artificialmente a metilmercúrio. (n)= número de espécimes	174
Tabela 28. Alterações histológicas em fígados de apaiaris <i>Astronotus ocellatus</i> expostos artificialmente a metilmercúrio por 6 meses. NI= parâmetro não identificado nesta lâmina	180
Tabela 29. Alterações histológicas em gônadas de apaiaris <i>Astronotus ocellatus</i> fêmeas expostas artificialmente a metilmercúrio por 6 meses. NI= parâmetro não identificado nesta lâmina	184

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
AChE_M	Acetilcolinesterase no músculo
AChE_Pi	Acetilcolinesterase no plasma
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BChE_Pi	Butirilcolinesterase no plasma
BG	Baía de Guanabara
BR	Baía da Ribeira
CAT	Catalase
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
CP	Comprimento padrão
CT	Comprimento total
Eos	Freqüência de eosinófilos
FC	Fator de condição
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSHt	Glutathione total
H	Hematimetria
Hb	Concentração de hemoglobina
Hg	Mercúrio
HgEt	Mercúrio total em conteúdo estomacal
HgF	Mercúrio total em fígado
HgG	Mercúrio total em gônada
HgHe	Mercúrio total em hemácias
HgM	Mercúrio total em músculo
HgPi	Mercúrio total em plasma
HgR	Mercúrio total em rim
L	Leucometria específica
LG	Leucometria global
Linf	Freqüência de linfócitos
Lp	Leucometria específica em percentual
MeHg	Metilmercúrio
MeHg_He	Metilmercúrio nas hemácias
MeHg_M	Metilmercúrio no músculo
MN	Micronúcleo

Mo	Frequência de monócitos
NB	Núcleo bilobado
Neu	Frequência de neutrófilos
PPT	Proteína Plasmática Total
T	Número de trombócitos
Tp	Trombócitos em percentual
VG	Volume globular ou hematócrito
VGM	Volume Globular Médio

RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA
RESUMO NA LÍNGUA ESTRANGEIRA

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	28
3 BASE TEÓRICA	30
3.1. CICLO BIOGEOQUÍMICO DO MERCÚRIO.....	30
3.2. BIOACUMULAÇÃO E BIOMAGNIFICAÇÃO TRÓFICA	40
3.3. O MERCÚRIO NOS PEIXES – DISTRIBUIÇÃO INTERNA	46
3.4. EFEITOS DO MERCÚRIO EM PEIXES	51
3.5. ÁREAS DE ESTUDO	60
3.5.1. Baía de Guanabara	60
3.5.2. Baía da Ribeira	66
3.6. ESPÉCIES DE PEIXES ESTUDADAS	70
4 MATERIAL E MÉTODOS	73
4.1. AMOSTRAGENS	73
4.2. AMOSTRAS DE SANGUE	74
4.3. BIOMETRIA E AMOSTRAGEM DE ÓRGÃOS INTERNOS	75
4.4. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL	77
4.5. DETERMINAÇÃO DE METILMERCÚRIO	78
4.6. ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E NITROGÊNIO	79
4.7. MICRONÚCLEO	80
4.8. HEMOGRAMA	80
4.9. ACETILCOLINESTERASE	82
4.9.1. Em músculo	82
4.9.2. Em sangue	84
4.10. FATOR DE CONDIÇÃO	85
4.11. ESTRESSE OXIDATIVO	85
4.12. CORTES HISTOLÓGICOS	87
4.13. BIOENSAIOS	89
4.13.1. Contaminação da ração	92
4.13.2. Teste piloto	93
4.13.3. Bioensaio II	93
4.14. ANÁLISES DE DADOS	94
4.14.1. Curvas de bioacumulação de Hg	94
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
5.1. MERCÚRIO NAS ÁREAS ESTUDADAS	96
5.1.1. Comparação entre áreas	100
5.1.2. Distribuição do mercúrio em peixes nas estações de coleta	102
5.1.3. Mercúrio em peixes em diferentes estações do ano	107

5.2. ESTADO TRÓFICO E ACUMULAÇÃO DE Hg	111
5.3. CURVAS DE BIOACUMULAÇÃO	120
5.4. METILMERCÚRIO	126
5.5. DISTRIBUIÇÃO INTERNA	134
5.5.1. Distribuição interna do mercúrio total	135
5.5.2. Relação entre Hg e o percentual de estômagos cheios e vazios .	138
5.5.3. Acumulação de Hg em relação ao estágio de vida	140
5.5.4. Acumulação de Hg em relação ao sexo	143
5.6. BIOMARCADORES DE EFEITO	147
5.6.1. Parâmetros hematológicos	147
5.6.2. Bioquímica sérica	153
5.6.3. Atividade enzimática de acetilcolinesterase	154
5.6.4. Efeitos genotóxicos - Micronúcleo	155
5.6.5. Avaliação qualitativa: risco potencial nas áreas de estudo	158
5.7. BIOENSAIOS	162
5.7.1. Bioensaio I – teste piloto	162
5.7.2. Bioensaio II	168
6 CONCLUSÕES	187
7 REFERÊNCIAS	192

1 INTRODUÇÃO

Ecosistemas aquáticos costeiros vêm sendo explorados pela comunidade humana e culturalmente utilizados como corpos receptores de rejeitos, sejam eles de caráter doméstico, industrial e/ou hospitalar. O lançamento do livro “*Silent Spring*” (CARSON, 1962), conhecido em português como Primavera Silenciosa, acarretou uma tomada de consciência ambiental pela sociedade norte-americana, que começou a gerar novas leis a fim de estabelecer níveis supostamente seguros de exposição a esses diversos contaminantes aos seres humanos. Posteriormente, buscaram-se padrões de exposição segura para a biota presente nesses ecossistemas para realizar uma avaliação de risco ambiental e à saúde humana cada vez mais completa, rápida e eficaz, ajudando na escolha de medidas compensatórias e mitigadoras, assim como no planejamento de programas de gestão de ecossistemas aquáticos, através da hierarquização das áreas sob perspectiva do risco ambiental. No Brasil, a abordagem de avaliação de risco à saúde humana tem sido utilizada em diversos trabalhos acadêmicos (CASTILHOS, 1999; CASTRO, 2005) e recentemente, adotada pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) para o cadastro de áreas contaminadas, totalizando em 2004, 1.336 áreas contaminadas no Estado de São Paulo (www.cetesb.sp.gov.br). Estudos abordando a avaliação de risco ecológico ainda são raros, especialmente os com emprego na gestão ambiental (RODRIGUES, 2006; CASTILHOS *et al.*, 2004a; CASTILHOS *et al.*, 2004b; RAMOS *et al.*, 2005; SILVA, 2004; SOUTO, 2004).

O mercúrio (Hg) é considerado um dos metais mais tóxicos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), especialmente quando este mercúrio está na forma de metilmercúrio (MeHg), substância neurotóxica e teratogênica. Acredita-se que o mercúrio inorgânico é transformado em metilmercúrio através da atividade de bactérias anaeróbicas, especialmente em ecossistemas aquáticos, onde o processo parece ser mais eficiente (ULLRICH *et al.*, 2001). A maioria dos estudos indica que o processo de metilação do mercúrio inorgânico ocorre preferencialmente em sedimentos orgânicos superficiais sob condições anaeróbicas. Entretanto, condições aeróbicas poderiam oxidar o enxofre, liberando mercúrio inorgânico anteriormente ligado a ele na forma de sulfetos, formando íons de mercúrio solúveis como Hg^{+2} , o qual seria assimilado pelas bactérias e rapidamente metilado (WHO, 1990).

Quando formado, o metilmercúrio é capaz de bioacumular e biomagnificar através da cadeia trófica, alcançando predadores de topo como peixes carnívoros restritos. Por esta razão a principal via de exposição ao MeHg aos seres humanos, aos mamíferos aquáticos, aos répteis e às aves é através do consumo de peixes contaminados (WHO, 1990), sendo estes utilizados então como bioindicadores em estudos de contaminação mercurial. BRUGGEMAN (1982) demonstrou que a diferença no fator de bioacumulação entre peixes não-carnívoros e peixes carnívoros é cerca de 10 vezes (uma ordem de grandeza maior), o que foi encontrado também para peixes no Brasil (CASTILHOS, 1999).

Assim, para estudos relacionados ao mercúrio, determinar o nível trófico das espécies estudadas é de suma importância. Em geral, a esta definição é realizada de acordo com estudos dos itens alimentares encontrados no conteúdo estomacal de espécimes de peixes coletados e que estavam com estômagos cheios. Todavia, sabe-se que nem todos os itens alimentares encontrados no conteúdo estomacal de um animal serão obrigatoriamente digeridos e assimilados por ele na mesma proporção. Por isso, atualmente, estudos da composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do animal são utilizadas para definir o que está sendo absorvido dos itens alimentares (FERRAZ *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2006).

Contradições e incertezas ainda existem a respeito da contribuição de diferentes variáveis ambientais para os teores de mercúrio em peixes. A disponibilidade do mercúrio para a biota depende de variáveis biológicas como mecanismos de absorção e excreção, estágio de vida, comportamento migratório, entre outros. Depende também de fatores ligados a processos físico-químicos, como adsorção por argilas e outras partículas, formação de sulfetos, quelação por matéria orgânica, precipitação, sedimentação e mudanças no pH, na salinidade ou no potencial redox (ULLRICH *et al.*, 2001).

Trabalhos relatam efeitos dos mais variados em organismos vivos devido à exposição a contaminantes presentes em água, ar, solo. No entanto, para que uma relação entre a causa e o efeito seja definida são necessários estudos comprobatórios em condições controladas para que nenhuma variável externa àquele contaminante seja capaz de interferir e causar algum tipo de efeito, mascarando a ação da substância tóxica. Por isso, ensaios laboratoriais crônicos, estudando parte do ciclo de vida do animal, são extremamente importantes para a investigação e delimitação de uma relação entre dose da substância tóxica e a resposta ou efeito observado no organismo. Os bioensaios, então, são importantes para a definição da relação causa-efeito entre o contaminante e a resposta biológica observada (LANDIS, YU, 1995). Contudo, nem sempre são capazes de mimetizar as condições naturais nas quais os organismos-teste seriam expostos.

Por outro lado, estudos *in situ* expressam o que está acontecendo no sistema, no entanto a definição do estressor ou dos estressores potencialmente tóxicos e que poderiam estar causando algum efeito nesta biota se torna mais difícil. E para determinar se aquela biota está em risco ou não, são necessários valores de referência, ou seja, padrões de normalidade, para configuração do estado de saúde do animal estudado. Levando-se em consideração que são inúmeras as espécies existentes e nem sempre os dados de referência já estão disponíveis, faz-se necessário realizar concomitantemente estudos em uma área controle ou de referência, onde teoricamente os potenciais estressores não estariam presentes. Assim, os dados da área de referência serviriam como base para definição de quaisquer alterações encontradas na área impactada

(U.S. EPA, 2000). No entanto áreas consideradas como referência são cada vez mais difíceis de serem encontradas.

Para verificação de possíveis alterações devido a exposição a contaminantes, inclusive o mercúrio, tem sido utilizados os chamados biomarcadores, que são por definição, indicadores de exposição a xenobióticos e de possíveis efeitos relacionados a essa exposição (ATSDR, 1994). Os biomarcadores são classificados em biomarcadores de exposição (indicação de que aquele organismo esteve exposto àquele estressor) e em biomarcadores de efeito (qualquer resposta anatômica, fisiológica e/ou bioquímica de um organismo vivo devido à exposição a um estressor) (ATSDR, 1994). Resultados encontrados anteriormente sugerem que cada espécie de peixe apresenta uma resposta diferente para diversos biomarcadores (RODRIGUES, 2006).

CASTILHOS *et al.* (2004a) demonstraram que concentrações de Hg em tecido muscular de tucunarés (*Cichla* sp), coletados na bacia do rio Tapajós, mostraram correlações negativas entre os teores de Hg no músculo e o número de eritrócitos e de leucócitos, sugerindo um quadro de anemia não regenerativa. Já para traíras (*Hoplias malabaricus*) oriundas de área próximas ao estudo com tucunarés (garimpos de São Chico e Creporzinho, na reserva garimpeira de ouro do Tapajós, município de Itaituba-PA), mostraram quadro clínico de anemia regenerativa, pois não foram observadas alterações na proporção hemácias jovens/hemácias maduras (CASTILHOS *et al.*, 2004b).

Bagres da espécie *Genidens genidens* oriundos da Baía de Guanabara apresentaram correlação negativa entre a atividade enzimática de acetilcolinesterase e os níveis de Hg em músculo e em sangue, não sendo observadas correlações com as alterações nucleares em hemácias. Já para corvinas (*Micropogonias furnieri*) da mesma área, no mesmo estudo, foi observado o inverso, onde as alterações nucleares apresentaram correlações mais fortes e significativas com a exposição ao mercúrio do que a acetilcolinesterase (RODRIGUES, 2006). Logo, maiores estudos são necessários para que haja uma melhor definição dos efeitos à saúde animal e seus potenciais estressores.

No estado do Rio de Janeiro, a Baía de Guanabara recebe diariamente uma carga aproximada de 4.800 Kg de metais tóxicos oriundos de diversos tipos de efluentes industriais, domésticos e hospitalares (WASSERMAN *et al.*, 2000). Diversos trabalhos têm classificado esse estuário como altamente impactado por ações antrópicas (FARIAS *et al.*, 2008; FRANCONI *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2007; BAPTISTA-NETO *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2006; KEHRIG *et al.*, 2001; WASSERMAN *et al.*, 2000; KEHRIG *et al.*, 1998). Apesar da liberação de metais para a baía são encontradas baixas concentrações de mercúrio na biota. A complexação do mercúrio por moléculas orgânicas, por sulfetos e a possível adsorção em partículas como argilas podem diminuir a disponibilidade destes para a biota. CAMPOS (2000) observou através da aplicação do Índice de Risco Ecológico Potencial (IREP) que o elevado estado trófico da baía reduz o risco ecológico potencial da contaminação por metais, apesar das altas concentrações encontradas e que os maiores riscos foram encontrados para o mercúrio (Hg) e para o cádmio (Cd). Em trabalhos anteriores utilizando a metodologia de avaliação de risco ecológico, foi sugerida a ausência de risco à biota aquática em relação ao Hg, contudo um estudo mais detalhado seria necessário para poder inferir se o risco ecológico é distribuído por igual em toda a Baía ou se há áreas com maior resposta biológica aos impactos ambientais (RODRIGUES, 2006).

Ainda no estado do Rio de Janeiro, a Baía da Ribeira vem sendo considerada como área de referência em relação à contaminação mercurial devido às baixas concentrações encontradas em sedimento (28 a 73 ng/g) e em peixes (<200ng/g) (FIORI, 2008; CARDOSO *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2004). Contudo, espécies de peixes carnívoras, apresentam níveis de mercúrio acima do limite seguro estabelecido pela Organização Mundial de Saúde para consumo humano (500ng/g), sugerindo que o mercúrio estaria disponível para a biota, confirmando que não apenas as cargas de mercúrio no ambiente aquático são importantes, mas sobretudo a dinâmica biogeoquímica que regula sua biodisponibilidade (RODRIGUES, 2006).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar biomarcadores para avaliação de risco ecológico relacionado a exposição de mercúrio em peixes carnívoros oriundos de dois sistemas aquáticos costeiros do Estado do Rio de Janeiro - Baía de Guanabara (área contaminada, com altos níveis de mercúrio em sedimento) e Baía da Ribeira (área com baixos níveis de mercúrio em sedimento), bem como em bioensaios para a verificação da inter-relação dose-resposta de efeitos observados nas áreas de estudo.

Para alcançar esse objetivo geral foram traçados os seguintes objetivos específicos:

(i) avaliar a biodisponibilidade do mercúrio para peixes em ecossistemas costeiros;

(ii) avaliar a biomagnificação do Hg em peixes por meio da identificação do estado trófico das espécies estudadas;

(iii) caracterizar curvas de acumulação de mercúrio total através do tamanho para as espécies de peixes nas áreas de estudo;

(iv) biomarcadores de exposição I: quantificar as concentrações de mercúrio total e metilmercúrio encontradas em músculo e hemácias de peixes, causadas por possíveis diferenças na disponibilidade / incorporação do mercúrio;

(v) biomarcadores de exposição II: investigar a distribuição interna do mercúrio nos peixes estudados;

(vi) avaliar a ocorrência de alterações em biomarcadores de efeito em

sangue dos peixes oriundos das baías estudadas (hemograma; bioquímica sérica; micronúcleo; atividades enzimáticas) como consequência da exposição ao mercúrio e definir uma matriz de efeitos encontrados em ambas as áreas, de acordo com valores de referência;

(viii) realizar bioensaios crônicos em peixes para investigação da inter-relação dose-resposta dos biomarcadores de exposição com biomarcadores de efeito investigados em trabalhos de campo previamente.

3 BASE TEÓRICA

3.1 CICLO BIOGEOQUÍMICO DO MERCÚRIO

Os metais são amplamente utilizados pelos humanos, nas mais diversas atividades, com os mais diferentes fins, há milênios, sendo indispensáveis para o estilo de vida da sociedade atual. Tanto metais essenciais quanto os metais não essenciais ao organismo podem ser tóxicos, dependendo da dose a qual o organismo está exposto. A agência ambiental americana (EPA) considera como os seis metais mais tóxicos, em ordem alfabética, o arsênio (As), o berílio (Be), o cádmio (Cd), o cromo hexavalente (Cr^{+6}), o chumbo (Pb) e o mercúrio (Hg).

O mercúrio (Hg) é um metal-traço presente no meio ambiente naturalmente em baixas concentrações. Pode ser encontrado na forma inorgânica (Hg^0 – elementar; Hg^{2+} - íon mercúrico e Hg_2^{2+} - íon mercurioso) e em formas orgânicas, dentre elas o metilmercúrio (MeHg). As principais fontes naturais de Hg são a desgaseificação da crosta terrestre, as emissões de vulcões e a evaporação de corpos hídricos e as queimadas naturais. As principais fontes antrópicas são indústrias químicas, defensivos agrícolas/fertilizantes, indústrias de eletro-eletrônica, incineração e mineração (PEREIRA, GOMES, 2002; WHO, 1990). Era amplamente utilizado como antisséptico e ainda é utilizado por dentistas na realização de amálgamas dentários e implantes de ouro.

Tem-se estimado que a emissão de Hg para a atmosfera por atividades industriais é de cerca de 2.000 a 3.000 toneladas/ano, sendo 95% deste

depositado, permanecendo no solo, 3% é transferido para águas superficiais e 2% persiste na atmosfera (MICARONI *et al.*, 2000). Sabe-se que o mercúrio (Hg) pode ser transportado a longas distâncias em escala global, via atmosfera, e por isto, a contaminação não está limitada a locais próximos às fontes. Embora a maior parte do mercúrio no ambiente seja inorgânica, parte dele, em especial nos ecossistemas aquáticos, é eficientemente transformado a um composto altamente tóxico, o metilmercúrio (MeHg), entrando na cadeia alimentar através da transformação do íon Hg^{2+} por um processo chamado de metilação, onde o Hg^{2+} recebe um grupamento metila.

O Hg elementar (Hg^0) está presente na atmosfera (>80%), podendo ser oxidado a formas solúveis em água, tendendo a se depositar sob a superfície terrestre com as chuvas. Uma vez oxidado para a forma iônica Hg^{+2} (mais estável que os outros íons), possui afinidade por ligantes inorgânicos e orgânicos em organismos, especialmente os radicais sulfidríla de enzimas, e no meio aquático pode ligar-se ao cloro, formando cloretos ou pode formar hidróxidos e complexos com ácidos húmicos e fúlvicos (ULLRICH *et al.*, 2001).

LINDQVIST *et al.* (1984; BRITO, 1998) classificaram o mercúrio quanto à solubilidade em formas voláteis, reativas solúveis em água e não reativas. As formas voláteis são Hg^0 , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$. As formas reativas solúveis em água são Hg^{2+} , HgX_2 , HgX_3 , HgX_4^- (onde X pode ser OH^- , Cl^- ou Br^-), HgO em partículas aerossóis e ácidos complexos com Hg^{2+} . As formas não reativas são: CH_3Hg^+ , CH_3HgOH e outros compostos organo mercúricos, $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$, HgS e outros compostos formados pela ligação de Hg^{2+} ao enxofre em fragmentos de materiais húmicos.

Os ecossistemas aquáticos têm diferentes habilidades para converter as cargas de mercúrio inorgânico em MeHg, devido a uma série de fatores hidrológicos, de qualidade de água, que podem afetar a ciclagem e a posterior bioacumulação do MeHg. É assumido que o processo de metilação do mercúrio inorgânico seja realizado nas camadas superiores do sedimento (nefelóide) principalmente por bactérias anaeróbicas sulfato-redutoras em pH baixo. Esse processo ocorre preferencialmente em sedimentos orgânicos anaeróbicos, embora alguns estudos demonstrem que a metilação pode ocorrer

também através de processos microbianos aeróbicos (BALDE, 1997; WHO, 1990; D'ITRI, 1990 *apud* AZEVEDO, CHASIN, 2003). Condições de anaerobiose são favoráveis à formação de sulfetos de mercúrio, insolúveis em tais condições, permanecendo indisponível para a biota. Ao contrário, em condições aeróbicas, os sulfetos de mercúrio reagem com o oxigênio formando sulfatos e sulfitos e Hg^{+2} solúvel.

Ambos o Hg^{+2} e o cátion de MeHg (CH_3Hg^+) têm uma forte tendência a formar complexos, em particular com ligantes como o enxofre. O enxofre tem um importante papel na metilação do mercúrio por bactérias presentes naturalmente em sedimentos e em solos. O balanço entre sulfato e sulfeto é uma peça chave no controle da metilação em sedimentos superficiais. O sulfato estimula a metilação do Hg pelas bactérias sulfato-redutoras, enquanto o excesso de sulfetos pode diminuir a taxa de metilação por diminuir a quantidade de Hg a qual a bactéria estaria exposta. Estudos demonstraram que as concentrações ótimas para que ocorra metilação de sulfato estão entre 10 a 300 μM e de sulfeto, até 10 μM (MUNTHER *et al.*, 2007).

Na ausência de sulfetos, a especiação do mercúrio inorgânico em ambientes aquáticos de água doce é dominado por 03 complexos sem carga, $\text{Hg}(\text{OH}_2)$, HgOHCl e HgCl_2 . Hidróxidos de metilmercúrio são as formas mais estáveis de metilmercúrio em ecossistemas dulcícolas, já em águas salgadas a forma mais estável é o cloreto de metilmercúrio (Figuras 1 a 3) (ULLRICH *et al.*, 2001).

O metilmercúrio pode estar na forma de complexo aquoso ($\text{CH}_3\text{HgOH}^{+2}$) ou na forma de complexos com Cl^- e Br^- . A forma orgânica dimetilada, $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, é volátil em águas alcalinas e tem baixa estabilidade em águas ácidas, tendendo à perda de um grupamento metila, com formação do metilmercúrio. Em água doce, com pH menor que 7, pode haver formação de HgCl_2 . Em áreas estuarinas ou marinhas, com maiores concentrações de íons cloro, pH alto, a forma predominante seria de HgCl_2^{2-} (SAWYER *et al.*, 1994).

Além da influência do enxofre e do cloro, a concentração do metilmercúrio pode ser influenciada pela “idade” do mercúrio presente na interface sedimento-água (mercúrio recentemente lançado – novo- ou mercúrio

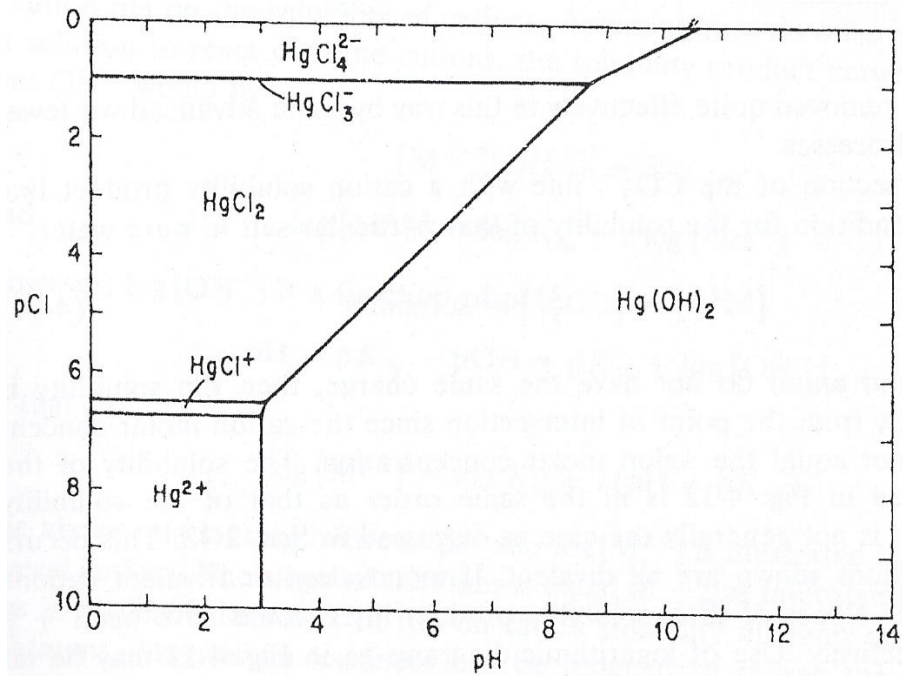


Figura 1. Diagrama ilustrando o efeito do pH e da concentração de íons cloro na formação de complexos de mercúrio. Fonte: Sawyer *et al.*, 1994.

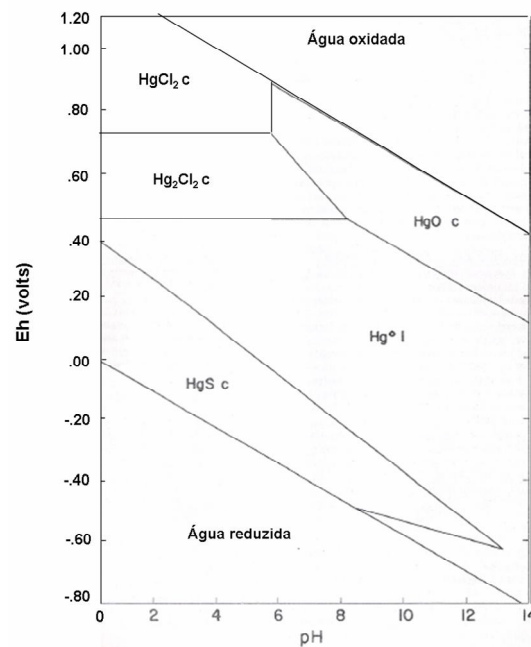


Figura 2. Diagrama de estabilidade do mercúrio nas formas sólida e líquida a 25°C, 1 atm. Fonte: Hem, 1970.

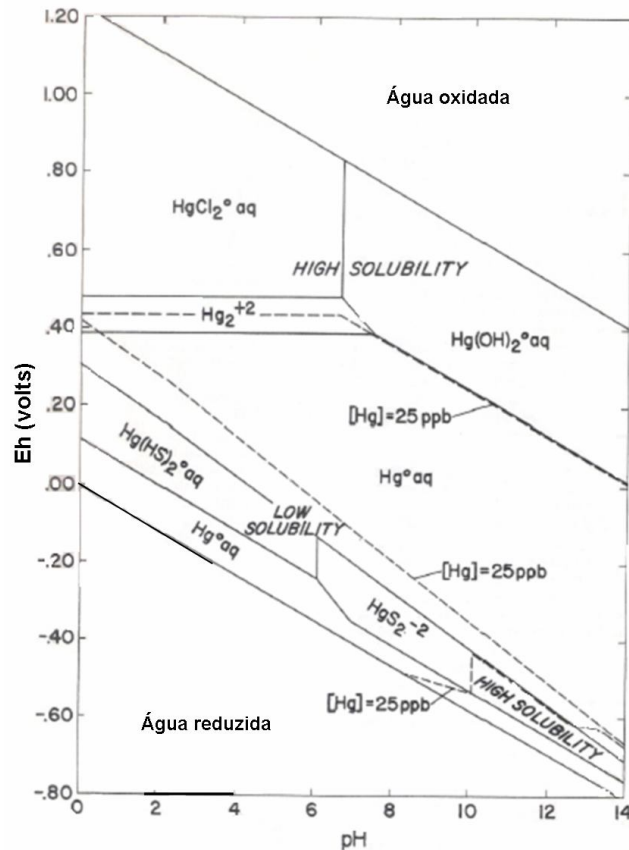


Figura 3. Diagrama de estabilidade das formas aquosas do mercúrio a 25°C e 1 atm. Fonte: Hem, 1970.

já reciclado no próprio sistema - antigo), pela atividade microbiana, pela concentração de oxigênio dissolvido, pela matéria orgânica disponível, adsorção por partículas e pH (MUNTHE *et al.*, 2007). Oxi-hidróxidos de ferro e manganês, matéria orgânica e sulfetos, dependendo das condições de oxidação dos sedimentos são os maiores vetores de controle da mobilidade e do transporte de mercúrio e de outros metais em ecossistemas aquáticos (MACHADO *et al.*, 2004; ULLRICH *et al.*, 2001). Um esquema sucinto das principais formas do mercúrio em águas é apresentado na figura 4.

O mercúrio presente em águas superficiais pode ser adsorvido a partículas finas em suspensão, permanecer como íons dissolvidos, formar compostos estáveis e permanecer em solução ou formar compostos orgânicos ou inorgânicos em partículas maiores, tendendo a sedimentar (ULLRICH *et al.*, 2001).

A afinidade do mercúrio pelas fases dissolvida e particulada pode ser medida utilizando-se valores de coeficiente de partição partícula-água (K_d). Um elevado valor de K_d indica alta afinidade pela fase particulada. Na Baía de Sepetiba, PARAQUETTI *et al.* (2004) estimaram K_d s para alguns rios que deságuam nesta baía. Valores de $2,0 \times 10^5$ foram relacionados a processos físicos de sorção e dessorção e K_d s maiores que $1,0 \times 10^6$, a processos de precipitação e dissolução de minerais, em particular de sulfetos. Em quatro dos seis rios estudados os K_d s encontrados demonstraram que os processos de sorção e dessorção controlavam a interação do Hg entre as fases dissolvida e particulada. E em dois outros rios, essa interação é controlada por processos de precipitação e dissolução de minerais.

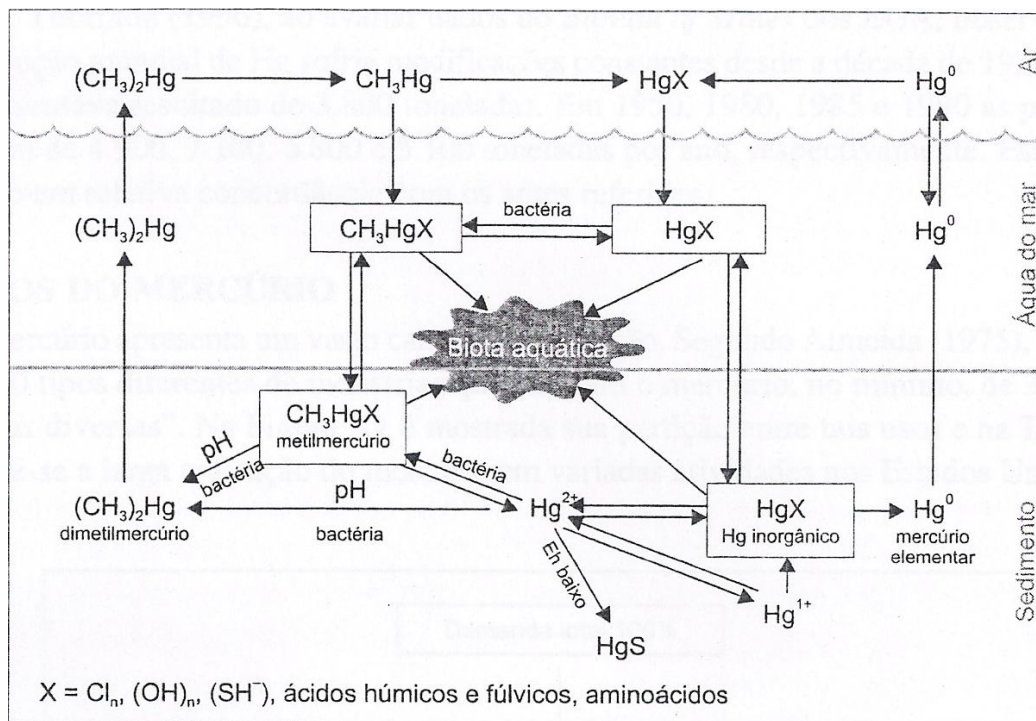


Figura 4. Transformações do mercúrio em ambiente aquático. Fonte: Azevedo, Chasin, 2003.

Em relação ao controle da metilação de acordo com o pH, muitos estudos evidenciam o aumento da bioacumulação do metilmercúrio com o aumento da acidez em lagos. No entanto, como isso acontece ainda não está bem evidente. A diminuição da produtividade do sistema devido ao baixo pH pode ser um mecanismo para aumentar os efeitos na bioacumulação. O

aumento da acidez também pode estar interferindo diretamente na produção do metilmercúrio, caso esteja ocorrendo juntamente com o aumento de sulfato no sistema, aumentando a atividade de bactérias sulfato-redutoras (MUNTHE *et al.*, 2007).

HÅKANSON (1980) estudando lagos suecos observou a relação entre a diminuição do pH e o aumento das concentrações de mercúrio em peixes, além da relação destas com a produtividade do sistema, que causaria uma “diluição” do mercúrio neste sistema, com a sua ligação às partículas orgânicas em suspensão. Da mesma forma, experimentos em lagos acidificados artificialmente para realização de estudos demonstram a mesma tendência (WATRAS, BLOOM. 1992).

A temperatura também pode afetar a acumulação do MeHg. Em ensaio laboratorial, Fowler *et al.* (1978) demonstraram que a acumulação de cloreto de mercúrio e de cloreto de metilmercúrio é mais alta quando moluscos e crustáceos estão em ambientes com maior temperatura. O tempo para eliminação do mercúrio inorgânico em altas temperaturas também foi mais rápido, no entanto, a eliminação do mercúrio orgânico não foi diferente de acordo com a temperatura, somente a sua acumulação o foi.

Outro fator importante no controle da biodisponibilidade do mercúrio é a presença de matéria orgânica no sistema. Essa matéria orgânica pode estimular o crescimento bacteriano e indiretamente aumentar a atividade de bactérias potencialmente metiladoras de mercúrio. Tanto as características quanto a concentração da matéria orgânica dissolvida podem afetar a complexação do Hg e sua disponibilidade para metilação. Em água doce mais de 90% do mercúrio forma complexos com a matéria orgânica ou está associado a carbono orgânico dissolvido, especialmente a ácidos húmicos. O mercúrio inorgânico tende a se ligar mais fortemente a partículas minerais e a matéria orgânica detrítica, já o MeHg está mais fortemente associado a partículas biogênicas. Trabalhos recentes sugerem que a matéria orgânica dissolvida é um importante ligante sob condições redutoras, através de interações com complexos com enxofre e mercúrio (MUNTHE *et al.*, 2007).

A quantidade e a especiação da matéria orgânica dissolvida têm sido

consideradas importantes na disponibilidade do mercúrio para a biota. Entretanto, pouco ainda se conhece sobre a bioquímica destes compostos, principalmente dos ácidos fúlvicos (ULLRICH *et al.*, 2001).

Entretanto, altas concentrações de COD podem reduzir a taxa de metilação, ou por redução da concentração do substrato (Hg^{+2}) ou por diminuir a solubilidade do metilmercúrio em água (ULLRICH *et al.*, 2001). Altos níveis de carbono orgânico dissolvido, oriundos da decomposição de matéria orgânica, podem decrescer a quantidade de mercúrio absorvida por peixes. Consequentemente, lagos que possuem influência de alagados na área de drenagem, por exemplo, apresentam baixos níveis de Hg em peixes (U.S. EPA, 2000). No entanto, DOWNS e colaboradores (1999), observaram uma relação positiva entre concentrações de carbono orgânico dissolvido acima de 8mgC/L e a concentração de mercúrio em peixes.

AULA *et al.* (1994) encontraram uma forte correlação entre o mercúrio reativo e o carbono orgânico dissolvido em águas de rios amazônicos impactados por atividade de garimpo. LACERDA *et al.* (2001) encontraram essa mesma relação para águas estuarinas, no encontro de rios que deságuam na Baía de Sepetiba, sugerindo que a formação de organo-complexos está controlando a reatividade do mercúrio nestas águas, mais do que a formação de cloro-complexos.

O percentual de metilmercúrio encontrado em sedimentos estuarinos da Flórida decresceu com o aumento dos teores de carbono orgânico e de argilas nas amostras (KANNAN *et al.*, 1998), sugerindo que ambos podem quelar o mercúrio inorgânico.

Íons de Fe e Mn podem afetar cataliticamente a metilação do mercúrio. LEE *et al.* (1985) mostraram que a metilação em água de lagos na presença de ácidos fúlvicos aumentou com a adição de íons metálicos, especialmente o Fe. A relação entre a taxa de metilação e as concentrações de ferro no sistema ainda precisa ser melhor estudada. Sabe-se que o ferro pode complexar o Hg, influenciar na partição entre fases sólida-líquida e também na atividade microbiana. Algumas bactérias redutoras de ferro III são capazes de realizar a metilação do Hg (MUNTHE *et al.*, 2007).

Estudos recentes em lagos e áreas alagadas demonstraram que as taxas de metilação variam de acordo com o tempo em que o mercúrio foi lançado naquele sistema, o que pode estar ligado a mudanças químicas do Hg ou na sua complexação ou partição, afetando a sua distribuição no sistema (o mercúrio poderia não ser carregado para zonas com maior potencial a metilação) (MUNTHE *et al.*, 2007).

Além dessas áreas propícias à metilação supracitadas, em sistemas aquáticos tropicais, as raízes de macrófitas e o perifiton são micro-ambientes favoráveis a metilação do mercúrio (WIENER *et al.*, 2001; COELHO *et al.* 2005). Contudo pode ocorrer também a formação de MeHg ainda na coluna d'água abioticamente, onde alguns compostos seriam doadores do radical metil para o mercúrio inorgânico em solução (ULLRICH *et al.*, 2001).

Uma das substâncias que participam do processo de metilação nos ecossistemas é a metilcobalamina (MeCoB₁₂), substância análoga a vitamina B₁₂ que é produzida durante a síntese bacteriana. A metilcobalamina doa radicais metila para o Hg²⁺, que parece ser o precursor direto do metilmercúrio (CRAIG, 1995 *apud* BRITO, 1998). Testes em laboratório para a indução do processo de metilação em sedimentos demonstraram que um menor tempo de incubação, uma menor condutividade, um maior pH e uma maior temperatura influenciam no potencial de metilação. Já a cobalamina parece não induzir com eficiência a produção de metilmercúrio em sedimento, ao contrário do que ocorre na coluna d'água (BRITO, 1998).

Os níveis de mercúrio em água doce podem variar de 0,3 a 43 ng/L (ppt), como observado na tabela 1. Todavia, níveis mais altos podem ser encontrados em lagos ricos em ácidos húmicos. A porcentagem de MeHg nas águas superficiais aeróbicas de lagos e rios é de aproximadamente 10 a 25% enquanto que em águas estuarinas e marinhas deve ser menor que 5%. As concentrações de Hg e de MeHg aumentam dramaticamente nas águas anóxicas de fundo em relação às águas superficiais (GILMOUR, HENRY, 1991). Concentrações de mercúrio total em água intersticial de sedimentos são geralmente maiores do que as encontradas na coluna d'água.

Tabela 1. Quadro com valores de mercúrio total em águas naturais, em ppt (ng/L).

Matriz	Hg Total	Fonte
Água doce não contaminada	5-10	Mierli, 1990
Água doce não filtrada	0,3-20	Mierli, 1990
Água doce filtrada	0,1-3	WHO, 1989
Água de rios	0,7-43	Bloom, 1989
Águas superficiais aeróbicas	<5	Bloom, 1989

As cargas de MeHg nas algas dependem parcialmente das concentrações de MeHg na coluna d'água (MASON, 1995). Os teores de MeHg presentes em algas aumentam após o alagamento experimental de reservatórios. Por outro lado, trabalhos mostram que a captação do MeHg pelo perifiton também é afetada pela produção primária (PICKHARDT *et al.*, 2002). Este processo foi sugerido por Kehrig e colaboradores (1998) como uma possível explicação para diferenças nas concentrações de mercúrio em peixes da Baía de Guanabara nas diferentes estações do ano, sendo menores no verão. Durante um bloom de algas, se a quantidade de MeHg no sistema permanecer constante, então, haverá menos MeHg por unidade celular de alga. Este processo pode também afetar o zooplâncton e assim, sucessivamente, atuando como um fator de diluição da contaminação, pelo crescimento (KEHRIG *et al.*, 1998).

Os invertebrados bênticos podem acumular MeHg a partir dos detritos, da matéria vegetal, de tecidos animais, ou da água, dependendo de seu mecanismo de alimentação. Uma vez que o MeHg é rapidamente transferido através da cadeia trófica, os peixes acumulam quase integralmente as cargas de MeHg presentes em seu alimento. A alta tendência à biomagnificação do MeHg é geralmente explicada por sua alta afinidade por grupos -SH associados a proteínas (SWEET, ZELIKOFF, 2001; ULLRICH *et al.*, 2001).

Considera-se que as populações de peixes contenham uma significativa porção do MeHg de um ecossistema aquático e que a remoção da biomassa de peixes de um sistema possa ser um método para decrescer o estoque de

MeHg local (VERTA, 1994). Quando um organismo cresce rapidamente, qualquer massa de MeHg ingerido é incorporado em uma maior massa e a concentração de MeHg por unidade de massa de tecido será menor. Este fenômeno é muitas vezes referido como diluição por crescimento.

3.2 BIOACUMULAÇÃO E BIOMAGNIFICAÇÃO TRÓFICA

Bioacumulação direta ou bioconcentração pode ser definida em função da captação direta de uma substância da água, ou pelo menos, por via não dietária (VEITH *et al.*, 1979 *apud* CASTILHOS, 1999), fornecendo uma razão fixa entre a concentração na água e a concentração no organismo ou parte dele (WHO, 1990).

Biomagnificação ou bioacumulação indireta é um termo que descreve o processo pelo qual as substâncias químicas passam de um nível trófico para o próximo nível trófico, exibindo um aumento nas concentrações em relação ao nível trófico inferior (CASTILHOS, 1999).

A condição primordial para a bioconcentração é a presença da substância no meio e a possibilidade dessa ser absorvida, através do sistema celular. Propriedades que alteram a disponibilidade da substância no meio alterarão a bioconcentração da substância. Assim, substâncias rapidamente biodegradáveis permanecem por curto período de tempo em água ou solo. Igualmente o processo de volatilização, adsorção e hidrólise reduzirão o tempo de contato entre a substância e o organismo (AZEVEDO, CHASIN, 2003).

Em relação ao MeHg, as concentrações em peixes são afetadas tanto por parâmetros físicos como a área da bacia, temperatura, pH, concentração de carbono orgânico dissolvido e produtividade quanto por parâmetros biológicos como a posição trófica, taxa de crescimento, idade, sexo e comportamento migratório (MUNTHER *et al.*, 2007).

Por sua característica anfótera, o MeHg liga-se fortemente a proteínas, facilitando sua passagem através dos tecidos. Quando resistentes a biotransformação, ou seja, às transformações bioquímicas que essas substâncias sofrem no organismo, contaminantes são eliminados muito

lentamente e tendem a se acumular no organismo depois de repetidas exposições (AZEVEDO, CHASIN, 2003). A biotransformação de compostos tenta em geral formar produtos hidrossolúveis, mais fáceis de serem excretados via urina, podendo alterar a toxicidade desses compostos.

A taxa de excreção do MeHg por organismos vivos é baixa. Nos humanos, a sua meia vida biológica varia de 30 a 120 dias, sendo em média abaixo de 70 dias (WHO, 1990; CARRIER *et al.*, 2001). Em peixes e crustáceos, a meia-vida é de 1.000 dias aproximadamente (640-1.200 dias) (NRCC, 1979 *apud* AZEVEDO, CHASIN, 2003). A acumulação é dependente da concentração ingerida diariamente (dose) num determinado espaço de tempo (fator de exposição).

Alguns outros fatores interferem na absorção do mercúrio: tamanho do organismo (ex. a superfície das brânquias de peixes pequenos é maior em relação à superfície de peixes maiores relativamente ao peso dos mesmos), e mudanças na fisiologia do animal devido a mudanças em fatores ambientais como a temperatura. Outros fatores interferem na excreção, como por exemplo, o tamanho do organismo (tempo necessário para atingir o equilíbrio está relacionado ao tamanho dos indivíduos – quanto menor, mais rápido) e o metabolismo (mecanismos bioquímicos para biotransformação da substância) (AZEVEDO, CHASIN, 2003).

A incorporação de elementos-traço no fitoplâncton ocorre principalmente por mecanismos passivos de adsorção, onde estes elementos ligam-se por troca catiônica aos radicais carboxil (-COOH) e por ligações de coordenação com radicais (-O, -N) (CRIST *et al.*, 1981 *apud* ESTEVES, 1998). Uma vez adsorvidos, uma fração destes elementos-traço poderá ser absorvida por mecanismos ativos, da superfície externa para o meio intracelular (FOWLER, 1982 *apud* ESTEVES, 1998). A predominância de mecanismos passivos de adsorção e a grande superfície relativa do fitoplâncton resultam em elevados fatores de bioconcentração da ordem de 10^2 a 10^6 (FOWLER, 1982 *apud* ESTEVES, 1998).

Este mercúrio acumulado pode ser biomagnificado através da transferência do MeHg acumulado no primeiro nível trófico (produtores) para os

consumidores. Isso ocorre devido à perda da energia potencial sob a forma de calor (muitas vezes até 80% ou 90%) a cada transferência de nível trófico. Conseqüentemente, o consumidor terciário (C3) deve ingerir mais alimento, para conseguir o mesmo percentual energético adquirido pelo consumidor primário (C1). Portanto, quanto menor a cadeia alimentar, ou quanto mais próximo o organismo estiver do início da cadeia, maior a energia disponível à população, menor taxa de ingestão do contaminante, menor concentração acumulada pelo organismo.

Por outro lado, quanto mais longa for a cadeia trófica, maior será a concentração acumulada pelo consumidor final (ODUM, 1988). Quando acumulado em peixes, o MeHg é encontrado predominantemente em tecido muscular, onde cerca de 90% do Hg total é MeHg (HUCKABEE *et al.*, 1979; AKAGI *et al.*, 1994).

Assim, em um ambiente aquático, os peixes, representantes de um dos maiores níveis tróficos, dependendo do seu hábito alimentar, apresentam diferentes concentrações de Hg acumulado, sendo os carnívoros os que apresentam as maiores concentrações. Bruggeman (1982) já havia demonstrado que o fator de bioacumulação do Hg é cerca de 10 vezes entre peixes não carnívoros e carnívoros.

Esta relação também tem sido vista em outros trabalhos (CASTILHOS, 1999). CASTILHOS; BIDONE (2000) avaliaram as concentrações de mercúrio total em 22 espécies de peixes amazônicos coletados no rio Tapajós e observaram que as concentrações de mercúrio em peixes carnívoros, em média, eram seis vezes maiores do que em peixes não carnívoros. Na área controle, a ordem crescente encontrada de acordo com os níveis de mercúrio foi: herbívoros = detritívoros < onívoros < planctívoros < piscívoros. Na área contaminada, a sequência foi: herbívoros < detritívoro = onívoro < carnívoro. Peixes planctívoros não foram coletados nesta área.

SOUTO (2004) mostrou que valores médios de Hg em diversas espécies de peixes amazônicos encontrados em mais de uma dezena de trabalhos sobre contaminação mercurial em sistemas aquáticos amazônicos, variam de 10 ng/g em espécies herbívoras como *Leporinus* sp. até 3.330ng/g em

espécies carnívoras como *Brachyplatystoma filamentosum*. Uma revisão sobre as concentrações de mercúrio em espécies de peixes marinhas / estuarinas, incluindo trabalhos nas áreas e com as espécies estudadas no presente estudo, é apresentada na tabela 2. O valor máximo encontrado foi de 800ng/g para uma espécie de bagre *Bagre marinus* na Flórida.

A espécie de corvina *Micropogonias furnieri* foi amplamente estudada por vários autores (RAMOS *et al.*, 2004; LIMA, CASTILHOS, 2001; KEHRIG *et al.*, 2001; KEHRIG *et al.*, 1998), abrangendo os maiores estuários do estado do Rio de Janeiro (Baía de Guanabara, Baía de Sepetiba e Baía da Ilha Grande). Uma análise temporal dos teores de Hg em *Micropogonias furnieri* da Baía de Ribeira sugere estabilidade nas concentrações durante a última década (RAMOS *et al.*, 2004).

KEHRIG *et al.* (1998) demonstraram que os níveis de mercúrio em corvinas *Micropogonias furnieri* na Baía de Guanabara eram mais altos durante o inverno, diferença esta ligada a mudanças na carga de material em suspensão, produtividade primária, aumento de temperatura, novas fontes de alimento vindas com a chuva, entre outros fatores que possam influenciar na biodisponibilidade do mercúrio no sistema.

A estrutura da teia trófica e a sua composição também podem afetar a biomagnificação, através das mudanças na eficiência da assimilação do metilmercúrio de acordo com a qualidade do alimento e com a química do conteúdo estomacal. Taxas de crescimento mais rápidas podem vir a reduzir as concentrações de mercúrio em peixes quando comparadas as concentrações padronizadas pelo tamanho do peixe. Diferenças nas taxas de crescimento em múltiplos níveis tróficos podem resultar numa diluição cumulativa pela cadeia trófica (MUNTHER *et al.*, 2007).

Tabela 2. Quadro contendo médias de concentração de mercúrio em músculo (HgM, peso úmido) em diferentes espécies de peixes oriundos de baías ou estuários. (n) = número de espécimes coletados.

Espécie	Área	Tamanho	HgM (ng/g)	Referência
<i>Cathorops spixii</i> (Bagre)	Baía de Santos	-	60,0±20,0	Azevedo <i>et al.</i> , 2009
<i>Cathorops spixii</i> (Bagre)	Cananéia	-	70±10	Azevedo <i>et al.</i> , 2009
<i>Bagre</i> spp. (Bagre)	Baía de Guanabara	32-54cm	1,3 nmol/g d.w. (14)	Kehrig <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspistor luniscutis</i> (Bagre)	Baía da Ribeira	11-35cm	180,0±79,0 (23)	Rodrigues, 2006
<i>Netuma barba</i> (Bagre)	Baía de Guanabara	22-59cm	126,1 ± 40,2 (14)	Rodrigues <i>et al.</i> , 2003
<i>Arius felis</i> (Bagre)	Baía de Biscayne, Flórida	-	316,0 (1)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Arius felis</i> (Bagre)	Baía de Tampa, Flórida	-	418,0 (3)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Arius felis</i> (Bagre)	Porto de Charlotte, Flórida	-	262,0 (2)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Arius felis</i> (Bagre)	Baía da Flórida, Flórida	-	528,0 (7)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Arius felis</i> (Bagre)	Pine Islando Sound, Flórida	-	80,0 (2)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Arius felis</i> (Bagre)	White water Bay, Flórida	-	678 (1)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Arius felis</i> (Bagre)	Boca Ciega Bay, Flórida	-	172 (2)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Arius felis</i> (Bagre)	Card Sound, Flórida	-	424 (1)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Bagre marinus</i> (Bagre)	Baía de Tampa, Flórida	-	800,0 (2)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Genidens genidens</i> (Bagre)	Baía de Guanabara	8,5-20,9cm	103,1±44,1 (66)	Rodrigues, 2006
<i>Genidens genidens</i> (Bagre)	Baía da Ribeira	9,5-31,0cm	98,3±89,5 (83)	Rodrigues, 2006
<i>Chsychthyes nigrodigitatus</i> (Bagre)	Delta do Niger	-	< 0,1	Eboh <i>et al.</i> , 2006
<i>Haemulon steindachneri</i> (Cocoroca)	Baía da Ribeira	16,5-29,8 cm	381,7±230,8 (19)	Rodrigues, 2006
<i>Haemulon plumieri</i> (Cocoroca)	Baía de Biscayne, Flórida	-	174,0 (2)	Kannan <i>et al.</i> , 1998

Espécie	Área	Tamanho	HgM (mg/kg)	Referência
<i>Haemulon plumieri</i> (Cocoroca)	Baía da Flórida, Flórida	-	78,0 (7)	Kannan <i>et al.</i> , 1998
<i>Centropomus undecimalis</i> (Robalo)	Baía de Guanabara	28-40cm	3,4 nmol/g d.w. (6)	Kehrig <i>et al.</i> , 2009
<i>Centropomus undecimalis</i> (Robalo)	Baía de Sepetiba	-	16,3 (3)	Marins <i>et al.</i> 1998
<i>Paralichthys brasiliensis</i> (Robalo)	Baía de Sepetiba	-	47,3 (3)	Marins <i>et al.</i> 1998
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Bahia Blanca (Argentina)	20-50cm	370±110 (11)	Marcovecchio <i>et al.</i> , 2001
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	34-58cm	2,9 nmol/g d.w. (34)	Kehrig <i>et al.</i> , 2009
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	8,5-12 cm	55,5±12,6 (13)	Rodrigues, 2006
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía da Ribeira	11,5-44,7 cm	81,3±91,4 (34)	Rodrigues, 2006
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	19-52,5cm	108,9±58,6 (61)	Kehrig <i>et al.</i> , 2002
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	35-57,7cm	199,5±119,3 (20)	Kehrig <i>et al.</i> , 2002
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	< 30 cm	156,9 ± 83 (8)	Lima, Castilhos, 2001
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	30-40 cm	169,2 ± 82 (9)	Lima, Castilhos, 2001
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	> 40 cm	165,9 ± 30 (6)	Lima, Castilhos, 2001
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Sepetiba	-	14,3 (3)	Marins <i>et al.</i> 1998
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Sepetiba	-	77,3 ± 68,0 (62)	Kehrig <i>et al.</i> , 1998
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía da Ilha Grande	-	89,2 ± 93,1 (57)	Kehrig <i>et al.</i> , 1998
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	< 30 cm	43,4 ± 20 (16)	Kehrig, 1992
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	30-40 cm	117,0 ± 45 (32)	Kehrig, 1992
<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	Baía de Guanabara	> 40 cm	168,2 ± 44 (13)	Kehrig, 1992
<i>Mugil lisa</i> (Tainha)	Baía de Guanabara	41,1cm	15,4±5,8 (20)	Kehrig <i>et al.</i> , 2001
<i>Mugil lisa</i> (Tainha)	Baía de Guanabara	6,7cm	40,8±10,7 (40)	Kehrig <i>et al.</i> , 2001

Assim, para estudos relacionados a acumulação do mercúrio e sua posterior biomagnificação, faz-se necessário determinar corretamente o nível trófico das espécies estudadas. Esta definição pode ser realizada de acordo com estudos dos itens alimentares encontrados no conteúdo estomacal de espécimes de peixes coletados. Todavia, sabe-se que nem todos os itens alimentares encontrados no conteúdo estomacal de um animal serão obrigatoriamente digeridos e assimilados por ele na mesma proporção. Por isso, atualmente, estudos da composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do animal são utilizadas para definir o que está sendo realmente absorvido dos itens alimentares (FERRAZ *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2006).

3.3 O MERCÚRIO NOS PEIXES – DISTRIBUIÇÃO INTERNA

Para entender melhor como a distribuição do mercúrio pode se dar no peixe, é importante a compreensão dos caminhos percorridos pela circulação sanguínea, ou seja, em que seqüência o sangue passa pelos órgãos e quais possíveis transformações podem ocorrer nesse percurso. Na figura 5 é apresentado um esquema da circulação do sangue no peixe ósseo. Neste exemplo, a espécie possui corações acessórios, além do coração principal, mas esses corações acessórios não estão presentes em todas as espécies de peixes.

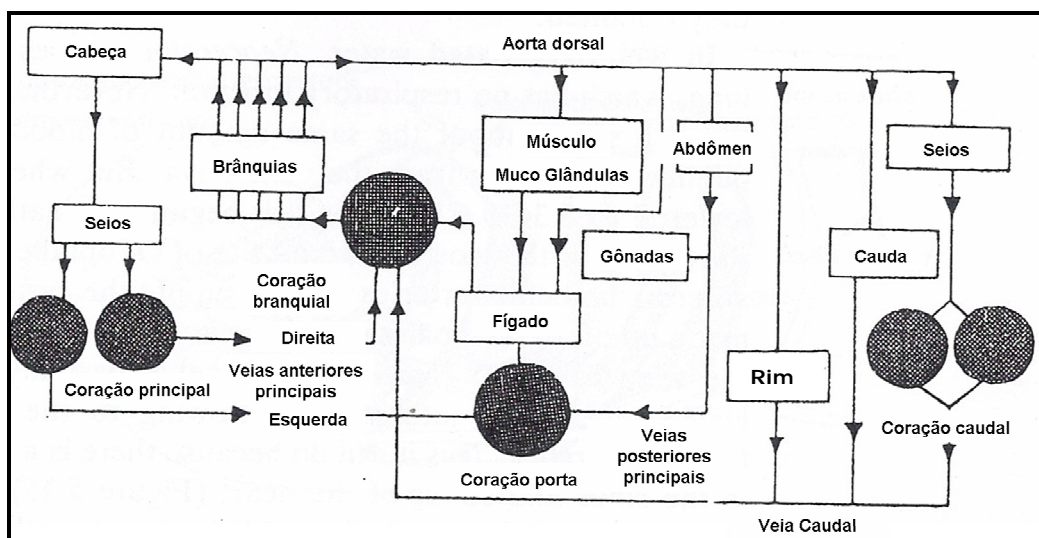


Figura 5. Sistema circulatório de um teleosteo. Adaptado de: Satchell 1992 *apud* Bone *et al.*, 1999.

Em caso da exposição ao mercúrio via alimentação, durante o processo digestivo e de absorção dos nutrientes, o mercúrio vai ser distribuído para o corpo através do sangue. Outra via de exposição é a via respiratória, onde o mercúrio poderia penetrar nas células das brânquias, sendo distribuído novamente para o corpo através do sangue. Na figura 6 podem ser observadas as principais rotas dentro de um peixe de uma substância ao entrar na corrente sanguínea. Na tabela 3 são apresentadas as formas de mercúrio predominantes em alguns órgãos-alvo importantes de acordo com alguns estudos de distribuição interna.

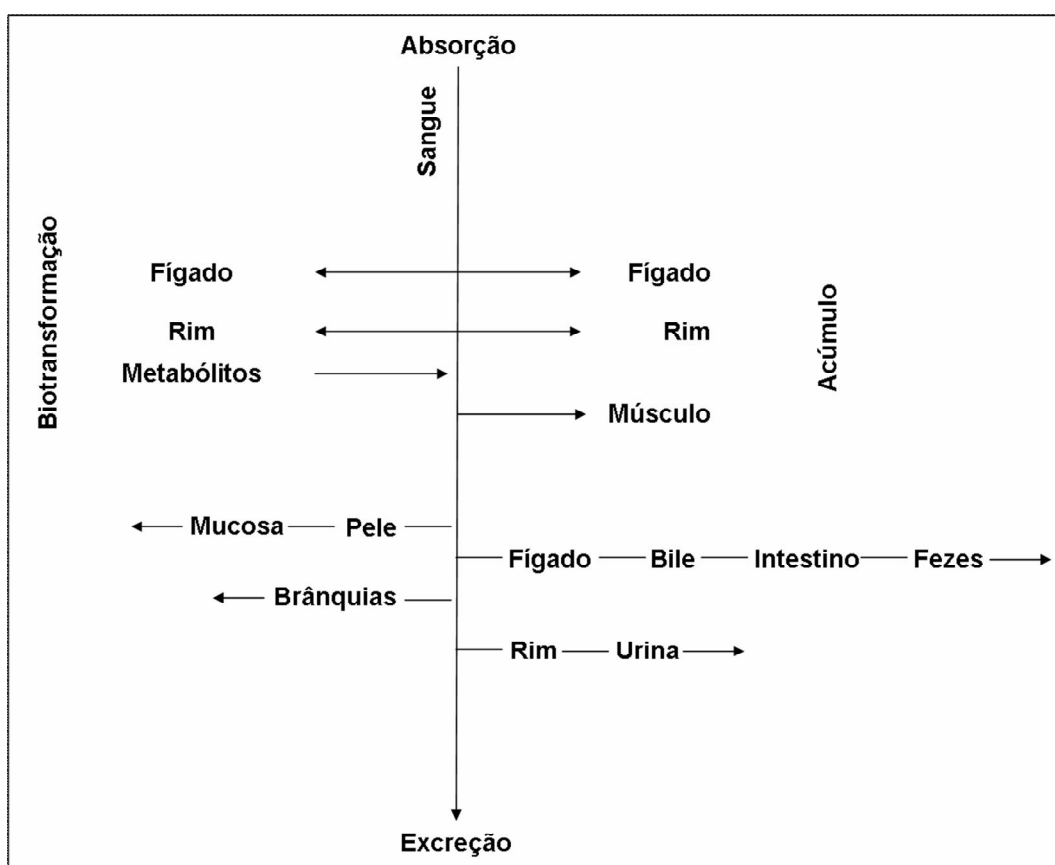


Figura 6. Possíveis rotas de uma substância (contaminante) após a absorção, alcançando a corrente sanguínea. Adaptado de Stout, 2003.

Tabela 3. Quadro com concentrações de Hg (peso úmido) e percentuais de MeHg encontrados para diferentes tecidos/órgãos de peixes, segundo Lockhart *et al.*, 1972.

Tecido/órgão	Hg total ug/g	%MeHg
Fígado	1,57	97
Rim	2,16	104
Baço	1,11	91
Estômago	0,75	102
Intestino	1,49	97
Cérebro	0,74	87
Brânquias	0,52	102
Pele	0,30	111
Gônada de fêmea	0,39	99
Gônada de macho	0,59	93
Coração	1,22	63
Escamas	0,26	61
Hemácias	0,22	89
Bile	0,12	102
Músculo	1,01	105

Como todo elemento não essencial, sem função conhecida no organismo, o primeiro órgão a tentar retirar do organismo o que não é essencial para ele é o fígado. Mas nem todas as tentativas de transformar o que é tóxico em não tóxico dão certo. Um dos mecanismos de detoxicação do organismo depois da exposição a metais é a produção de metalotioneína, capaz de complexar metais e não deixar que eles atinjam órgãos vitais ao organismo exposto. O mercúrio inorgânico tenderá a ser excretado, podendo alcançar os rins, que nos peixes, também é um órgão hematopoiético. O que não é excretado tende a ser acumulado em órgãos ditos como acumuladores (músculo, cérebro, por exemplo).

Em seres humanos, foi demonstrado que o MeHg apresenta afinidade pelas hemácias e que o Hg inorgânico apresenta afinidade pelo plasma (SCHÜTZ *et al.*, 1994). No sangue de peixes, o metilmercúrio possui afinidade

pelas hemácias e o mercúrio inorgânico interage com as proteínas do plasma, principalmente, com a albumina e com as globulinas (CEMBER *et al.*, 1968). Nas hemácias de peixes, cerca de 90% do Hg está na forma orgânica (OLSON *et al.*, 1973). Entretanto, são poucos os relatos de Hg total em sangue (WAYLAND, 2001; RIBEYRE, BOUDOU, 1984; OLSON *et al.*, 1973; CEMBER *et al.*, 1968). A maioria da literatura encontrada é para espécies que vivem em ecossistemas sob clima temperado e que apresentam sazonalidade bem definida.

A relação entre Hg em eritrócitos (HgHe) e Hg em plasma (HgPI) varia para cada espécie. Em humanos, essa proporção é de 9-10:1 para exposição ao metilmercúrio. Em roedores, a proporção é uma ordem de grandeza maior: 100-200:1 (WHO, 1991; SUZUKI, 1971 *apud* CARRIER *et al.*, 2001). Em peixes, a relação encontrada variou de acordo com a área e com a espécie, indo de 0,3:1 em corvinas *Micropogonias furnieri* até 8:1 em bagres *Aspistor luniscutis*, ambos da Baía da Ribeira – RJ.

Um estudo com bagres da espécie *Netuma barba* na Baía de Guanabara evidenciou uma relação linear entre os teores de Hg em tecido muscular e os teores de Hg em sangue (RODRIGUES, CASTILHOS, 2003), indicando um possível equilíbrio entre o que é encontrado no sangue e a acumulação nos demais tecidos. RODRIGUES (2006) encontrou uma razão entre Hg total no músculo e Hg total no sangue de 8:1 e entre Hg no músculo e Hg nas hemácias de 4:1 para peixes bentônicos.

Existem modelos relacionados a absorção e excreção de substâncias no organismo, amplamente utilizados na farmacologia. Para peixes, modelos foram desenvolvidos especialmente para a exposição via respiração (BARRON, 1990), onde o volume ventilado, a permeabilidade da membrana nas brânquias e o fluxo sanguíneo (velocidade na qual o sangue passa pelas veias), permitem estimar o quanto de mercúrio entraria no organismo e o quanto sairia. Este tipo de modelo funciona bem para avaliação do processo de bioacumulação, mas não quando inserimos a variável alimentação e o processo de biomagnificação trófica.

Outros estudos, apesar de não proporem modelos de distribuição

interna, investigaram os órgãos-alvo e as proporções de mercúrio orgânico e inorgânico nestes compartimentos (LOCKHART *et al.*, 1972). SUZUKI *et al.* (1973) investigaram a distribuição do mercúrio em diferentes órgãos de 13 espécies de peixes e verificaram que o mercúrio inorgânico era 15 vezes maior no fígado do que no conteúdo estomacal, independente da forma química presente no alimento. Os rins parecem ser mais seletivos, acumulando preferencialmente o mercúrio inorgânico. O máximo percentual de metilmercúrio em rim encontrado foi de 15%. Quanto maior a concentração no músculo, maiores foram as concentrações encontradas no fígado e no rim. No cérebro a maior parte do mercúrio total está na forma de metilmercúrio.

Em bioensaio, OLSON *et al.* (1973) demonstrou que em peixes o músculo, o cérebro e as gônadas são acumuladores de Hg, sem apresentar perdas visíveis devido a processos de biotransformação. RIBEIRE; BOUDOU (1984) em contaminação artificial de espécimes de *Salmo gairdneri*, usando HgCl_2 e CH_3HgCl , observaram que peixes expostos ao cloreto de mercúrio apresentaram não menos de 55% desta forma do mercúrio em relação ao mercúrio total em músculo e em brânquias. Para a exposição a cloreto de metilmercúrio, nesses mesmos órgãos, o cloreto de metilmercúrio representava 60% do mercúrio total. Outros órgãos apontados pelo estudo como potenciais acumuladores de mercúrio foram o fígado, o rim e o cérebro, além do sangue.

Uma importante constatação relatada neste trabalho de RIBEIRE, BOUDOU (1984) foi em relação ao período de descontaminação do organismo, onde os animais não estão mais expostos e estariam em processo de excreção do que fora acumulado anteriormente. Durante esse período foi observado que os órgãos onde havia um contínuo aumento das concentrações de mercúrio mesmo após o término da exposição, chamados de órgãos receptores, possuíam uma acumulação do tipo exponencial durante a contaminação. Para o cloreto de mercúrio, o fígado, o cérebro, o músculo, o intestino posterior e o rim demonstraram esse comportamento. Para o cloreto de metilmercúrio, somente o cérebro, o músculo e o intestino posterior. O sangue, as brânquias e o baço apresentaram curvas sigmoidais, tendo um decréscimo das concentrações de mercúrio logo após o término da exposição tanto a cloreto de

mercúrio quanto a cloreto de metilmercúrio. Para o metilmercúrio, o rim também apresentou curva sigmóide. Esses órgãos foram chamados de órgãos doadores, onde no processo de descontaminação, eles poderiam estar liberando o mercúrio para os órgãos receptores, mesmo sem uma exposição atual a essas substâncias.

Em bioensaio, onde os peixes recebiam mercúrio inorgânico, fenilmercúrio e/ou metilmercúrio, foi observada acumulação de mercúrio inorgânico nos rins, pseudobrânquias, fígado, bile e baço, mas não no tecido muscular e nem no nervoso. A distribuição do metilmercúrio não foi uniforme, mas foi observada em fígado, baço, rim e brânquias (OHMOMO, BACKSTRÖM *apud* SUZUKI *et al.* 1973).

3.4 EFEITOS DO MERCÚRIO EM PEIXES

Para peixes, estima-se que o limite de tolerância biológica é alcançado quando as concentrações no tecido muscular estão entre 10 e 20 ppm, podendo ser letais. Muitos estudos a cerca do Hg e seus efeitos são realizados com peixes por alguns motivos importantes: (1) os peixes são considerados a principal via de exposição dos seres humanos ao MeHg e são importantes como fonte de proteína na alimentação, como recreação e esporte; (2) estão frequentemente expostos a uma grande variedade de substâncias químicas potencialmente tóxicas; (3) são capazes de acumular e bioconcentrar xenobióticos e, (4) pelo aumento na incidência de tumores em espécies de peixes (SWEET, ZELIKOFF, 2001).

Apesar de humanos e peixes serem modelos importantes e independentes, há uma estreita relação entre as células do sistema imunológico de peixes e de mamíferos superiores, sendo similares em função no organismo, morfologia e bioquímica (SWEET, ZELIKOFF, 2001). Um dos objetivos dos experimentos com peixes para verificação de modificações no sistema imunológico é a extrapolação destes dados para os humanos.

Os peixes são intensamente utilizados como bioindicadores, no entanto nem todas as espécies existentes são boas bioindicadoras. Em avaliações de

contaminação ambiental por metais e substâncias orgânicas persistentes, é importante levar em consideração alguns fatores como: (1) que populações e espécimes de peixes devam ser sedentárias e representativas na área estudada, (2) que as espécies de peixes devam acumular os poluentes sem perder a vida, abrangendo desde indivíduos muito sensíveis aos mais tolerantes, (3) que representem comunidades persistentes pela rápida recuperação após a ocorrência de distúrbios naturais, (4) que devam ser de fácil amostragem e resistentes quanto à sobrevivência no laboratório, (5) que a comparação de resultados possa ser feita com a área controle (não impactada) em vários períodos de tempo, (6) que mostrem grande variedade e pouca susceptibilidade ante as diferenças de microhabitats natural em relação aos organismos inferiores, fazendo com que sejam muito utilizados para avaliações regionais e na diferenciação de macrohabitats, (7) que muitas espécies possuam vida longa (de 2 a 10 anos ou mais), podendo refletir a qualidade da água por longo tempo, (8) que por habitar continuamente os ambientes aquáticos, integrem a história química, física e biológica das águas, (9) por serem de fácil manejo e interpretação, a frequência de amostragem para avaliação tenha a tendência de ser menor se comparada aos organismos de vida mais curta e (10) a taxonomia dos peixes é bem estabelecida, sendo realizada em laboratório ou no próprio campo (U. S. EPA, 2000).

Para a observação de modificações encontradas na biota de um ecossistema, podem ser utilizados biomarcadores, que por definição são alterações induzidas por xenobióticos em componentes, processos, estrutura e funções celulares ou bioquímicas, que são mensuradas em um sistema biológico ou em indivíduos (ATSDR, 1994). Podem ser divididos em biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito. Biomarcador de exposição pode ser a concentração do xenobiótico ou de seus metabólitos no organismo (ou tecido) ou mesmo a mensuração de um produto da interação entre o xenobiótico e uma molécula presente no organismo. Os biomarcadores de efeito são definidos como qualquer resposta anatômica, fisiológica e/ou bioquímica de um organismo vivo, que, dependendo da magnitude, pode ser reconhecido como um comprometimento à saúde ou doença em um indivíduo, população ou comunidade no ecossistema (ATSDR, 1994).

Os biomarcadores têm importante papel na avaliação de risco ecológico, especialmente quando é possível associar-se um grupo de marcadores biológicos a determinados xenobióticos, podendo-se sugerir que tais biomarcadores sejam utilizados como indicadores de sustentabilidade do ecossistema. Faz-se necessário que o biomarcador seja sensível o bastante para detectar efeitos sub-letais, que possam predizer os impactos sobre a população e sobre o ecossistema (KLAASSEN, 1996). Os biomarcadores podem avaliar um sistema em diferentes níveis, como pode ser observado na figura 7.

Além da sensibilidade do biomarcador, o modo de amostragem é de alta importância, buscando sempre novas técnicas que sejam não intrusivas / destrutivas. Um tecido biológico bastante adequado para este tipo de investigação é o sangue, pois reflete as condições gerais do organismo e está, necessariamente, em equilíbrio com todos os órgãos, podendo ser coletado sem significativos impactos para o organismo vivo. Além disso, pode-se proceder ao hemograma, um exame extremamente útil na verificação da saúde animal. Parâmetros hematológicos como a contagem de hemácias (hematimetria), concentração de hemoglobina (Hb), volume globular ou hematócrito (volume ocupado pelas células vermelhas no sangue), a leucometria específica, entre outros, são amplamente utilizados para diagnosticar doenças, incluindo as causadas por exposição a substâncias tóxicas.

As hemácias maduras são as células mais numerosas no sangue e possuem a função de transportar o oxigênio e o gás carbônico, através da hemoglobina presente nestas células. Os leucócitos são as células responsáveis pela proteção do organismo contra corpos estranhos, invasores, como agentes patológicos, por exemplo. Dentre os leucócitos, os linfócitos estão em maior número e suas possíveis funções em peixes são atuar em processo inflamatório, em atividades secretoras e processos fagocíticos. Os neutrófilos estão envolvidos na defesa contra infecções, possuindo um sistema de agentes microbicidas, podendo realizar fagocitose. Os monócitos estão presentes em sangue periférico, e podem migrar até o foco inflamatório, tendo

atividade fagocítica e citotóxica não específica. Os eosinófilos apresentam frequência relativamente baixa no sangue periférico, participando de ações contra processos alérgicos e infecções parasitárias (TAVARES-DIAS, MORAES, 2004).

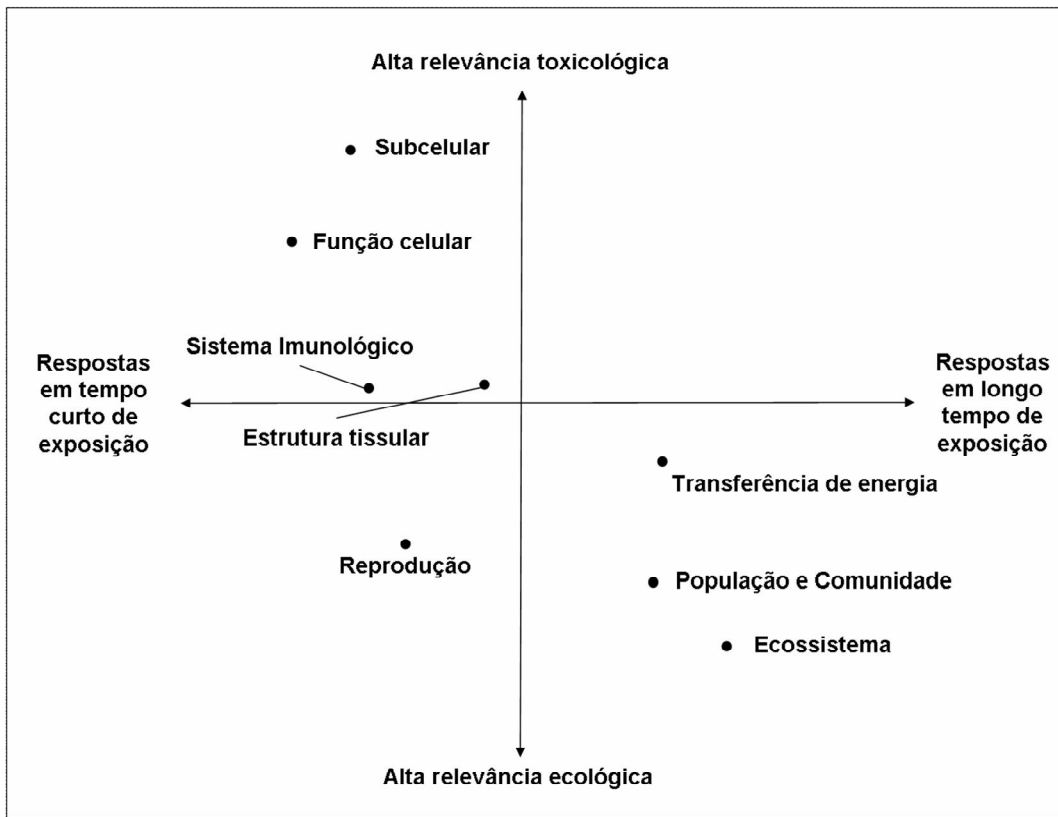


Figura 7. Relevância toxicológica e ecológica e a escala de tempo para aparecimento das respostas biológicas por níveis de organização biológica. Adaptado de Stout, 2003.

Efeitos adversos sobre parâmetros hematológicos foram encontrados por diversos autores (OLSON *et al.*, 1973; GILL, PANT, 1985). BERNTSSSEN *et al.* (2004) constataram alterações significativas na hematologia de peixes da espécie *Salmo salar* alimentados com ração enriquecida com MeHg em concentrações acima de 5 ppm.

CASTILHOS *et al.* (2004a) demonstraram que concentrações de Hg em tecido muscular de tucunarés (*Cichla* sp), coletados na bacia do rio Tapajós, mostraram correlações negativas entre os teores de Hg no músculo e o número de eritrócitos e de leucócitos. Os autores sugeriram um quadro de anemia não

regenerativa e com possível decréscimo tanto na capacidade de oxigenação dos tecidos quanto na capacidade de defesa imunológica destes peixes, pelo decréscimo do número de leucócitos. Uma hipótese seria de que estes efeitos sobre células sanguíneas poderiam ser causados pelo acúmulo de mercúrio no tecido renal, pois nos peixes, este tecido executa a função também de órgão hematopoiético, além de excretor.

Por outro lado, o efeito sobre células sanguíneas parece ser espécie-dependente, pois traíras (*Hoplias malabaricus*) oriundas de área contaminada por mercúrio liberado por atividade de garimpos de ouro (garimpos de São Chico e Creporizinho, na reserva garimpeira de ouro do Tapajós, município de Itaituba-PA), mostraram decréscimo no número de hemácias com o incremento de Hg no tecido, mas em um quadro clínico de anemia classificada como regenerativa, pois não foram observadas alterações na proporção hemácias jovens/hemácias maduras (CASTILHOS *et al.*, 2004b).

O aumento no número de leucócitos e de neutrófilos (tipo leucocitário) em peixes expostos por MeHg foram observados em laboratório, relacionados a danos a tecidos, como necroses de diferentes órgãos (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2006). O MeHg pode estar envolvido na má operação do sistema de *turn over* das células vermelhas (hemácias), induzindo peixes a um estado de anemia (LOHNER *et al.*, 2001; SOUTO, 2004; SILVA, 2004).

Algumas respostas não específicas do peixe a exposição a um estressor químico, contaminante, são migração de leucócitos, alteração na hematopoiese e nos percentuais de hematócrito. O mercúrio inorgânico pode induzir o aumento na produção de neutrófilos e a diminuição de linfócitos (SWEET, ZELIKOFF, 2001).

Outros indicadores de saúde do animal são as atividades de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT) no plasma sanguíneo, utilizados para diagnóstico de uma disfunção hepática de peixes. As atividades dessas enzimas podem se elevar com doenças hepatocelulares graves (CAMPBELL, 2004).

Peixes (*Cyprinus carpio*, *Hyphothalmichthys molitrix*, *Silurus glanis*)

expostos a 5 ppm de herbicida (paraquat) durante uma semana ou a 10 ppm durante 2 horas obtiveram um aumento na atividade das enzimas séricas AST e ALT, refletindo danos hepáticos (DEÉR *et al.*, 1990 e NEMCSÓK *et al.*, 1986 *apud* BAINY, 1995).

A ureia é um composto tóxico tanto quanto a amônia. Ela pode ser retida no organismo, em especial em peixes marinhos, para ajudar no equilíbrio osmótico, relacionado aos íons Na^+ e Cl^- (BONE *et al.*, 1999). Em termos energéticos é cerca de 20 vezes mais produtivo acumular ureia do que tentar excretar o excesso de Cl^- . Um aumento nas concentrações de ureia acima de 5mg/dL nos peixes pode indicar doença de epitélio branquial, pois em peixes, as brânquias parecem ser mais importantes na excreção da ureia do que os rins (CAMPBELL, 2004).

A mensuração de creatinina no plasma sanguíneo de peixe pode ajudar no diagnóstico de doenças ligadas ao rim, visto que a creatinina é formada a partir da creatina, sendo secretada pelos rins. Cerca de 50% dos resíduos de nitrogênio excretados pelo rim estão na forma de creatinina (CAMPBELL, 2004).

Em Silva (2004), os níveis de AST encontrados para tucunarés (*Cichla* sp.) no rio Tapajós foram significativamente diferentes na área controle e na área contaminada, sendo maior na área controle. Já ALT, creatinina e ureia não apresentaram diferenças entre áreas.

Alterações ao acaso na estrutura complexa e em equilíbrio instável do DNA são chamadas de mutagênese, a qual está associada a genotoxicidade, definida como processo causador de danos ao gene. A maioria das mutações não causa problemas às células, mas outras podem prejudicar funções vitais. Em organismos complexos, como os pluricelulares, as mutações podem se expressar em dois níveis: ao nível somático e ao nível hereditário, nas células germinativas. Ao nível somático, algumas mutações estão associadas à indução de câncer. Ao nível hereditário, a alteração do DNA, resultante de mutagênese, é transmitida para os descendentes (KLAASSEN, 1996). Para detecção de genotoxicidade têm sido utilizados alguns métodos, entre eles, o teste de micronúcleo, que detecta mutações cromossômicas. O teste do

micronúcleo (MN) é considerado um dos métodos mais úteis para avaliação de efeitos genotóxicos e clastogênicos devido a exposição a compostos inorgânicos e orgânicos em sistemas aquáticos (CAVALCANTE *et al.*, 2008; MONSERRAT *et al.*, 2007).

Os micronúcleos são formados por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que se perderam durante a divisão celular devido a danos no centrômero ou defeitos na citocinese (HEDDLE *et al.*, 1991 *apud* CAVAS, 2008). Outra alteração nuclear geralmente descrita é o núcleo bilobado (NB). Os mecanismos responsáveis pela sua formação ainda não são muito bem explicados (CAVAS, 2008).

RAMOS *et al.* (2005) associaram a maior frequência de micronúcleos em células sanguíneas de bagres coletados na Baía de Guanabara em comparação a bagres da Baía da Ribeira devido ao estresse do animal sob exposição ambiental, não só por mercúrio, mas por outros xenobióticos presentes na Baía de Guanabara. Resultado similar foi encontrado para *Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus* oriundos do rio Paraíba do Sul e do rio Guandu, onde ambas as espécies coletadas no rio Paraíba do Sul apresentaram maior frequência de micronúcleo (RODRIGUES *et al.*, 2005). Já SOUTO (2004) não observou efeitos genotóxicos em tucunarés da espécie *Cichla* sp. coletados em área de garimpo de ouro em comparação a área não contaminada, ambas na bacia do rio Tapajós. Em bioensaio, NEPOMUCENO *et al.* (1997) encontraram aumento significativo da frequência de micronúcleo em *Cyprinus carpio* expostos a concentrações de mercúrio acima de 20 mg/l de água.

O mercúrio metálico em concentrações maiores que 2 ppm pode induzir danos aos cromossomos, alterar a produção de hemoglobina, causar o decréscimo no número de hemácias e alterações na proporção de tipos de eritrócitos imaturos e produzir anemia (GILL, PANT, 1985; SWEET, ZELIKOFF, 2001).

O efeito tóxico de alguns xenobióticos no sistema nervoso decorre de sua potente capacidade inibitória da acetilcolinesterase (KLAASSEN, 1996). As colinesterases possuem atividade hidrolítica sobre ésteres de colina, estando

entre aquelas com maior velocidade de catálise, limitada tão somente pela velocidade de difusão de seu substrato para dentro do seu sítio catalítico. Esta propriedade permite que estas enzimas sejam responsáveis pela manutenção das concentrações adequadas da acetilcolina, que é liberada pelas terminações nervosas nas sinapses colinérgicas. Também nas placas motoras, região do encontro de axônios com músculos, a acetilcolinesterase tem papel de hidrolisar a acetilcolina. Vários trabalhos demonstram que sua atividade é diminuída em organismos expostos àqueles compostos (ALBUQUERQUE, 2004; LOPEZ-CARILLO, LOPEZ-CERVANTES, 1993).

Sua inibição está ligada a exposição a organofosforados, carbamatos e outros pesticidas (FONSECA *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2007; LAVADO *et al.*, 2006; MORETTO *et al.*, 2004), resultando em um excesso de estímulo nos nervos colinérgicos, conseqüentemente causando alterações na natação dos peixes, tremores e convulsões (FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002; MIRON *et al.*, 2005 *apud* FONSECA *et al.*, 2008). Poucas informações estão disponíveis sobre a inibição desta enzima por exposição ao mercúrio (GILL *et al.*, 1990).

Estudo realizado na Baía de Guanabara com bagres da espécie *Netuma barba* demonstrou que uma isoenzima da colinesterase (butirilcolinesterase – BChE) correlaciona fortemente com os teores de Hg em plasma, sugerindo ser um biomarcador de interesse para investigações futuras, já que a BChE não tem função conhecida no metabolismo dos peixes (RODRIGUES, CASTILHOS, 2003).

Em estudo realizado no rio Paraíba do Sul e no rio Guandu, a atividade de acetilcolinesterase (AChE) apresentou correlação negativa e significativa com a concentração de mercúrio no músculo de *Geophagus brasiliensis* do rio Guandu, que apresentou menores níveis de Hg e maiores atividades da enzima (MUNIZ *et al.*, 2005).

Outro grupo enzimático importante é o das glutatonas. Essa família de enzimas está envolvida na detoxicação de substâncias endógenas e de xenobióticos, tendo um importante papel na proteção de tecidos contra o estresse oxidativo (FOURNIER *et al.*, 1992 *apud* ELUMALAI *et al.*, 2007).

Estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio no balanço pró/antioxidante em favor do primeiro levando à condição de dano potencial da célula, ou seja, durante o metabolismo das células aeróbicas pode haver distúrbios entre a produção das espécies reativas de oxigênio (pró-oxidantes) e da ação de antioxidantes para a inativação dessas (SIES, 1991 *apud* BAINY, 1995).

O grupo das glutations está presente também em eritrócitos, possuem em sua estrutura grupos sulfidríla, aos quais o mercúrio possui alta afinidade. Acredita-se que ao entrar na hemácia, o mercúrio possa permanecer ligado aos grupos sulfidríla presentes nas glutations, inativando seus sítios ativos. Assim, a glutations perderia função.

CARRIER *et al.* (2001) demonstraram que em humanos, a glutations está conjugada ao metilmercúrio e que o aumento da retenção de mercúrio inorgânico pelos rins ocorre quando este está associado a metalotioneína, bem como a glutations (RICHARDSON, MURPHY 1975 *apud* SWEET, ZELIKOFF, 2001).

Trabalhos utilizando fígados de bagres *G. genidens* oriundos do litoral de Santa Catarina, demonstraram que há um aumento da glutations total, glutations redutase e diminuição da glutations redutase e da catalase em peixes de áreas contaminadas (WILHELM FILHO *et al.*, 2001). ARIZA *et al.* (1994) mostraram uma inibição da glutations reduzida em células expostas a altas concentrações de mercúrio Hg^{+2} . Já para o peixe *Danio rerio* a atividade do grupo das glutations no fígado foi incrementada após 63 dias de exposição a metilmercúrio (GONZALEZ *et al.*, 2005).

Adicionalmente, o estudo da histologia de peixes é um biomarcador sensível à poluição aquática, em especial de órgãos-alvo, que podem estar acumulando tanto mercúrio inorgânico quanto orgânico. Ensaio laboratoriais demonstram a relação entre a exposição ao metilmercúrio e a diminuição no sucesso reprodutivo de peixes (SANDHEINRICH, MILLER, 2006), através da redução do desenvolvimento da gônada, inclusive do índice gonadosomático (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2002), do aumento do número de folículos sofrendo apoptose (DREVNICK *et al.*, 2006) e da inibição da produção de testosterona

pelos machos e de estradiol pelas fêmeas, decrescendo o número de ovos (DREVNICK, SANDHEINRICH, 2003). As concentrações de metilmercúrio em ovos estão altamente relacionadas com a alimentação da fêmea, podendo variar juntamente com a variação dos itens alimentares (HAMMERSCHMIDT, SANDHEINRICH, 2005). Verificou-se, também, que o metilmercúrio pode prejudicar a reprodução dos peixes por afetar o desenvolvimento gonadal ou o sucesso de desova nos adultos (WIENER, SPRY, 1996), além de reduzir o sucesso de incubação dos ovos e da sobrevivência dos estágios embrionários (MCKIM *et al.*, 1976; FRIEDMANN *et al.*, 1996; LATIF *et al.*, 2001; HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2002).

BAATRUP *et al* (1986) observaram a formação de centros catalíticos com mercúrio e enxofre no fígado de peixes expostos a cloreto de mercúrio. Alterações histopatológicas em opérculo, fígado e rins também são relatadas (WHO, 1990). Além disso, a intoxicação pelo mercúrio pode provocar em peixes sintomatologia associada a severa diminuição da atividade locomotora, reduzida capacidade de fugir, condição de magreza (esqualidez), lesões no cérebro e morte (TAKEUCHI, 1968 *apud* WIENER *et al.*, 2003).

3.5 ÁREAS DE ESTUDO

Foram estudados dois sistemas aquáticos costeiros do Estado do Rio de Janeiro, com graus de degradação diferenciados, descritos a seguir.

3.5.1 Baía de Guanabara

A Baía de Guanabara é uma das maiores baías do Brasil e está localizada entre as latitudes 22° 40' a 23° 00' S e longitude 43° 00' a 43° 20' O. Segundo (AMADOR 1992; *apud* FARIA, 1997), a Baía de Guanabara passou de um máximo de cerca de 800km² – há 5 – 6 mil anos para 500km² há 3mil anos apresentando atualmente uma área aproximada de 381km², sendo que cerca de 20% de sua superfície já foram tomadas somente pelos aterros neste século. Outras obras como dragagens, drenagens e retificação dos rios, além do desmatamento e a destruição dos manguezais também contribuíram para

que as taxas de assoreamento aumentassem exageradamente de 13,4cm/século (natural) para 24,7cm/século (1849/1922), para 81,2 cm/século (até 1962) e alcançando 435cm/século atualmente (FARIA, 1997).

A profundidade média é de 7,7m, tendo áreas no vão central com profundidades de até 50m. A temperatura média anual é de 23,7°C. O clima quente e úmido sem estação seca definida, com precipitação média de 2.023mm. As correntes marinhas costeiras que entram diariamente na Baía de Guanabara atuam na renovação de oxigênio, na troca e na limpeza das águas da baía. O tempo para renovação de suas águas é cerca de 10 a 20 dias (WASSERMAN *et al.*, 2000). O canal central é considerado o principal controlador dos processos hidrodinâmicos da baía. A variação média da maré na baía é de aproximadamente 0,7m, sendo 1,1m na sizígia e 0,3m na quadratura (KJERFVE *et al.*, 1997 *apud* CAMPOS, 2000). Possui correntes com sentido antihorário, a maré enchente apresenta velocidade máxima de 48cm/s e na vazante 19cm/s ao noroeste da ilha de Paquetá (FARIA, 1997). Possui alta salinidade, com uma média de 29,4±4,8 S, decrescendo da entrada para o interior da baía - 0,4 a 37,1 S (KJERFVE *et al.*, 1997 *apud* CAMPOS, 2000).

A bacia de drenagem da Baía de Guanabara é formada por 24 sub-bacias, com área da bacia tributária de 4.000 Km² (PINTO, 1995). Os rios que deságuam na baía de Guanabara trazem em suas águas cargas de diferentes poluentes. Dentre os rios que mais contribuem com a carga de metais para a baía estão os rios Iguaçu-Sarapuí, Estrela, São João de Meriti e Acari. As vazões médias dos principais rios contribuintes são: Rio Macau, 115,7m³/s; rio Caceribu, 128,5 m³/s; rio Iguaçu, 72,0 m³/s; rio Saracuruna, 23,1 m³/s; rio Surui, 5,9 m³/s; rio Magé, 4,0 m³/s; e rio Iriri, 2,8 m³/s (FARIA, 1997).

FEEMA (1980), atual INEA, relatou a existência de cerca de 29 indústrias que lançavam Cd em seus efluentes diretamente na baía ou em rios que deságuam na baía, cerca de 64 indústrias que lançavam Cu, 21 que lançavam Pb, 104 que lançavam Cr, 100 lançando Zn, 23 lançando Ni e apenas duas grandes fontes poluidoras de Hg (Cortume Carioca e Eletroquímica Pan Americana).

PINTO (1995) apontou como área crítica principal em relação a contaminação por mercúrio a foz do rio São João de Meriti, por causa dos maiores valores encontrados nos sedimentos. Segundo (BARROCAS 1994; *apud* PINTO, 1995), o mercúrio é proveniente do rio Acari sendo transportado através do material em suspensão, e depositado nos sedimentos da foz do rio São João de Meriti ao encontrar condições estuarinas. É no rio Acari que tem desde os anos 50 a eletroquímica Pan Americana, indústria de cloro-soda que utiliza células de mercúrio em seu processo industrial está instalada. Atualmente o processo de produção foi reformulado, diminuindo a quantidade de mercúrio lançada no rio Acari em cerca de 20 vezes.

Em seu interior localizam-se dois grandes portos (Rio de Janeiro e Niterói), dois aeroportos (Internacional do Galeão e Santos Dummont) e quinze terminais de petróleo. O tráfego marítimo na região é intenso (cerca de 3.000 navios por ano) e ocorrem descargas de petroleiros e limpeza de navios. Todos estes fatores têm contribuído de maneira significativa para a degradação de extensas áreas da baía (LACERDA, 1984). A pesca decresceu 90% nos últimos 25 anos e o consumo de peixe, ao contrário, cresceu, sendo o maior do país (23Kg por habitante por ano), segundo reportagem de O Globo, em agosto de 2007.

Os esgotos sanitários contribuem com 75% do volume de poluição orgânica na baía; os despejos industriais com 25%. A costa oeste é a região mais poluída, concentrando a maior parte dos esgotos sanitários. A carga de esgotos domésticos lançada para a baía é de aproximadamente $17\text{m}^3/\text{s}$, sendo equivalente a 465 toneladas diárias (PEREIRA, GOMES, 2002). Estima-se que o carbono orgânico dissolvido seja sempre maior que $11,5\text{mg/L}$ (KEHRIG *et al.*, 1998).

A Baía abriga em seu entorno uma população entre 9 e 10 milhões de pessoas, sendo aproximadamente 71% desta população concentrada na parte oeste do município do Rio de Janeiro e nas cidades vizinhas. Abriga cerca de 10.000 indústrias ao seu redor, as quais são responsáveis pelo lançamento de 4.800 Kg de metais pesados por dia (WASSERMAN *et al.*, 2000). Apresenta também a aceleração do processo erosivo de suas encostas devido ao

desmatamento e posterior ocupação desordenada do solo.

Apesar da liberação de metais para a baía são encontradas baixas concentrações de mercúrio na biota. Entretanto, CAMPOS (2000) observou através da aplicação do IREP (Índice de Risco Ecológico Potencial) que apesar do elevado estado trófico da baía reduzir o risco ecológico potencial da contaminação por metais, mesmo com as altas concentrações encontradas em sedimentos, o Hg e o Cd representam os maiores riscos para a biota da baía em relação a exposição a metais.

Além das fontes poluidoras já citadas, destaca-se a influência de vazadouros de lixo localizados às margens de rios contribuintes ou da própria baía, como o antigo lixão, atual aterro controlado de Gramacho, que em 1990, o INEA já estimava um escoamento de chorume para a baía numa vazão média de 800m³/dia, com carga orgânica de 4 toneladas por dia, equivalente à contribuição de uma população de 75.000 habitantes (FEEMA, 1991).

BRAGA (1988) utilizou imagens de satélite Landsat-5 e NOAA-9 para identificar parâmetros físico-químicos da água da Baía de Guanabara, levando em consideração: total de sedimentos em suspensão (TSS), temperatura, clorofila a, Fe e Mn no TSS, salinidade e profundidade da camada eufótica. A escala utilizada foi de 1:50.000. Neste estudo foi observado que em situação de maré alta ocorre dominância de água do mar e os principais fatores de influência na variabilidade dos parâmetros estudados de origem marinha.

CRUZ *et al.* (1998) utilizaram um sistema de informação geográfica (SIG) juntamente com um índice de transformação antrópica do meio de Lèmechev, estudando a influência das cargas de poluentes oriundas dos rios afluentes na baía de Guanabara, o que facilitou uma visão integrada e espacial da área. Outro trabalho interessante sobre possíveis contribuições da bacia de drenagem para a baía, foi realizado por PEREIRA e colaboradores (2007). Foram encontrados altos níveis de matéria orgânica e de metais pesados em materiais depositados sobre as rodovias, sendo estas consideradas fontes menores, mas potenciais de poluição para os sedimentos costeiros da Baía de Guanabara.

Segundo relatórios do INEA, antiga FEEMA, de 1980, 1982 e MOSCA 1980, as concentrações de mercúrio na água e no sedimento da Baía de Guanabara eram em torno de $0,6 \pm 1,1 \mu\text{g/L}$ e de $93,8 \pm 226,4 \mu\text{g/g}$, respectivamente. KJERFVE (1994), em relatório para Japan International Cooperation Agency demonstrou que as concentrações de Hg em água na estação seca eram em torno de $1,6 \mu\text{g/L}$ na água superficial e $0,1 \mu\text{g/L}$ na água de fundo. Considerando os padrões de qualidade para sedimento oriundo de águas salinas/estuarinas para dragagem nível 1, $0,15 \text{ mg/Kg}$ (limiar abaixo do qual se prevê baixa probabilidade de efeitos adversos à biota) e nível 2, $0,71 \text{ mg/Kg}$ (limiar acima do qual se prevê um provável efeito adverso à biota), as amostras de sedimento da baía de forma geral ultrapassariam tais limites (Resolução CONAMA, 344).

WASSERMAN *et al.* (2000) demonstraram que há uma grande variação nas concentrações de mercúrio em sedimento ao longo da baía, indo de 51 ng/g a 37.200 ng/g perto do rio São João de Meriti. MACHADO *et al.* (2004) sugeriram que os sulfetos ácidos voláteis exercem um papel importante na retenção de metais na parte oeste da Baía de Guanabara e que o potencial de retenção é muito alto.

PINTO (1995) encontrou valores de $0,03\text{-}37,18 \text{ mg/kg}$ para mercúrio total em sedimentos do estuário do rio São João de Meriti e de $0,12\text{-}0,22 \text{ mg/kg}$ em sedimentos do manguezal de Guapimirim. No testemunho, nos primeiros 11cm, as concentrações variaram entre $0,05$ e $10,74 \mu\text{g/g}$. Pela extração seqüencial, esse trabalho observou que na foz do rio São João de Meriti, o mercúrio está predominantemente ligado a material orgânico (80%), sendo os outros 20% distribuídos igualmente entre ligações com ácidos húmicos e com a formação de sulfetos nas camadas mais superficiais dos sedimentos – até 10cm.

Comparativamente, o padrão de distribuição das concentrações de metais não foi muito alterado através dos anos. Na maioria dos casos, as amostras com maiores concentrações estão localizadas mais ao fundo da baía, refletindo a alta contribuição dos rios e do continente, bem como do regime de circulação das águas (Figura 8) da baía.

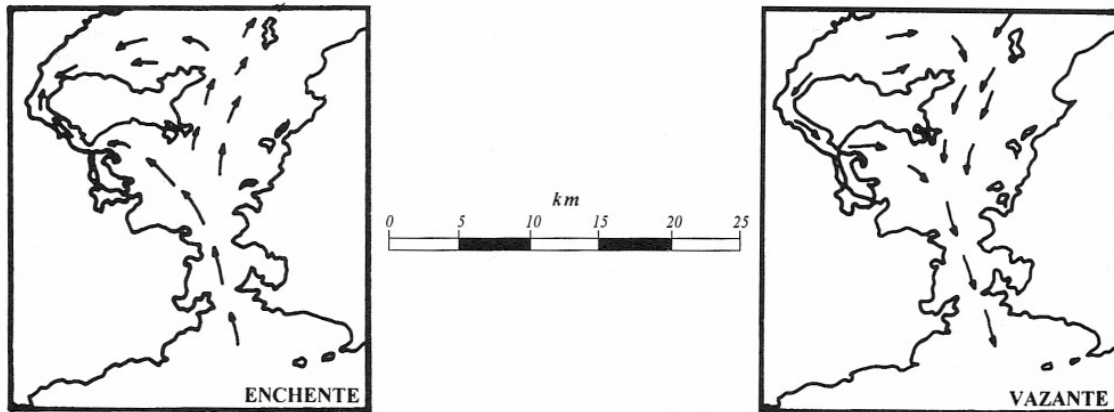


Figura 8. Circulação de águas na Baía de Guanabara (AMADOR, 1980 *apud* BARROCAS, WASSERMAN, 1995).

MAYR *et al.* (1989) dividiu a baía de Guanabara em cinco setores de acordo com o grau e o tipo de contaminação encontrado nessas subáreas (Figura 9). O setor 1, possui uma troca mais efetiva de água, o setor 2, possui forte poluição orgânica, o setor 3 possui maior influência de esgotos domésticos e industriais, poluição por óleo e presença de estaleiros, o setor 4 é área de abrangência da APA de Guapimirim, considerada como a área menos contaminada da baía e o setor 5, área com influência de vários tipos de poluentes e reduzida circulação.

ABREU (2009) aplicou o índice chamado tríade de qualidade de sedimento para avaliar o cenário atual da contaminação por metais na Baía de Guanabara e as possíveis consequências dessa contaminação à biota aquática. As áreas mais degradadas da baía segundo este índice foram o interior da baía, próximo aos rios Iguaçu e Estrela, e a área com menor risco foi a enseada de Jurujuba.

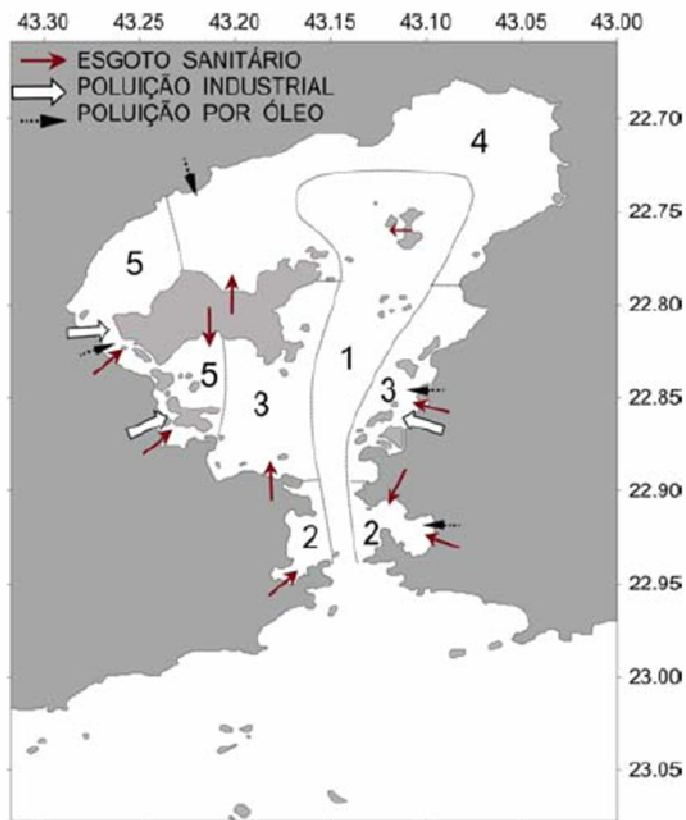


Figura 9. Setores da Baía de Guanabara, estipulados por Mayr *et al.*, 1989, considerando o grau e o tipo de contaminação de subáreas da baía.

3.5.2 Baía da Ribeira

A Baía da Ribeira está localizada entre as latitudes 22°55' a 23°02' S e longitudes 44°18' a 44°26' O, porção oeste da Baía de Ilha Grande (Figura 10), cobrindo uma área de aproximadamente 172 km² (LIMA, 1985). É um corpo de água salgada semiconfinado. A Baía da Ilha Grande apresenta-se entrecortada pelo relevo da Serra do Mar com fortes inclinações cujas vertentes limitam-se com as planícies litorâneas interpenetrando-se os estuários, enseadas e lagoas. As profundidades estão em torno de 7 a 21 metros (LIMA, 1985). A bacia de drenagem é composta pelos rios Frade, Bracuí, Grataú, Imbuí, Jurumirim, Gamboa, Ariró e Japuíba.

O clima na região, determinado a partir da única estação meteorológica da região, é tropical úmido sem déficit hídrico. A temperatura média anual é de

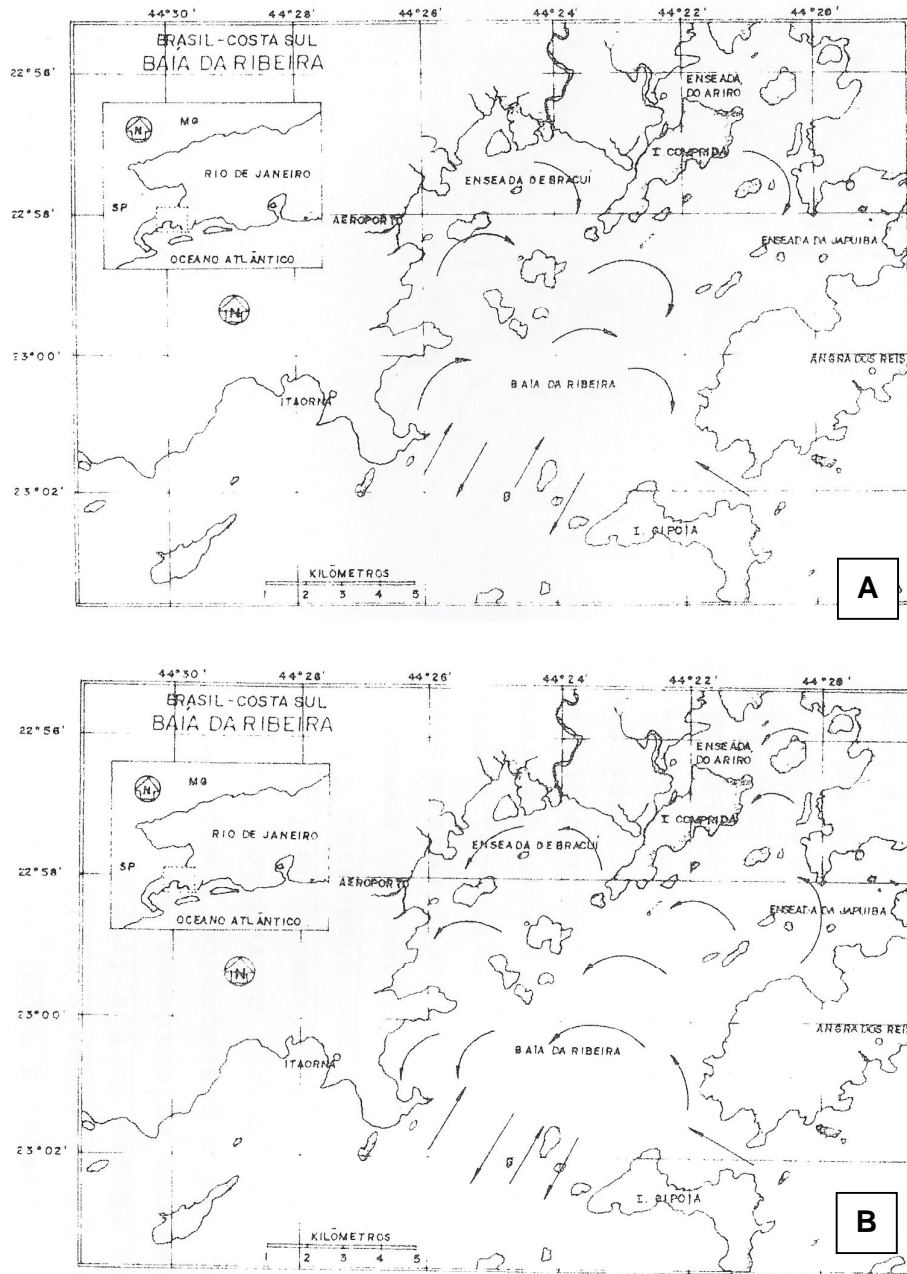


Figura 10. Circulação de águas na Baía da Ribeira em tempo bom (A) e em entradas de frente fria de pós-frontal (B). Fonte: Lima, 1985.

22,5°C com precipitação média anual de 2.240 mm sendo janeiro o mês mais chuvoso com 293 mm e junho, julho e agosto os meses mais secos, com média de 87 mm (ANDREATA *et al.*, 2002). As enseadas da Ilha Grande vem sofrendo impactos decorrentes da exploração turística nos últimos 10 anos,

mas até 2001 ainda não apresentam fontes pontuais de carga orgânica e de metais (CARDOSO *et al.*, 2001).

O efeito de maré é minimizado na região, mesmo em sizígias, pois a Ilha Grande está localizada na entrada da Baía da Ribeira, dividindo as correntes de maré em duas vertentes (LIMA, 1985). A amplitude média da maré é de 0,68 m, sendo do tipo semidiurno.

Na Baía da Ribeira e dentro das enseadas a circulação é bem definida segundo o regime de ventos, sendo destrógera quando dos ventos de tempo bom e sinistrógera quando dos ventos de pós-frontal, situação esta que pode remobilizar sedimentos de fundo e transportá-los. Outra causa de remobilização de sedimentos de fundo são chuvas torrenciais comuns na região em passagens de frente fria (LIMA, 1985). Essas correntes são mais atuantes durante o inverno devido a maior frequência das frentes frias.

Aproximadamente 119 mil pessoas ocupam áreas na bacia de drenagem da baía da Ribeira, levando-se em consideração somente o município de Angra dos Reis (IBGE, censo de 2000). A mais conhecida atividade antropogênica na área é o complexo de usinas termoeletricas Angra I e II, com a construção da terceira em andamento. As águas utilizadas para resfriar os reatores dessas usinas são lançadas no Saco de Piraquara de Fora (estação 4), área que apresenta temperaturas de água superficial e fundo relativamente mais altas que as outras áreas da baía (até 35°C) (ANDREATA *et al.*, 2002). No entanto, nos últimos anos houve um aumento do tráfego de navios e outras embarcações na região do porto de Angra, aumentando juntamente a utilização de tintas anti-incrustantes.

A Enseada do Bracuí e a Enseada do Ariró são definidas como zonas de aporte continental. O Canal da Ilha da Gipóia é definido como a entrada de águas, constituindo um vetor hidrodinâmico de possíveis transferências de materiais sedimentares para o exterior da baía. Os sedimentos da Enseada do Ariró e da Enseada do Bracuí apresentam maiores concentrações de matéria orgânica, sendo teoricamente os mais capazes de reter metais (FIORI, 2008).

Essa área vem sendo considerada como referência para contaminação

mercurial devido às baixas concentrações de mercúrio (28 a 53 ng/g) e de outros metais importantes como o Cd, Cu e Pb, em sedimento superficial (CARDOSO *et al.*, 2001; LACERDA *et al.*, 1982). Trabalhos mais recentes demonstraram que as concentrações de mercúrio, apesar de terem aumentado, continuam baixas (59 a 73 ng/g), próximas ao nível pré-industrial (50ng/g) (FIORI, 2008).

Todavia, para metais como o zinco, o aumento foi evidente, onde em LACERDA *et al.* (1982) foram reportadas concentrações entre 1,1 a 14ppm e atualmente em FIORI (2008), concentrações entre 102 a 120ppm. Este fato pode ser explicado pela recente ocupação por residências na bacia de drenagem, aumentando o lançamento de zinco significativamente. Idem para o cromo, que saiu de uma faixa de 3,5 a 17,8ppm para 22 a 33ppm. Outros elementos importantes em relação ao monitoramento de suas concentrações na região são o Cu e o Pb.

Sobre contaminação da biota foram poucos os estudos realizados na região. RAMOS *et al.* (2004) analisaram corvinas de 5 estações de coleta diferentes dentro da baía da Ribeira, encontrando concentrações de Hg abaixo de 200ng/g, nível este considerado como natural para peixes de áreas não contaminadas. RODRIGUES (2006) analisou três espécies de peixes no local e observou a mesma tendência, exceto para a cocoroca *Haemulon steindachneri*, que apresentou concentrações acima de 500ng/g para alguns espécimes. FIORI (2008) avaliou a acumulação de mercúrio em invertebrados bentônicos e encontrou concentrações baixas para *Anomalocardia brasiliiana* (28ng/g; 65% de metilmercúrio) e para poliquetas (32,3ng/g).

GUIMARÃES e colaboradores (1982) avaliaram as concentrações de metais em algas bentônicas do Saco de Piraquara de Fora, mas não determinaram as concentrações de Hg. Os metais avaliados apresentaram concentrações na mesma ordem de magnitude das encontradas em sedimentos da região.

3.6 ESPÉCIES DE PEIXES ESTUDADAS

Para o presente trabalho foram estudadas três espécies de peixes ósseos (Actinopterygii, Teleostei), pertencentes a duas ordens e famílias diferentes. São espécies presentes durante o ano inteiro e bem distribuídas ao longo das áreas estudadas. A classificação taxonômica das espécies estudadas pode ser observada na figura 11, incluindo a classificação da espécie utilizada somente para a realização de ensaios em laboratório.

Domínio: Eukariota
Reino: Animalia – Metazoa
Bilateria
Deuterostomia
Filo: Chordata
Craniata
Vertebrata
Sub-Filo: Gnathostomata
Euteleostomi
Osteichthyes
Classe: Actinopterygii
Neopterygii
Halecostomi
Teleostei
Superordem: Ostariophysii
Ordem: Siluriformes
Família: Ariidae
Gênero: Aspistor
Espécie₁: <i>Aspistor luniscutis</i>
Gênero: Genidens
Espécie₂: <i>Genidens genidens</i>
Superordem: Acanthomorpha
Acanthopterygii
Percomorpha
Ordem: Perciformes
Subordem: Percoidei
Super-Família: Percoidea
Família: Haemulidae
Gênero: <i>Haemulon</i>
Espécie₃: <i>Haemulon steindachneri</i>
Subordem: Labrodei
Família: Cichlidae
Sub-Família: Astronotinae
Gênero: <i>Astronotus</i>
Espécie₄: <i>Astronotus ocellatus</i>

Figura 11. Classificação taxonômica das espécies estudadas (NELSON, 2006).

Os bagres são peixes demersais (AZEVEDO, 1999; LOWE-MCCONNELL, 1999) de importância comercial relativamente alta e têm como habitat, em vida adulta, águas salinas; na época da desova buscam regiões lagunares/estuarinas. Algumas espécies só vivem em água doce. Com relação à reprodução, apresentam cuidado parental, onde o macho geralmente guarda os ovos dentro da boca até a eclosão. No presente trabalho, as espécies de bagres estudadas foram *Genidens genidens* e *Aspistor luniscutis*, ambas pertencentes à Ordem dos Siluriformes, Família Ariidae.

A espécie *Genidens genidens* (Cuvier, 1829) (Figura 12) é muito comum no Brasil, aparecendo em grande número nos estuários e lagoas estuarinas. Penetra rio acima por quilômetros. Quando jovens formam cardumes muito grandes. Seu tamanho máximo registrado é de 35 cm (CARVALHO-FILHO, 1999). Segundo CHAVES, VENDEL (1996), essa espécie não é essencialmente carnívora, apesar de ainda não se saber a importância energética dos vegetais na alimentação. Fazem parte dos itens alimentares da espécie: algas e vegetais superiores, crustáceos (Decápodes, Amphipoda, Copépoda, Isópoda), moluscos (bivalves e gastrópodos), poliquetas (Nereidae e Glyceridae) e peixes (CHAVES, VENDEL, 1996). A espécie *Aspistor luniscutis* (Valenciennes, 1840) (Figura 13) tem tamanho máximo registrado é de 1,2 m de comprimento (SANTOS, 1982) e seu hábito alimentar e habitat são similares a *Genidens genidens*.

A espécie *Haemulon steindachneri* (JORDAN E GILBERT, 1882) (Figura 14), pertence a Ordem Perciformes, Família Haemulidae. Pode viver em uma variedade de ambientes, até mesmo em baías, praias abertas e águas salobras, com preferência por fundos rochosos, coralinos ou em áreas de areia/cascalho próximas da costa. Podem formar cardumes migratórios quando em época de reprodução (meses mais quentes do ano). Os jovens se alimentam de zooplâncton e os adultos de invertebrados bênticos, peixes e algumas algas (CARVALHO-FILHO, 1999). Seu nome popular, cocoroca, advém dos sons emitidos pelo peixe como um ronco, comuns a todas as espécies desse gênero. Esse ronco ocorre devido ao atrito dos ossos da faringe, que ressoam pela bexiga natatória. Não possui valor comercial,

contudo sua pesca é muito comum (SANTOS, 1982). Na Baía de Guanabara não foi possível identificar os espécimes de cocoroca em nível de espécie, somente de gênero, pertencendo ao mesmo gênero, *Haemulon*.



Figura 12. Vista lateral do bagre *Genidens genidens* coletado na Baía da Ribeira, RJ.



Figura 13. Vista lateral do bagre *Aspistor luniscutis* coletado na Baía da Ribeira, RJ.



Figura 14. Vista lateral da cocoroca *Haemulon steindachneri* coletada na Baía da Ribeira, RJ.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGENS

Os peixes foram coletados utilizando arrasto-de-fundo de porta em profundidades variáveis de acordo com a área de estudo (Baía de Guanabara, em média 5m de profundidade, na Baía da Ribeira, 6m), com uma rede de 10,5m de comprimento, 4,5 m de boca, 3,5 m de asa, com malha de 20 mm no corpo da rede e de 15 mm no fundo do saco, rebocada por uma traineira durante 30 minutos, a aproximadamente 2 nós, seguindo a metodologia utilizada em ANDREATA, MORAES (1994).

Na figura 15 podem ser observadas as localizações e as estações de coleta das duas áreas de estudo. Na baía da Ribeira foram realizadas duas campanhas (19/08/09 e 24/08/09) e em cada uma delas foram coletados peixes em 4 estações (Figura 5). A estação 1 (22°58'22.76"S; 44°19'23.01"O) localiza-se na Enseada da Japuíba, a nordeste da Baía de Ribeira, possuindo um extenso manguezal; a estação 2 (22°56'35.76"S; 44°20'42.43"O) localiza-se na Enseada do Ariró e Imbu, a estação 3 (22°57'45.04"S; 44°23'23.82"O) está a oeste, na Enseada do Bracuí, próximo ao Rio Bracuí, conta com a presença de manguezal; a estação 4 (23°00'38.47"S; 44°25'53.76"O), Saco Piraquara de Fora, a sudoeste da Baía da Ribeira, que recebe as águas de resfriamento da Usina Nuclear de Angra (ANDREATA *et al.*, 2002). Foram coletados no total 211 peixes de 3 espécies: 120 espécimes de *Genidens genidens*, 38 espécimes de *Aspistor luniscutis* e 53 espécimes de *Haemulon steindachneri*.

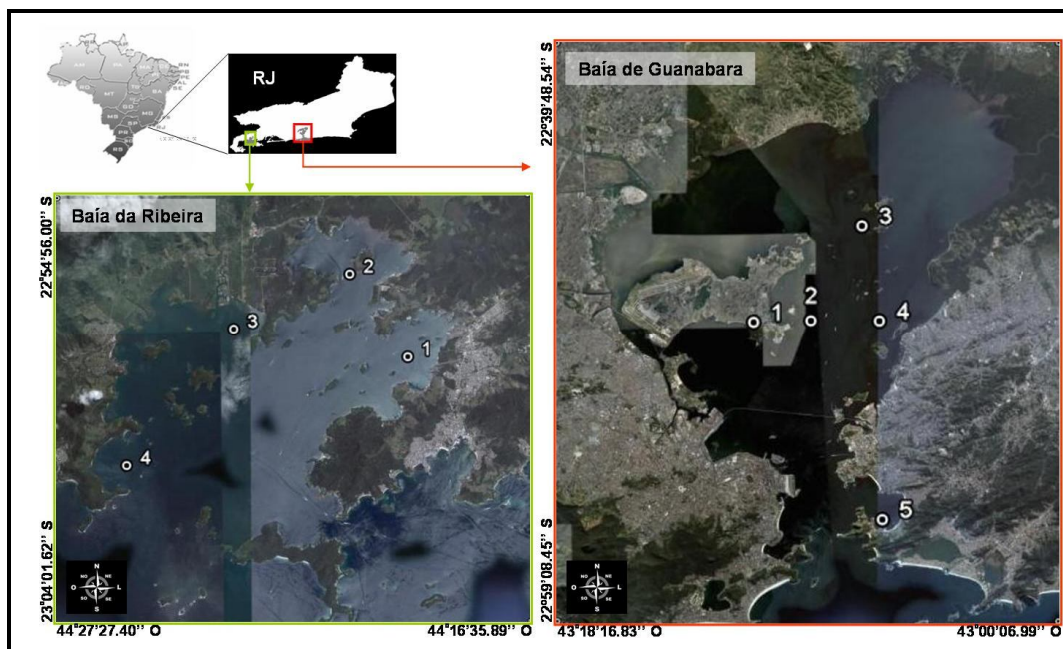


Figura 15. Mapa de localização das áreas de estudo (Baías da Ribeira e de Guanabara, Rio de Janeiro) e dos respectivos pontos de coleta.

Na baía de Guanabara foram realizadas 4 campanhas (19/03/08, 11/02/09, 13/05/09 e 05/08/09), em cinco estações (Figura 5): a estação 1, Praia da Bica ($22^{\circ}49'7.71''\text{S}$; $43^{\circ}11'8.24''\text{O}$) e a estação 2, Praia da Ribeira ($22^{\circ}49'4.83''\text{S}$; $43^{\circ}09'3.72''\text{O}$), estão próximas a Ilha do Governador; a estação 3, Ilha de Paquetá ($22^{\circ}45'54.68''\text{S}$; $43^{\circ}07'12.87''\text{O}$); a estação 4, Gradim ($22^{\circ}49'5.33''\text{S}$; $43^{\circ}6'35.08''\text{O}$), perto de São Gonçalo; e a estação 5, Enseada de Jurujuba ($22^{\circ}55'44.11''\text{S}$; $43^{\circ}06'28.50''\text{O}$), local mais próximo a embocadura da baía. Foram coletados um total de 132 peixes sendo 65 espécimes de *Genidens genidens* e 67 espécimes de *Haemulon* sp.. Não foram amostradas áreas no interior da baía, pois a profundidade é baixa e a pesca por arrasto se torna inviável.

4.2 AMOSTRAS DE SANGUE

A amostra sanguínea foi obtida promovendo-se a contenção e posicionamento do animal para punção venosa caudal (Figura 16), utilizando seringas de 1 ou 3 mL e agulhas de diferentes calibres, de acordo com o

tamanho do animal (calibres 13 x 4,5; 25 x 6; 20 x 5,5), previamente rinsadas com anti-coagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (CAMPBELL, 2004). Foi coletado em média 1mL de sangue de cada espécime. Após a punção, as amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf de 1,5mL ou em tubos criogênicos de 3,5mL (quando o volume amostrado foi maior que 1mL) e acondicionadas em refrigeração até a chegada em laboratório. Em laboratório, essas amostras foram mantidas congeladas ou somente refrigeradas, dependendo da análise futura a ser realizada.



Figura 16. Coleta de sangue por punção venosa caudal em bagre *Genidens genidens*, coletado na Baía de Guanabara, RJ.

4.3 BIOMETRIA E AMOSTRAGEM DE ÓRGÃOS INTERNOS

A retirada das amostras de músculo foi realizada no Laboratório de Hidrobiologia e Pesca, localizado na Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense (UFF) de acordo com a metodologia sugerida por “Standard Methods” (EATON *et al.*, 1998), onde se é retirado o músculo presente na parte dorsal superior do animal. Também foram retiradas amostras de fígado, gônada, conteúdo estomacal e rim, cortando a cavidade ventral do

peixe a partir do ânus, com posterior identificação visual dos órgãos internos e retirada dos mesmos com ajuda de bisturis e tesouras (Figura 17).

Quaisquer alterações na coloração do fígado e do rim foram anotadas. Itens alimentares visíveis a olho nu, observados em estômagos cheios, também foram anotados. Os animais foram classificados de acordo com o estágio de vida (jovens ou adultos) e de acordo com o sexo (macho ou fêmea), de acordo com características morfológicas das gônadas, descritas por VAZZOLER (1981).

O comprimento total (da boca até o fim da nadadeira caudal), o comprimento padrão (da boca até o início da nadadeira caudal), ambos dados em cm, e o peso, dado em gramas, foram medidos em laboratório, após descongelamento dos peixes.

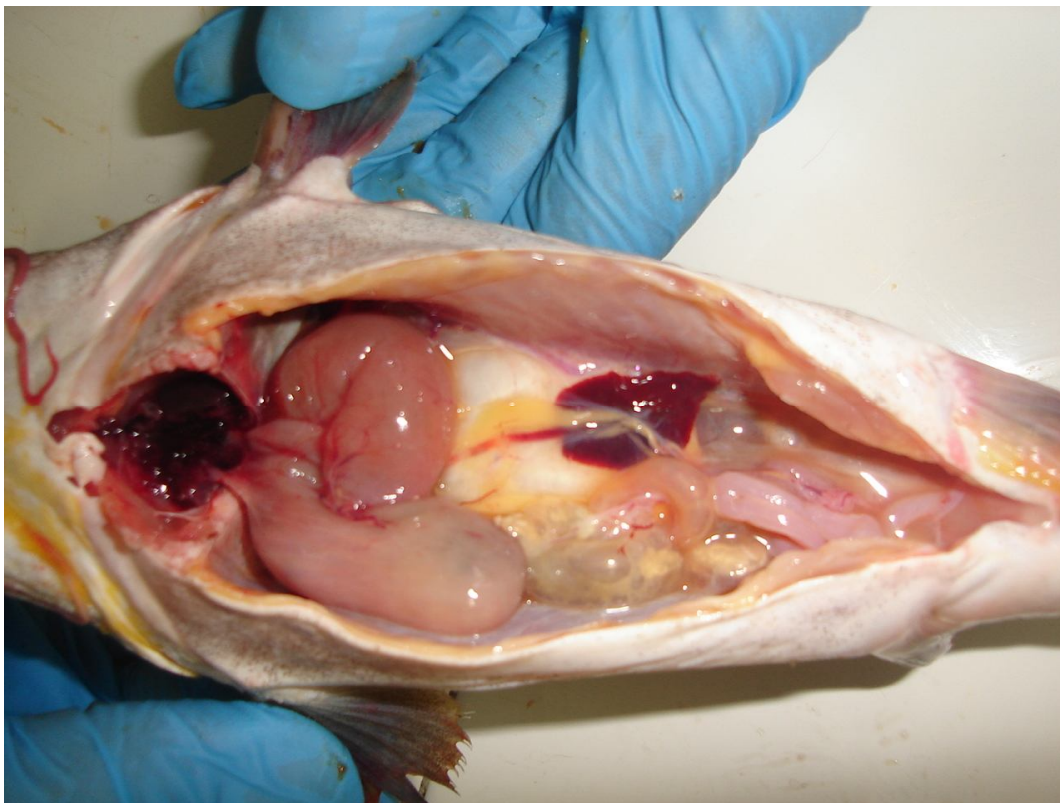


Figura 17. Dissecação dos espécimes de peixes coletados. Parte ventral de um espécime de bagre *A. luniscutis* após abertura com tesoura a partir do ânus.

4.4 DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL

A determinação de Hg total foi realizada no Laboratório de Especificação de Mercúrio Ambiental, no Centro de Tecnologia Mineral, RJ. Foi utilizado um aparelho de absorção atômica portátil (LUMEX), específico para análises de Hg total por espectrofotometria. Em associação com um reator de pirólise, o equipamento trabalha de acordo com o princípio da destruição térmica da amostra seguida pela determinação da quantidade de vapor de mercúrio. Não há necessidade de preparação prévia da amostra, somente homogeneização. Utiliza pequena massa de amostra por replicata, o que viabilizou as determinações em sangue, visto que as amostras possuíam pouca massa.

As amostras úmidas de músculo, fígado, gônadas e rins dos peixes estudados foram homogeneizadas. As amostras de conteúdo estomacal permaneceram em estufa a 40°C por 20h para secagem, sendo maceradas para homogeneização logo após esse período. As concentrações de Hg total encontradas para o conteúdo estomacal foram convertidas em peso úmido para poderem ser comparadas com as outras matrizes. As amostras de sangue foram centrifugadas a uma rotação de 3.000 rpm por 10 minutos para a separação em hemácia e plasma – matrizes a serem analisadas. Uma massa em torno de 0,03g foi utilizada para cada replicata, sendo que para cada amostra foram feitas triplicatas. No caso das amostras de hemácia e de plasma, foram realizadas apenas duplicatas, vide a pouca massa disponível.

Para verificar a acuracidade do equipamento, análises de amostras certificadas (IEAE 407, com concentração igual a 222ng/g) eram realizadas ao início de cada dia de análise, com um erro aceitável de 10%. O limite de detecção do equipamento para amostras sólidas é de 5 ng/g (EGLER *et al.*, 2004). Foi encontrada uma média de 218,4±14,3 ng/g (n=90), resultando em um erro de 1,8%, ou seja, 98,2% de precisão. Em resultados na intercalibração internacional do IAEA (International Atomic Energy Agency), as determinações de mercúrio total obtiveram erro menor que 10%.

4.5 DETERMINAÇÃO DE METILMERCÚRIO

As determinações foram realizadas no Laboratório de Especificação de Mercúrio Ambiental, no Centro de Tecnologia Mineral, RJ. Uma massa de 0,5g da amostra homogeneizada foi pesada em tubos de centrífuga de 50ml, com tampa rosqueada, provida de septo de teflon, com posterior adição de 10ml de solução de KOH-EtOH 1N. Os tubos permaneceram em banho-maria (~100°C) por 1 hora, agitando-os a cada 15 minutos, aproximadamente. Após o resfriamento em temperatura ambiente, adicionou-se em cada tubo, 10ml de HCl 1N, 2ml de EDTA (-4Na) 20% e 5ml de n-hexano, sendo agitados por 5 min em “*shaker*” a velocidade de 300 rpm para promover a extração do material gorduroso para a fase de hexano e para complexar metais interferentes com o EDTA. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 4 min e a camada superior (orgânica) foi retirada por sucção a vácuo, utilizando pipeta Pasteur. À camada aquosa, adicionou-se 10ml de solução purificada de ditizona em tolueno 0,01%, agitando por 5 min em *shaker*, nas mesmas condições anteriores, com posterior centrifugação a 2.500 rpm por 4 min, sendo descartada a camada aquosa inferior por sucção. À fase orgânica, adicionou-se 4ml de NaOH 1N, agitou-se por 5 min e centrifugou-se a 2.500 rpm por 4 min, com posterior descarte da camada aquosa inferior. Repetiu-se a lavagem com NaOH 1N, com nova centrifugação após a segunda extração. Em tubos de centrífuga de 10ml, com fundo cônico e tampa de vidro esmerilhado, previamente lavados com benzeno ou tolueno, adicionou-se 2ml de solução de Na₂S 5ppm e 5ml de amostra, cuidando para que a alíquota seja retirada da superfície, sem tocar no fundo dos tubos. Essas amostras foram novamente agitadas por 3 minutos e centrifugadas a 1.500 rpm por 4 min, com posterior descarte da camada orgânica superior. À fase aquosa, adicionou-se 2ml de tolueno para lavagem, com agitação por 3 min e centrifugação a 1.500 rpm por 4 min.

Verificou-se em tubo teste, a quantidade de gotas necessárias de HCl 1N para neutralizar 2ml de Na₂S, utilizando 2 gotas de ditizona com indicador (laranja). O ponto de viragem é azul. Assim, adicionou-se lentamente em cada tubo, a quantidade acima determinada de HCl 1N, com borbulhamento em ar

sintético ou N_2 (50ml/min) nas amostras por 3 min. Adicionou-se 2ml de solução tampão *Walpole's Buffer* pH 3 e 0,5ml de solução purificada de ditizona em tolueno, com agitação por 3 min e centrifugação a 1.500 rpm por 4 min, com descarte posterior da camada inferior (aquosa) por sucção. Lavou-se a camada orgânica remanescente com 4ml de NaOH 1N para remover o excesso de ditizona, com agitação por 3 min e centrifugação a 1.500 rpm por 4 min, com descarte posterior da camada aquosa. A lavagem com NaOH 1N foi repetida. À camada orgânica, adicionaram-se 2 gotas de HCl 1N, sendo homogeneizado em vortex. Retirou-se a camada inferior (HCl), cuidadosamente com pipeta *Pasteur* e micropera para injeção no cromatógrafo gasoso com detector de elétrons modelo G-6.800 P-EC G, da YANAKO Analytical Instruments.

Para verificar a acuracidade do equipamento, análises de amostras certificadas (IEAE 407, com concentração igual a 200ng/g) eram realizadas ao início de cada dia de análise, com um erro aceitável de 10%. O limite de detecção do equipamento para amostras sólidas é de 2 ng/g. Foi encontrada uma média de $184,3 \pm 6,9$ ng/g (n=5), resultando em um erro de 7,8%, ou seja, 92,2% de precisão. Em intercalibração internacional do laboratório pela IAEA (International Atomic Energy Agency), o erro encontrado para as determinações de metilmercúrio foi menor que 5%.

4.6 ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E NITROGÊNIO

As composições elementar (C e N) e isotópica ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) foram determinadas em amostras de músculo de peixes para determinação do estado trófico das espécies estudadas, no Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo (CENA-USP). Após secagem a 60°C por 24h, as amostras foram maceradas com pistão e grau para formação de sólidos finos, armazenados em tubos eppendorf 1,5mL, posteriormente enviados para o CENA. Segundo o método, essas amostras foram expostas a uma temperatura de 1.020°C sob atmosfera de oxigênio puro, e os gases gerados por condutividade térmica (CO_2 e N_2O) foram carreados através de uma coluna cromatográfica pelo analisador elementar Perkin-Elmer 2.400 acoplado ao espectrômetro de massas Finigan Delta Plus, para a

detecção. A quantificação foi realizada por comparação com padrão externo Pee Dee Belemnite (PDB).

4.7 MICRONÚCLEO

Para a contagem da frequência de micronúcleos foram utilizados esfregaços sanguíneos, feitos em lâminas lisas. Os esfregaços foram fixados em metanol e corados com GIEMSA durante 30 minutos para posterior visualização em microscopia óptica em lente de imersão (1.000x). Foram contadas as ocorrências de micronúcleo e núcleo bilobado em 1.000 eritrócitos para cada espécime. Foi classificado como micronúcleo, todo fragmento pequeno, não refratário, de mesma cor e aparência do núcleo, de áreas do esfregaço com células intactas. Como núcleo bilobado, núcleo de eritrócitos em forma de feijão. A contagem foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica, da Faculdade de Medicina Veterinária, da UFF.

4.8 HEMOGRAMA

Os hemogramas foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica, na Faculdade de Medicina Veterinária, UFF, segundo Almosny, Santos (2001), no qual todos os tipos celulares estão presentes na câmara de *Neubauer improved*, onde se procede a contagem de eritrócitos, trombócitos e leucócitos.

Foram analisados os seguintes parâmetros: eritrograma, leucograma, bioquímica sérica e proteína plasmática total. O eritrograma consiste na determinação do número de eritrócitos ou hematimetria (H), hemoglobinometria (Hb) e hematócrito ou volume globular (VG) de cada amostra. A hematimetria (contagem do número de eritrócitos por mm^3 de sangue) foi feita a partir da diluição de 10 μl de sangue em 1 ml de soro fisiológico para posterior contagem em câmara espelhada de *Neubauer improved*. Foram contados os eritrócitos contidos em 5 quadrados menores dentro do quadrado central maior. O resultado obtido foi multiplicado pelo fator de correção (5.000) e a resposta expressa em eritrócitos/ mm^3 .

O volume globular foi obtido utilizando-se a técnica de microhematócrito em tubos capilares, onde o sangue é inserido em pequenos capilares e submetido a centrifugação (12.000rpm/5min). O percentual do volume ocupado pelas hemácias no sangue é dado pela leitura dos capilares em régua para microhematócrito. O volume globular médio (VGM) foi calculado aplicando-se a fórmula $VG \times 10/H$. A hemoglobinometria foi realizada através de “kits” comerciais Labtest®. O método consiste na reação do Ferro presente na hemoglobina com ferricianeto (5 minutos de reação), formando o cianeto de hemoglobina, medido a 540nm em espectrofotômetro (Bioplus 200) A concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foi calculada aplicando-se a fórmula $Hb \times 100/VG$.

A proteína plasmática total (PPT) foi realizada em refratômetro, sendo o plasma separado através da centrifugação do sangue em capilares por 5 minutos. O resultado obtido é expresso em g/dl.

A leucometria global (contagem do número de leucócitos, incluindo trombócitos, por mm^3 de sangue) foi feita a partir da mesma diluição usada para hematimetria, com contagem em câmara de *Neubauer improved* espelhada. A contagem e o fator de correção são idênticos aos descritos para a hematimetria. Os valores foram expressos em leucócitos/ mm^3 (ALMOSNY, SANTOS, 2001). Para diferenciação entre leucócitos e trombócitos, foram contados os trombócitos que apareciam durante a contagem de 100 leucócitos em esfregaços corados em Giemsa, determinando o número específico de leucócitos e de trombócitos dentro do valor de leucometria global.

A leucometria específica foi realizada através da identificação visual dos tipos leucocitários, em microscopia óptica, em lente de imersão (1.000x), contando a frequência de cada tipo leucocitário em 100 leucócitos totais, obtendo-se um valor percentual. Este valor percentual foi relacionado com o número de leucócitos para se obter o número de cada tipo leucocitário por mm^3 de sangue.

As dosagens de bioquímica sérica foram efetuadas através de “kits” comerciais de química seca (Labtest®) com leitura em espectrofotômetro Bioplus 200. Todas as dosagens foram realizadas em plasma e permitem o uso

de sangue contendo anti-coagulante. Foram avaliados os seguintes parâmetros: ALT (alanina aminotransferase, “*kit*” número 74), AST (aspartato aminotransferase, “*kit*” número 75), creatinina (“*kit*” número 96) e ureia (“*kit*” número 104).

O princípio do método para quantificação da ALT é baseado na catalisação específica da transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD. Esta oxidação da NADH a NAD é medida entre 340 a 365nm, em modo cinético, e é diretamente proporcional a atividade de ALT na amostra.

A AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato, sendo este último reduzido a malato enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD. Da mesma forma, em modo cinético, a oxidação de NADH a NAD é medida entre 340 a 365 nm, sendo diretamente proporcional a atividade de AST na amostra.

A creatinina reage com o picrato alcalino formando um complexo de cor vermelha. A quantidade de cor vermelha formada é medida em 510nm, sendo proporcional à concentração de creatinina na amostra.

O princípio para a medição da ureia é que esta é hidrolisada pela urease produzindo amônia e dióxido de carbono. A amônia reage com 2-cetoglutarato e NADH em uma reação catalisada pela glutamato desidrogenase, promovendo a oxidação de NADH a NAD. Da mesma forma, esta transformação pode ser medida em 340nm, sendo proporcional a concentração de ureia na amostra.

4.9 ACETILCOLINESTERASE

4.9.1 Em músculo

A determinação da atividade de acetilcolinesterase em músculo dos peixes coletados foi realizada no Laboratório de Ecotoxicologia, do Centro de

Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (ESNP), na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), RJ. Seguiu o método descrito por OLIVEIRA SILVA *et al.* (2000), com modificações, onde as mesmas são quantificadas com base na reação descrita por ELLMAN *et al.* (1961). Foram retiradas porções pequenas das amostras do músculo descongelado. A seguir, essas porções são pesadas e homogeneizadas com uma solução tampão de fosfato de sódio 0,12M, pH 7,6 em proporção 6:1 com relação ao peso das porções retiradas. As amostras foram centrifugadas a 9.000G por 20 minutos a 8°C. Durante a centrifugação, foram preparados tubos de ensaio com 2 ml de solução tampão e 0,5ml de DNTB 2mM. Para a leitura foram adicionados aos tubos de ensaio preparados anteriormente 500 μ L de substrato (acetilcolina) e 25 μ L da amostra. As atividades enzimáticas foram determinadas em espectrofotômetro de forma cinética em $\lambda = 412\text{nm}$, sendo obtida ao final de dois minutos de reação, a absorvância por minuto. A concentração da solução de acetiltiocolina ideal para realização dos ensaios foi determinada para cada espécie de peixe, utilizando curvas de substrato, contendo diferentes concentrações. Para os bagres foi utilizada uma solução de 1mM, para as cocorocas, 3mM e para os apaiaris (utilizados no bioensaio, a ser descrito posteriormente), 1,5mM. Os valores de absorvância foram convertidos em atividade enzimática, expressos em $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, através de cálculo de regressão linear utilizando uma curva padrão de L-cisteína. As atividades de acetilcolinesterase foram correlacionadas com concentração de proteína do músculo.

Para determinação da concentração de proteína das amostras de músculo, as amostras são diluídas (1:10) em solução tampão fosfato de sódio 0,12M pH 7,6. Em tubos de ensaio foram adicionados 4,3mL de H₂O destilada, 200 μ L de NaOH a 25% e 200 μ L de amostra diluída. O “branco” foi confeccionado utilizando-se 4,5mL de H₂O destilada e 200 μ L de NaOH a 25%. Em seguida, foi adicionado 300 μ L de reativo de Folin no primeiro tubo (branco) levando-se ao vortex por 30 seg. O mesmo processo foi repetido para os demais tubos. Transcorrido um período de 5min a partir do primeiro tubo, foi iniciada a leitura da absorvância em espectrofotômetro em $\lambda = 660\text{nm}$. As absorvâncias obtidas foram convertidas em concentração de proteína em

mg/mL utilizando-se uma curva padrão de albumina. Os valores de atividade de acetilcolinesterase foram divididos pela concentração de proteína da amostra sendo obtida a atividade específica da enzima expressa em $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de ptn (CUNHA *et al.*, 1991).

4.9.2 Em sangue

A determinação da atividade de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em hemácias e plasma dos peixes coletados seguiu o método descrito por OLIVEIRA SILVA *et al.* (2000), com modificações, onde as mesmas são quantificadas com base na reação descrita por ELLMAN *et al.* (1961). Esta metodologia é utilizada para sangue humano, que possui hemácias anucleadas. Quando utilizada para determinação da AChE em hemácias de peixes (nucleadas), ela não obteve sucesso, sendo necessárias maiores adaptações, devido a ausência da lise total das hemácias. Contudo, a metodologia pode ser aplicada para a atividade de AChE e BChE em plasma.

Para tal, o sangue foi centrifugado a 500G durante 15min para obtenção da fração plasmática e eritrocitária. Uma alíquota de 500 μL de plasma foi armazenada em eppendorf e congeladas a -20°C por 24 horas. Após a etapa de congelamento, para determinação de BChE, as amostras foram adicionadas a tubos de análise preparados previamente com 2,0mL de tampão de fosfato de sódio 0,12M, pH 7,6, 500 μL de solução de DTNB 2mM, 50 μL de plasma e 500 μL de solução de butirilticolina 9,0mM. As amostras de plasma e a solução de substrato somente foram adicionados no momento da leitura no espectrofotômetro quando então é disparada a reação enzimática. Para determinação da atividade da AChE, foi adotado o mesmo procedimento acima descrito, onde a solução de butirilticolina foi substituída por acetilticolina 6,6mM. As alíquotas foram analisadas cineticamente em espectrofotômetro a 412nm. As análises realizadas com reagentes à temperatura ambiente. As atividades ópticas de AChE foram convertidas em μmoles de substrato hidrolizado/min/mL de amostra com o auxílio de uma curva padrão de L-cisteína, a qual foi confeccionada utilizando-se tampão fosfato de sódio 0,12M, solução de DTNB 2mM, H_2O destilada e solução de L-cisteína, tendo a

absorvância correspondente a cada concentração de L-cisteína determinada fotometricamente em comprimento de onda de 412nm.

A atividade enzimática da AChE foi corrigida pela concentração de proteína plasmática total (item 4.9). Os valores de atividade da AChE foram divididos pela concentração de proteína e a sua atividade específica foi expressa em $\mu\text{moles}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína.

4.10 FATOR DE CONDIÇÃO

O fator de condição (FC) avalia a condição geral do peixe com o uso de relações entre parâmetros biométricos, podendo determinar possíveis interferências ambientais no crescimento do organismo (RON *et al.*, 2002). O fator de condição pode identificar momentos de reserva de energia, por exemplo (MAYER *et al.*, 1992). É um indicador individual indicado pelo “*Standard Methods*” (EATON *et al.*, 1998) e foi calculado para cada espécime da seguinte forma: $\text{Peso (g)} * 100 / [\text{comprimento total (cm)}]^3$.

4.11 ESTRESSE OXIDATIVO

A determinação da atividade de glutathiona total foi realizada no Laboratório de Defesas Celulares, do Prof. Dr. Alcir L. Dafré e no Laboratório de Biomarcadores, do Prof. Afonso Bairy, ambos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras de sangue foram coletadas com seringas rinsadas com heparina. Logo após a coleta, elas foram armazenadas em tubos criogênicos de 3,5mL e mantidas em nitrogênio líquido durante 12h (“*overnight*”). Após esse período de congelamento, foram enviadas para Santa Catarina dentro de um isopor contendo gelo seco, para manter-las sob baixa temperatura, chegando no dia seguinte ao laboratório em boas condições, ainda refrigeradas. Já em laboratório, as amostras foram congeladas e descongeladas 2 vezes, para realizar a lise celular. As enzimas analisadas foram glutathiona total (GSH-t), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx), Catalase (Cat).

Para determinar a glutathiona total (GSH-t) foi empregado o método enzimático de Tietze, modificado por Akerboom e Sies (1981). Uma alíquota de 100 μ l de sangue foi adicionada a 900 μ l de ácido tricloroacético (TCA) 8%, e centrifugada a 15.000 G por 2 min (4°C). O sobrenadante foi neutralizado e diluído 10x (V/V) com tampão fosfato de potássio (KPi) 0,1M com EDTA 1mM, para posterior ensaio enzimático. O ensaio enzimático de 2 min foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0, contendo 0,2 mM de NADPH e 0,1 mM de DTNB. Como iniciador da reação utilizou-se GR 0,25 U/ml. A absorbância basal foi descontada a partir da leitura do consumo basal de NADPH do ensaio na ausência de amostra. As quantificações dos níveis de GSH-t foram baseadas a partir de uma curva padrão realizada no momento da leitura.

Para a determinação das atividades enzimáticas, a fração total do sangue (após a lise celular) foi centrifugada a 20.000 g por 30 min (4°C), e o sobrenadante foi utilizado para os seguintes ensaios enzimáticos: glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e catalase.

Para determinação da glutathiona redutase (GR), utiliza-se o princípio de que durante o consumo do substrato de glutathiona oxidada (GSSG) a enzima consome NADPH, sendo possível acompanhar esta atividade em 340nm ($=6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (CARLBERG, MANNERVIK, 1985). Desta velocidade é descontada a reação basal de consumo de NADPH obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (GSSG). O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH. Como substrato iniciador utiliza-se 1 mM GSSG.

A atividade de glutathiona peroxidase (GPx) é acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH. A enzima, ao utilizar GSH para degradar um peróxido orgânico, como o peróxido de t-butil (t-BOOH) ou de cumeno, gera glutathiona oxidada (GSSG), que por sua vez, é reduzida pela glutathiona redutase, adicionada ao meio de reação, com o consumo de NADPH ($=6.220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Este consumo de NADPH é acompanhado

espectrofotometricamente em 340nm, similar à determinação de GR (WENDEL, 1981). Desta velocidade de consumo é descontado o consumo basal de NADPH, obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (peróxido). O ensaio enzimático de 5 minutos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH, 1 mM GSH e 0,2 U/ml de GR purificada de levedura. É necessário 5 a 10 minutos de incubação com os reagentes (exceto substrato iniciador) para a ativação da enzima. Como substrato iniciador utiliza-se 1 mM de CUOOH.

Para a catalase (CAT), a alta velocidade de reação desta enzima, permite a determinação de sua atividade com concentrações elevadas de H₂O₂ (10 mM). A atividade foi determinada pela velocidade de consumo da H₂O₂ no primeiro minuto da reação, 240nm (= 40 M⁻¹cm⁻¹) (AEBI, 1984), sendo descontado ainda o desaparecimento do peróxido de hidrogênio na ausência de amostra. O ensaio enzimático de 40 segundos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,012% de Triton X-100. Como substrato iniciador utiliza-se 10 mM de H₂O₂. A absorbância basal é descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra.

4.12 CORTES HISTOLÓGICOS

A histopatologia foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária, UFF. As amostras de gônadas e fígados dos peixes foram retiradas imediatamente após a morte dos animais e conservadas em solução de formol 10% tamponado com fosfato de sódio. Após a impregnação de formol nessas amostras, elas foram cortadas cuidadosamente com lâminas afiadas para montagem dos cassetes. A seguir, os cassetes contendo fragmentos das amostras, foram preparados para a realização dos cortes histológicos, de acordo com VAZZOLER (1981), seguindo as etapas:

1. Preparação para inclusão: os cassetes permaneceram por 20h em formol tamponado e a seguir foram colocados em água corrente durante 40h,

sendo então transferidos para álcool 70%, para serem desidratadas.

2. Diafanização: os cassetes permaneceram em Xilol p.a. durante 3h, seguido por imersão em clorofórmio durante uma noite.

3. Impregnação: em estufa (57°C), os cassetes foram submetidos a soluções de parafina e xilol.

4. Inclusão: é feita com o auxílio de quadros de Leuckart (ou com caixinhas de papel dobrado). Coloca-se a parafina liquefeita e, no momento em que esta começa a se solidificar, a peça a incluir; orienta-se a peça com auxílio de estilete e imerge-se o conjunto em água com cubos de gelo. Após a solidificação completa, os blocos são retirados da água, moldados com uma lâmina e mantidos em geladeira, com anotações que permitam sua identificação, até o momento do corte.

5. Corte e colagem: os cortes são efetuados em micrótomo de Minnot, com espessura entre 5 e 7 μm . As fitas de parafina saídas do micrótomo foram colocadas na mesma posição (face brilhante para baixo) em água morna, para ocorrer distensão. A seguir, as lâminas foram preparadas com um esfregaço de água albuminosa, onde uma gota dessa água é colocada no centro da lâmina e espalhada. Com a lâmina e um pincel fino, a fita foi colocada com a face brilhante em contato com a lâmina. A lâmina com os cortes foi colocada sobre platina de Malassez, para que ocorresse distensão total da fita, e a seguir transferida para estufa a 37°C, por 2 a 4 h.

6. Desparafinação: em estufa (57°C), os cortes foram levados a solução de Xilol por 5 minutos para retirada da parafina.

7. Hidratação: para hidratação dos cortes, estes foram levados a soluções de álcool indo de álcool absoluto a água destilada.

8. Coloração: a coloração utilizada foi de hematoxilina-eosina.

9. Desidratação: após coloração, os cortes são desidratados sendo imersos em soluções com diferentes concentrações de álcool, indo de álcool 70% a álcool absoluto.

10. Diafanização, montagem e secagem: última etapa onde os cortes

são imersos em xilol e para a montagem, colocou-se uma gota de bálsamo sobre a lâmina, pressionando a lamínula contra o corte, deixando secar a temperatura ambiente. Para a visualização dos cortes foi utilizada microscopia óptica, em diferentes lentes de aumento.

4.13 BIOENSAIOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Aqüicultura e Pesca da Faculdade de Medicina Veterinária - UFF. Ambos com duração de 6 meses, onde os animais do grupo teste foram alimentados com ração peletizada contaminada artificialmente com cloreto de metilmercúrio na concentração de 10ppm, pré-definida como a primeira a ser testada em bioensaio em função de dados da literatura que demonstraram a ocorrência de alterações hematológicas para bioensaio com peixes de ambiente com clima temperado a partir desta concentração (HAMMERSCHMITD *et al.*, 2002; BERNTSSEN *et al.*, 2004). Outras concentrações não foram testadas devido ao reduzido espaço no laboratório e ao pequeno número de espécimes testados. O número de pelotas de ração por peixe foi determinado de acordo com o peso dos animais.

É importante enfatizar que estes experimentos foram os primeiros ensaios laboratoriais realizados no Brasil onde a via de exposição ao metilmercúrio mimetizaria a principal via em um sistema natural – via alimentação e durante um período longo de exposição, caracterizando um ensaio crônico.

A espécie escolhida para estes ensaios foi o apaiari (*Astronotus ocellatus*) (Figura 18). Optou-se por se realizar um ensaio com uma espécie de água doce visto os baixos gastos necessários para a manutenção de aquários de água doce quando comparados aos gastos com aquários de água salgada.

O apaiari é um peixe teleósteo pertencente à família Cichlidae, mesma família do tucunaré, é utilizado comercialmente para aquarofilia e também para alimentação. O peixe atinge porte máximo de 25 a 30 centímetros de comprimento e aproximadamente 1,5 kg em vida livre. Habita águas de pH

variando entre 6,0 e 8,0 e temperatura entre 22 a 25°C. Tem hábito alimentar onívoro com tendência a carnívora. É originária da Bacia Amazônica e foi escolhida para o desenvolvimento deste estudo devido: (i) a possibilidade de manutenção da espécie em aquários de volume relativamente pequeno; (ii) ao hábito alimentar; e (iii) a estudos prévios na região do rio Tapajós, onde alterações hematológicas foram encontradas em tucunarés (*Cichla* sp.) e relacionadas à exposição ao mercúrio (SOUTO, 2004; SILVA, 2004).

Apaiaris (*Astronotus ocellatus*) de ambos os sexos foram adquiridos de um mesmo criador com aproximadamente 4 cm e aclimatados durante 3 meses antes do início do teste. Esse período foi necessário para que os animais obtivessem tamanho adequado para realização das coletas de sangue preocupando-se em manter a higidez e sobrevivência dos indivíduos.



Figura 18. Espécime de apaiari *Astronotus ocellatus* utilizado em bioensaio.

Os peixes foram mantidos em aquários individuais e independentes, com filtragem biológica e aeração 24 horas/dia, sendo alimentados com ração comercial contendo 40% de proteína bruta, 2 vezes ao dia (Figura 19). Os aquários eram submetidos a troca parcial de água mensalmente. Os parâmetros de qualidade de água foram acompanhados semanalmente através de “kits” para aquarofilia (pH, amônia, oxigênio dissolvido, nitrito e dureza),

somente para observação da estabilidade do aquário e da qualidade da água, monitorando a necessidade de sua troca parcial. A temperatura da água foi monitorada diariamente. Observações quaisquer sobre horário de alimentação e da saúde/comportamento dos animais foram também anotadas diariamente.

As concentrações de Hg total em água foram monitoradas de 15 em 15 dias, mantendo-se abaixo do limite de detecção durante todo o experimento. Foi realizado um teste utilizando um becher contendo ração contaminada e água para observar se haveria transferência de Hg da ração para a água no período de 15 dias, equivalente a um período menor do que o mensal para troca de água parcial dos aquários. No entanto não foi observada tal transferência, já que a concentração de Hg permaneceu abaixo do limite de detecção.



Figura 19. Aquários utilizados para os ensaios com apaiaris *Astronotus ocellatus*.

As coletas de sangue foram realizadas bimestralmente. O volume de sangue a ser coletado foi definido em relação ao peso dos animais seguindo a fórmula: $(\text{Peso em g} \times 10/100) \times 5/100$. Essa padronização do volume é importante para a manutenção da vida do animal após a coleta, sem causar qualquer debilidade. O peso e o tamanho foram medidos logo após a coleta de

sangue, sendo acompanhados, portanto, bimestralmente.

No dia da coleta de sangue, os peixes só eram alimentados após a amostragem, para garantir que os níveis de Hg encontrados fossem basais e não sofressem influência da alimentação, com um intervalo de 12 h de jejum. Para garantir um menor estresse dos animais, eles eram capturados calmamente dos aquários e mantidos molhados, com um pano vedando os olhos do animal.

Ao término dos experimentos, os animais foram sacrificados, utilizando para tal lidocaína injetada diretamente nas brânquias, para que a distribuição desta fosse imediata na circulação do peixe, atingindo rapidamente todo o corpo do animal. Após alguns minutos e a verificação de estado de imobilidade total e um início de dureza cadavérica, os animais foram dissecados para obtenção das amostras de músculo, fígado e gônada. Todo esforço foi feito em prol da minimização do sofrimento do animal, de acordo com o código de ética para pesquisas com animais.

4.13.1 Contaminação da ração

A contaminação artificial da ração por cloreto de metilmercúrio seguiu a metodologia descrita em HAMMERSCHMITD *et al.* (2002) e foi realizada no laboratório de Ecotoxicologia Ambiental – FIOCRUZ. A ração comercial foi imersa em uma solução de 10ppm de cloreto de metilmercúrio dissolvido em etanol, deixada por *over night* em capela ligada com fluxo contínuo. O princípio é a evaporação do álcool e fixação do metilmercúrio nas proteínas da ração devido a sua alta afinidade com grupamentos sulfidríla.

A ração foi armazenada em sacos tipo *ziploc* devidamente lacrados sendo guardados dentro de potes vedados e mantida congelada. As concentrações de Hg total na ração utilizada foram determinadas antes e depois da contaminação, resultando em 0,1ppm e $9\pm 0,5$ ppm respectivamente. A manipulação da ração durante o ensaio foi feita usando luvas de nitrila e pinças para segurança ocupacional, ambos os materiais eram descontaminados após o uso com solução de permanganato de potássio.

4.13.2 Bioensaio I: Teste piloto

Para este primeiro experimento foram utilizados oito espécimes de apaiaris (*Astronotus ocellatus*) no grupo teste (peixes expostos ao metilmercúrio) e três no grupo controle (peixes alimentados com ração comum, não contaminada) do experimento, com início em 30 de abril e término em 06 de dezembro de 2007. O pH e a temperatura da água foram semanalmente medidos e controlados, com média de $6,2\pm 0,2$ e $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Neste ensaio, foram realizados hemogramas (sem bioquímica sérica) e determinações de Hg total em sangue bimestralmente. No término do experimento, foram realizadas determinações de Hg total em músculo, fígado e gônadas e também a determinação da atividade de acetilcolinesterase no músculo. Cortes histológicos do fígado e de gônadas foram realizados.

4.13.3. Bioensaio II

Para este segundo experimento, foram mantidos 13 espécimes de *Astronotus ocellatus* no grupo teste e 13 no grupo controle, com término do experimento em julho de 2009. Antes do início do experimento, novas determinações de Hg total foram feitas na ração contaminada, resultando em uma média de 7ppm. As diferentes rações comerciais compradas para alimentação do grupo controle e para complemento alimentar do grupo teste também foram analisadas e as concentrações de mercúrio total encontradas variaram entre 20,5 e 37,5ng/g. Registros de concentrações de mercúrio de até 140ng/g em rações para criação de peixe foram anteriormente reportados pela agência FAPESP em 2008 (CASTRO, 2008).

A primeira coleta foi no início do experimento (janeiro de 2009), antes de qualquer contaminação artificial do grupo teste. As outras três coletas foram realizadas bimestralmente (março, maio e julho de 2009).

Os parâmetros hematológicos realizados foram: eritrograma (hematimetria, hemoglobinometria, volume globular, VGM e CHGM), proteína plasmática total, leucometria global, leucometria específica e bioquímica sérica (ALT, AST, creatinina e ureia).

Foram realizadas determinações de Hg total no músculo, fígado e gônadas e algumas determinações de MeHg em hemácia, plasma, músculo e fígado. Não foi possível determinar o metilmercúrio em todas as amostras devido a problemas no equipamento. As atividades de AChE e BChE em músculo e plasma, a atividade de glutatona total, glutatona peroxidase, glutatona redutase e catalase em papa de hemácias e cortes histológicos em fígado e gônadas também foram realizados.

4.14 ANÁLISES DE DADOS

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o programa SPSS, versão 18.0, sendo investigadas as possíveis correlações entre os dados, utilizando correlações Pearson e Spearman (dependendo do número de casos envolvidos na análise) e diferenças entre as áreas e entre as espécies (teste T-student, Anova, testes não paramétricos, também de acordo com o número de casos envolvidos na análise) para todos os parâmetros. Os gráficos foram feitos no EXCEL 2.000 e no pacote estatístico SPSS, versão 18.0. O nível de significância aceito foi de no mínimo $p < 0,05$, ou seja, um erro de 5%.

4.14.1 Curvas de bioacumulação de Hg

Para a construção das curvas de bioacumulação de Hg de todas as espécies de peixes estudadas foi utilizado o programa EXCEL 2.000. Os dados de concentração de Hg total de cada espécie foram agrupados por faixas de tamanho. O número de intervalos foi definido por:

$$K = 1 + 3,3 \log n$$

Onde: K = número de intervalos ideal

n = número de espécimes

A faixa de tamanho foi definida pela relação entre o tamanho máximo de peixe coletado de uma determinada espécie pelo valor de K. Para cada faixa de tamanho foi associada à média de Hg total encontrada no grupo de dados

para peixes daquele tamanho. Após a definição das faixas de tamanho e das médias de Hg total correspondentes, foram feitos gráficos de dispersão e derivadas as equações que melhor expressaram as relações. O tipo de dispersão utilizado (potencial, exponencial, linear, polinomial) foi escolhido de acordo com o padrão de distribuição que cada espécie apresentou. Os gráficos foram feitos no EXCEL 2.000 e no SPSS. O nível de significância aceito foi de no mínimo $p < 0,05$, ou seja, um erro de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados separadamente em subitens de acordo com os objetivos específicos.

5.1 MERCÚRIO EM PEIXES NAS ÁREAS ESTUDADAS

Objetivo específico I: avaliar a biodisponibilidade do mercúrio para peixes em ecossistemas costeiros.

Neste capítulo será discutida a distribuição de mercúrio na Baía de Guanabara e na Baía da Ribeira, em relação a disponibilidade para a biota, sendo investigadas possíveis diferenças dessa disponibilidade através do tempo e de acordo com a espécie de peixe. Entende-se aqui como mercúrio biodisponível, aquele que foi absorvido e acumulado pelo peixe.

A necessidade de padronização para possibilitar comparações das concentrações de mercúrio em peixes de diversas áreas dificulta a contextualização dos dados em relação a dados encontrados em outras áreas. Os dados de biometria nem sempre são apresentados, logo a média apresentada em alguns artigos inclui peixes de diversas faixas de tamanho. Outros possuem um número de espécimes pequeno e outros artigos, que visam o estudo da saúde humana, utilizam peixes vendidos em supermercados, sem maiores informações sobre a origem do peixe. Além disso, boa parte das espécies aqui estudadas não possui dados secundários disponíveis. Alguns valores de mercúrio em músculo de peixes coletados em estuários e baías estão apresentados na tabela 2, página 43.

Na tabela 4 estão apresentados os valores médios encontrados para os parâmetros biométricos (peso, comprimento total e comprimento padrão) e

Tabela 4. Médias \pm desvio padrão dos parâmetros biométricos (peso - P, comprimento total - CT, comprimento padrão - CP) e das concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), hemácias (HgHe), plasma (HgPI); fígado (HgF), rim (HgR) e conteúdo estomacal (HgEt) de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= n° de espécimes.

Área/Espécies	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	HgM (ng/g)	HgHe (ng/g)	HgPI (ng/g)	HgF (ng/g)	HgR (ng/g)	HgEt (ng/g)
Baía da Ribeira									
Bagre <i>G. genidens</i>	17,7 \pm 3,6 (120)	14,5 \pm 3,1 (120)	51,7 \pm 43,6 (120)	255,6 \pm 136,6 (118)	50,5 \pm 39,1 (59)	3,7 \pm 2,1 (10)	1.099,9 \pm 808,9 (59)	433,9 \pm 384,9 (59)	-
Cocoroca <i>H. steindachneri</i>	14,3 \pm 3,1 (53)	11,8 \pm 2,7 (53)	49,8 \pm 37,3 (53)	117,7 \pm 95,9 (52)	31,6 \pm 25,6 (26)	2,6 \pm 0,8 (4)	351,2 \pm 311,6 (38)	-	-
Bagre <i>A. luniscutis</i>	23,5 \pm 4,9 (38)	19,8 \pm 4,2 (38)	137,7 \pm 87,1 (38)	337,7 \pm 112,4 (38)	128,5 \pm 72,2 (25)	7,8 \pm 6,3 (18)	1.301,9 \pm 738,9 (30)	624,8 \pm 392,1 (31)	-
Baía de Guanabara									
Bagre <i>G. genidens</i>	16,7 \pm 2,8 (65)	13,7 \pm 2,4 (65)	36,1 \pm 19,7 (32)	60,6 \pm 50,5 (62)	38,3 \pm 42,6 (40)	41,4 \pm 78,6 (27)	243,9 \pm 200,6 (65)	82,7 \pm 66,2 (11)	114,8 \pm 117,8 (11)
Cocoroca <i>Haemulon</i> sp.	14,0 \pm 2,9 (67)	11,6 \pm 2,4 (67)	46,1 \pm 22,3 (38)	93,4 \pm 97,1 (65)	27,0 \pm 21,2 (27)	5,6 \pm 10,8 (13)	149,9 \pm 170,8 (51)	-	-

concentrações de mercúrio no músculo, nas hemácias, no plasma, no fígado, no rim e no conteúdo estomacal dos peixes coletados na Baía de Guanabara e na Baía da Ribeira. A diferença encontrada para o número de espécimes analisados para tamanho e peso está relacionado a perda de material. Como não houve coleta de sangue em todos os espécimes estudados, existe uma diferença entre o número de análises de Hg em músculo para o Hg em sangue. Não houve coleta de rins para a espécie de cocoroca *Haemulon* sp. pois este órgão é difícil de ser encontrado durante a dissecação e é muito pequeno. A determinação de mercúrio total em conteúdo estomacal foi realizada em poucas amostras, pela baixa frequência de estômagos cheios encontrada e também por dificuldades em homogeneizar alguns itens alimentares como ossos de peixes e escamas, sendo utilizada apenas como um indicativo.

Segundo a legislação brasileira (ANVISA, Portaria 685/98), os níveis permitidos de Hg em peixes para consumo humano são de 0,5 ppm ou 500 ng/g para espécies não carnívoras e de 1,0 ppm ou 1.000 ng/g para espécies carnívoras. Tanto na Baía de Guanabara quanto na Baía da Ribeira, as médias encontradas para as espécies estudadas estão abaixo do limite estabelecido. Em comparação com a tabela 2, os níveis encontrados para mercúrio no músculo em ambas as baías são menores do que os encontrados em outras áreas contaminadas e em outras espécies.

Na Baía de Guanabara, as concentrações de mercúrio em músculo em cocoroca *Haemulon* sp. foram significativamente mais altas que em bagres ($p < 0,05$). Comparando os dados do estudo anterior (RODRIGUES, 2006) com os resultados do presente trabalho, os bagres *G. genidens* apresentaram uma média mais alta anteriormente ($103,1 \pm 44,1$ ng/g; $n=66$), mostrando que o mercúrio na baía de Guanabara para esta espécie está menos disponível nos últimos 4 anos ($p < 0,005$). Cocorocas não foram coletadas em 2005, por isso esta comparação não pode ser realizada para esta espécie.

As concentrações de Hg em fígado também foram diferentes entre as espécies coletadas na Baía de Guanabara, no entanto, as concentrações mais altas foram nos bagres *G. genidens*.

Já na Baía da Ribeira, as maiores concentrações de mercúrio foram

encontradas nas espécies de bagres *A. luniscutis* ($337,7 \pm 112,4 \text{ ng/g}$) e *G. genidens* ($255,6 \pm 136,6 \text{ ng/g}$). Anteriormente, as maiores concentrações encontradas no local foram na espécie de cocoroca *H. steindachneri* (RODRIGUES, 2006). Levando-se em consideração espécimes de bagre *G. genidens* de mesmo tamanho, os níveis de Hg total em músculo aumentaram em 4 vezes nos últimos 4 anos ($p < 0,001$). Da mesma forma, o bagre *A. luniscutis* teve um aumento de duas vezes nas concentrações de Hg em músculo ($p < 0,001$). Para as cocorocas, esses níveis diminuíram cerca de 3 vezes nesse mesmo período ($F=6,3$; $p < 0,05$). Os valores das campanhas de 2004/2005 podem ser encontrados no quadro 1.

Os bagres *A. luniscutis* foram maiores em peso ($p < 0,001$) e tamanho ($p < 0,001$) do que os bagres *G. genidens* e as cocorocas *H. steindachneri* foram menores ($p < 0,001$). As maiores concentrações de Hg em hemácias ($p < 0,001$) e em músculo ($p < 0,001$) foram encontradas para os bagres *A. luniscutis* e as menores para as cocorocas. O bagre *Aspistor luniscutis* é diferente tanto do *G. genidens* quanto da *H. steindachneri* ($p < 0,001$) para HgHe e em relação a HgM, *G. genidens* é diferente de *A. luniscutis* ($p < 0,005$) e da *H. steindachneri* ($p < 0,001$). Além disso, para HgF, *G. genidens* e *H. steindachneri* são diferentes ($p < 0,001$; $F=26,4$), mas *G. genidens* e *A. luniscutis* são similares estatisticamente.

Resumidamente, na Baía da Ribeira, o bagre *G. genidens* apresentou menor concentração de mercúrio no sangue, indicando uma menor exposição atual ao mercúrio, no entanto apresenta concentrações no fígado similares a *A. luniscutis*, mas este mercúrio não é repassado para o músculo na mesma taxa que o é no *A. luniscutis*. Isso pode representar diferenças na forma do mercúrio ao qual as duas espécies estão expostas. Esse tópico será abordado com maior detalhe no item 5.5.

Esses dados indicariam uma rápida disponibilidade do mercúrio para os peixes que vivem no fundo, perto dos sedimentos, possivelmente devido ao mês de coleta e às condições meteorológicas de ambas as campanhas. Durante agosto de 2009 os peixes foram coletados em entradas de frentes frias na região, com alto índice de pluviosidade e ventos fortes, o que poderia

remobilizar o sedimento e liberar o mercúrio para a coluna d'água. Como este mercúrio remobilizado pode estar sendo absorvido pelas brânquias ou sendo ingerido junto com o sedimento ressuspensão esteja na forma inorgânica, a acumulação do mercúrio não é tão evidente nas cocorocas.

5.1.1 Comparação entre áreas

Em relação ao bagre *G. genidens* pode-se observar que os espécimes oriundos da Baía da Ribeira são mais pesados do que os da Baía de Guanabara ($F=3,9$; $p<0,05$), mas são iguais em tamanho.

Sobre as concentrações de mercúrio em sangue, não houve diferença para os níveis encontrados em hemácias, já para os níveis em plasma, a Baía de Guanabara apresentou maiores concentrações, uma indicação de exposição a mercúrio inorgânico ($F=5,8$; $p<0,05$).

Apesar de não haver diferença entre as baías em relação a uma possível exposição atual ao metilmercúrio, medida através do mercúrio total nas hemácias, onde praticamente todo ele está sob a forma de metilmercúrio, os níveis encontrados no músculo ($F=43,3$; $p<0,001$), no fígado ($F=60,6$; $p<0,001$) e no rim ($F=25,1$; $p<0,001$) foram maiores na Baía da Ribeira. Como anteriormente, verificou-se a necessidade de padronização por tamanho para poder realizar comparações entre áreas, usando somente *G. genidens* de tamanho até 24,5cm, todas as diferenças continuaram aparecendo e sendo significativas. Essa diferença pode ser melhor observada através da padronização das concentrações de mercúrio pelo comprimento padrão, onde uma média de $17,4\pm 7,8$ ng/g.cm ($n=118$) foi encontrada para a baía da Ribeira e uma média de apenas $4,3\pm 3,2$ ng/g.cm ($n=62$) para os *G. genidens* da Baía de Guanabara (teste-t; $p<0,001$).

Já para as cocorocas *Haemulon steindachneri*, não foram observadas diferenças no tamanho e nem na concentração de Hg em músculo dos espécimes coletados. Diferenças entre áreas foram restritas a peso ($F=4,7$; $p<0,05$) e a HgF ($F=4,4$; $p<0,05$), ambos maiores na Baía da Ribeira.

Como ambas as espécies apresentaram diferenças em peso e nem

sempre em tamanho, as concentrações de Hg em músculo, fígado e rim foram padronizadas (divididas) pelo peso de cada espécime e os valores estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Médias \pm desvio padrão das concentrações de mercúrio total (ng/g, peso úmido) em músculo (HgM), em fígado (HgF) e em rim (HgR) encontradas para as três espécies coletadas na Baía da Ribeira e na Baía de Guanabara padronizadas pelo peso dos animais.

Parâmetros	<i>Genidens genidens</i>	<i>Haemulon sp.</i>	<i>Aspistor luniscutis</i>
Baía da Ribeira			
HgM	6,1 \pm 3,1	2,7 \pm 1,3	3,5 \pm 2,2
HgF	20,2 \pm 14,5	7,9 \pm 4,5	12,4 \pm 6,9
HgR	6,9 \pm 3,2	-	5,9 \pm 3,2
Baía de Guanabara			
HgM	2,4 \pm 1,4	2,3 \pm 1,2	-
HgF	7,3 \pm 3,3	3,5 \pm 2,6	-
HgR	3,0 \pm 1,8	-	-

Para os espécimes de *G. genidens*, as médias encontradas na Baía da Ribeira foram maiores tanto para músculo, quanto para fígado e rim do que as médias encontradas na Baía de Guanabara (teste t; $p < 0,001$). Para as cocorocas, da mesma forma, não houve diferença em relação ao acumulado em músculo, e o fígado apresentou novamente maior acumulação na Baía da Ribeira.

Apesar de não ter sido coletado em ambas as áreas, as concentrações de mercúrio também foram padronizadas pelo peso para o bagre *A. luniscutis*, encontrando um padrão mais diferenciado do que o anterior, onde somente foram consideradas as concentrações sem padronização. As médias para o mercúrio total padronizado foram menores do que as do bagre *G. genidens*. Esta pode ser uma indicação do papel da gordura retida na parte ventral dos espécimes de *A. luniscutis* na dinâmica do mercúrio no organismo. Este acúmulo de gordura foi observado em espécimes dessa espécie durante a dissecação para retirada de amostras dos órgãos internos.

5.1.2 Distribuição do mercúrio em peixes nas estações de coleta

Com o objetivo de se observar se há diferentes padrões de acumulação de Hg nos diferentes setores das baías estudadas, os dados foram classificados de acordo com as estações de coleta.

Primeiramente, em relação a Baía de Guanabara (tabela 6), observou-se que na estação 5, Jurujuba, foram coletados os maiores ($p < 0,05$) e mais pesados ($p < 0,005$) espécimes de *G. genidens*, como também as mais altas concentrações de mercúrio em músculo ($p < 0,05$) foram encontradas. No entanto como somente 2 espécimes foram coletados nesta estação, essa diferença pode ser considerada apenas como uma indicação.

As concentrações de Hg em hemácias encontradas na estação 4, Gradim, foram as mais altas da baía, sendo diferentes das encontradas em Paquetá ($p < 0,05$) e também na Praia da Bica ($p < 0,001$). Paquetá apresentou as menores concentrações ($p < 0,001$), talvez por estar na área de maior circulação de águas da baía, esses animais podem estar em contato com águas mais limpas.

Para investigar a relação entre HgHe e HgPI encontrada em cada estação foram somente considerados espécimes em que ambos foram medidos. Aqueles que só tiveram mensuração de mercúrio em hemácias ou somente de mercúrio em plasma foram desconsiderados. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 7.

Na Baía de Guanabara, para o bagre *Genidens genidens* esta relação muda de uma estação para outra. Gradim tem uma relação de quase 1:1 e Paquetá, de 10:1. Essas relações são muito interessantes, pois podem estar refletindo diferenças na exposição desses animais ao mercúrio. No bioensaio II, a ser apresentado no capítulo 5.7, o grupo controle obteve uma relação de 1:1, similar a encontrada em Gradim. Já o grupo teste obteve uma relação de 10:1, similar a encontrar para a estação Paquetá. Esses resultados sugerem uma maior exposição dos peixes coletados no Gradim ao mercúrio inorgânico e os coletados em Paquetá, ao metilmercúrio.

Tabela 6. Médias±desvio padrão das concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), em fígado (HgF) e em rim (HgR) e parâmetros biométricos, peso (P), comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) de 02 espécies de peixes da Baía de Guanabara em cada estação de coleta. (n)= número de espécimes.

Parâmetros	Estação #1 Praia da Bica	Estação #2 Praia da Ribeira	Estação #3 Paquetá	Estação #4 Gradim	Estação #5 Jurujuba
<i>Genidens genidens</i>					
CT (cm)	16,5±4,0 (15)	-	17,0±2,5 (33)	15,8±1,1 (15)	21,2±0,6 (2)
CP (cm)	13,3±3,3 (15)	-	14,0±2,1 (33)	12,7±0,9 (15)	17,9±0,1 (2)
Peso (g)	35,7±20,6 (13)	-	20,0±9,9 (2)	32,0±8,3 (15)	86,5±4,9 (2)
HgHe (ng/g)	51,2±30,1 (11)	-	55,0±59,2 (14)	12,1±7,0 (13)	21,8±17,2 (2)
HgPI (ng/g)		-	83,7±98,2 (13)	2,2±1,5 (14)	
HgM (ng/g)	102,6±62,2 (13)	-	40,9±39,3 (32)	56,4±12,9 (15)	135,8±110,7 (2)
HgF (ng/g)	326,4±268,8 (15)	-	219,5±202,6 (33)	211,8±75,2 (15)	269±183,8 (2)
HgR (ng/g)	121,1±104,1 (15)	-	64,0±49,2 (33)	84,0±33,0 (15)	92,5±47,4 (2)
HgEt (ng/g)	-	-	114,8±117,8 (11)		
<i>Haemulon sp.</i>					
CT (cm)	14,7±3,5 (17)	15,0±2,4 (3)	-	-	13,7±2,7 (47)
CP (cm)	12,0±2,9 (17)	12,7±1,9 (3)	-	-	11,3±2,3 (47)
Peso (g)	48,3±28,2 (16)	52,3±20,8 (3)	-	-	43,2±16,9 (19)
HgHe (ng/g)	32,3±17,6 (12)	21,3±8,9 (3)	-	-	23,2±26,1 (12)
HgPI (ng/g)	3,0±2,1 (9)		-	-	11,3±19,8 (4)
HgM (ng/g)	170,7±147,8 (17)	95,3±36,2 (3)	-	-	64,0±50,2 (45)
HgF (ng/g)	274,1±253,4 (16)	187,2±42,8 (2)	-	-	87,5±60,1 (33)

Tabela 7. Médias da relação entre mercúrio em hemácias e mercúrio em plasma encontradas em cada estação de coleta para os bagres *Genidens genidens* e *Apistor luniscutis* e para as cocorocas *Haemulon* sp. coletados na Baía de Guanabara e na Baía da Ribeira. (n)= número de espécimes.

Baía da Ribeira	Estação 1	Estação 2	Estação 3	Estação 4
<i>Apistor luniscutis</i>	12,2 (3)	12,0 (2)	23,5 (10)	-
<i>Genidens genidens</i>	27,5 (1)	8,6 (1)	26,2 (6)	29,9 (1)
<i>Haemulon steindachneri</i>	-	-	-	20,5 (3)
Baía de Guanabara	Praia da Bica	Paquetá	Gradim	Jurujuba
<i>Genidens genidens</i>	-	8,6 (12)	0,9 (9)	-
<i>Haemulon steindachneri</i>	23,6 (9)	-	-	9,8 (2)

Relação parecida (10:1) foi encontrada para as cocorocas *Haemulon* sp. coletadas em Jurujuba, sendo que na Praia da Bica, essa relação foi ainda maior, 24:1.

A relação HgF: HgHe também é diferente no Gradim em relação a Paquetá ($p < 0,05$) e Praia da Bica ($p < 0,05$). Igualmente ocorre para a razão entre HgR:HgHe nas mesmas estações ($p < 0,05$). Como Gradim apresentou maiores concentrações de Hg em hemácias e concentrações similares de Hg em fígado e rim, as razões encontradas nesta estação foram as mais baixas. Lembrando que a estação Gradim está localizada dentro do setor 3 proposto por MAYR e colaboradores (1989) como área com influência de esgoto doméstico e industrial.

Para a cocoroca *H. sp.*, as concentrações de Hg em músculo e em fígado na praia da Bica foram mais altas do que as encontradas em Jurujuba ($p < 0,001$). A praia da Bica também está situada neste mesmo setor 3 proposto por MAYR e colaboradores (1989).

De forma geral, as duas estações com menor circulação e maior influência do continente, Gradim e Praia da Bica, ambas do setor 3, apresentaram as maiores concentrações de Hg em peixes. Jurujuba, estação

5, pertencente ao setor 2 de acordo com a proposição de classificação de MAYR e colaboradores (1989), apesar do pequeno número de espécimes amostrados, parece ser uma área importante em relação a contaminação por mercúrio vide as concentrações encontradas no músculo de bagres.

Apesar das áreas perto dos rios, em especial Sarapuí-Iguaçu, serem consideradas como “*hot spots*” em relação a contaminação por metais, locais próximos não foram amostrados pois não há viabilidade de realização de arrastos na região devido a pequena coluna d' água.

Em relação a Baía da Ribeira, observando-se a distribuição das concentrações de Hg ao longo da baía (tabela 8), os bagres *G. genidens* apresentaram níveis menores de Hg em hemácias na estação 2, sendo diferentes dos níveis nas estações 1 e 3, esta última apresentando as maiores concentrações ($p < 0,05$; $p < 0,001$, respectivamente). Na estação 4 só foi coletado um espécime dessa espécie, não sendo possível a realização de análises estatísticas. Para a concentração no músculo, a estação 3 também possui os maiores níveis e a estação 2, os menores ($p < 0,001$). Comportamento este observado para o Hg em fígado e em rim, onde a estação 3 apresentou as maiores concentrações ($p < 0,05$).

Em relação a cocoroca *H. steindachneri*, na estação 3 só foram capturados 2 espécimes, não sendo possível a realização de testes estatísticos. Entre as estações 2 e 4, não houve diferença para as concentrações de Hg.

Para o bagre *Aspistor luniscutis*, os menores ($p < 0,005$) e mais leves ($p < 0,05$) espécimes foram coletados na estação 2, sendo diferente dos espécimes encontrados nas estações 1 e 3. Os espécimes da estação 1 foram os maiores e mais pesados. Para as concentrações de mercúrio, somente houve diferença em relação aos níveis encontrados em músculo, entre as estações 2 e 3, respectivamente, as estações com menor e maior concentrações ($p < 0,001$).

Tabela 8. Concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), em fígado (HgF) e em rim (HgR) e parâmetros biométricos, peso (P), comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) de 03 espécies de peixes da Baía da Ribeira em cada estação de coleta. (n)= número de espécimes.

Parâmetros	Estação #1	Estação #2	Estação #3	Estação #4
<i>Genidens genidens</i>				
CT (cm)	16,3±2,4 (64)	17,2±2,2 (27)	20,9±3,9 (28)	31,8 (1)
CP (cm)	13,2±2,0 (64)	13,9±1,8 (27)	17,3±3,4 (28)	26,8 (1)
Peso (g)	37,2±21,9 (64)	42,1±18,6 (27)	84,2±48,0 (28)	333(1)
HgHe (ng/g)	51,8±28,2 (20)	16,2±22,0 (12)	62,5±42,6 (26)	122,5 (1)
HgPI (ng/g)	4,6±3,9 (2)	2,2 (1)	3,7±2,0 (6)	4,1 (1)
HgM (ng/g)	242,3±100,8 (64)	176,2±127,8 (25)	342,9±152,1 (28)	635,5 (1)
HgF (ng/g)	984,7±898,3 (16)	1.064,6±777,4 (16)	1.174,9±804,7 (26)	1.560 (1)
HgR (ng/g)	328,9±206,9 (16)	274,4±115,4 (17)	567,0±492,9 (27)	1.230 (1)
<i>Aspistor luniscutis</i>				
CT (cm)	29,3±1,0 (3)	19,8±4,2 (12)	24,7±4,3 (23)	-
CP (cm)	24,8±1,0 (3)	16,3±3,2 (12)	21,0±3,6 (23)	-
Peso (g)	228,3±37,8 (3)	78,2±69,6 (12)	157,0±82,2 (23)	-
HgHe (ng/g)	68,8±10,0 (3)	36±2,8 (2)	146,7±69,1 (20)	-
HgPI (ng/g)	5,9±1,3 (3)	3,0±0,1 (2)	9,0±7,1 (13)	-
HgM (ng/g)	319,7±90,0 (3)	253,8±75,9 (12)	383,8±107,4 (23)	-
HgF (ng/g)	2.190 (1)	769,2±336,2 (11)	1.578,2±744,4 (18)	-
HgR (ng/g)	1.020 (1)	322,4±117,9 (11)	779,1±398,5 (19)	-
<i>Haemulon steindachneri</i>				
CT (cm)	-	12,8±1,9 (16)	12,8±1,1 (2)	15,0±3,3 (35)
CP (cm)	-	10,6±1,6 (16)	10,5±0,6 (2)	12,4±2,9 (35)
Peso (g)	-	30,6±14,1 (16)	30,5±7,8 (2)	59,6±41,7 (35)
HgHe (ng/g)	-	23,6±9,8 (8)		35,1±29,7 (18)
HgPI (ng/g)	-			2,6±0,8 (4)
HgM (ng/g)	-	88,6±49,3 (15)	72±32,5 (2)	132,7±109,8 (35)
HgF (ng/g)	-	219,5±174,0 (14)		428,1±349,8 (24)

De modo geral, a estação 3 apresentou as maiores concentrações de mercúrio em peixes, no entanto, faz-se necessário notar que, apesar dos poucos espécimes, a estação 4 apresentou concentrações altas. Seria elucidativa uma maior coleta de dados nessa estação para verificar se as médias para todas as espécies seriam maiores neste ponto da baía, visto que a temperatura das águas dessa área é mais alta, por consequência do despejo das águas usadas no resfriamento dos reatores pelas usinas termonucleares, podendo gerar diferenças na disponibilidade de Hg e no ritmo de incorporação do mesmo pela biota como sugerido por FOWLER *et al.* (1978), que demonstraram que com o aumento da temperatura invertebrados aquáticos podem absorver em uma maior taxa o mercúrio, o que poderia refletir nas concentrações dos peixes que se alimentam desses invertebrados.

A relação entre HgHe e HgPI nas estações da baía da Ribeira em sua maior parte foram acima de 20:1, exceto na estação 2, onde para ambas as espécies de bagre *Genidens genidens* e *Aspistor luniscutis* essa relação foi perto do 10:1. Todas as relações são indicativas de uma maior exposição ao metilmercúrio do que ao mercúrio inorgânico. A maior relação foi encontrada na estação #4, citada no parágrafo anterior, reforçando a necessidade de maiores estudos na região.

5.1.3 Mercúrio em peixes em diferentes estações do ano

Para verificar se além de diferenças na distribuição do mercúrio na baía, se ocorrem mudanças no comportamento do mercúrio e sua acumulação durante o ano, os dados foram separados de acordo com a estação do ano na qual os espécimes foram coletados. Foram considerados para esta análise temporal preliminar tanto os dados de trabalhos anteriores (RODRIGUES, 2006) quanto os dados originados no presente trabalho para que todas as estações do ano pudessem ser abordadas. É importante salientar que esta análise é preliminar e que um monitoramento mensal deveria ser realizado para se obter respostas mais conclusivas.

Nas tabelas 9 e 10 estão apresentados os resultados encontrados para

a Baía de Guanabara e Baía da Ribeira, respectivamente.

Em relação a Baía de Guanabara, as concentrações de mercúrio total em músculo do bagre *G. genidens* foram mais altas na primavera do que no verão ($p < 0,001$) e no outono ($p < 0,05$). As menores concentrações foram encontradas durante o verão, sendo praticamente metade dos valores encontrados no inverno ($p < 0,05$).

Para a cocoroca *H. sp.*, não houve coleta de espécimes durante a primavera e durante o outono apenas um espécime foi coletado. Entre verão e inverno, um comportamento similar do que ocorreu com o *G. genidens* foi encontrado, onde as menores concentrações foram encontradas para o verão ($F = 29,1$; $p < 0,001$), sendo estas quase três vezes menores, em média, das concentrações de Hg durante o inverno.

Tabela 9. Médias \pm desvio padrão das concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM) e comprimento total (CT) de 02 espécies de peixes da Baía de Guanabara em cada estação do ano. (n) = número de espécimes.

Parâmetros	Primavera	Verão	Outono	Inverno
<i>Genidens genidens</i>				
HgM (ng/g)	103,1 \pm 42,8 (70)	48,8 \pm 31,3 (35)	58,8 \pm 54,5 (12)	89,8 \pm 71,6 (15)
Tamanho (cm)	12,6 \pm 3,7 (70)	14,9 \pm 1,9 (35)	17,5 \pm 0,4 (12)	20,3 \pm 1,7 (15)
<i>Haemulon sp.</i>				
HgM (ng/g)	-	69,3 \pm 54,3 (50)	281,0 (1)	166,0 \pm 157,2 (14)
Tamanho (cm)	-	13,9 \pm 2,7 (50)	17,3 (1)	14,5 \pm 3,6 (14)

KEHRIG *et al.* (1998) demonstrou que os níveis de mercúrio em corvinas *Micropogonias furnieri* na Baía de Guanabara eram mais altos durante o inverno, corroborando com as diferenças encontradas neste trabalho. As hipóteses sugeridas pelos autores teriam relação com a perda de peso dos peixes nessa época e a temperaturas mais baixas na superfície da água e diminuição da incidência solar, causando menor produtividade primária.

Quando no verão a biomassa no sistema cresce, se a quantidade de MeHg no sistema permanecer constante, então, haverá menos MeHg por unidade celular de alga. Este processo pode também afetar o zooplâncton e assim, sucessivamente, atuando como um fator de diluição da contaminação, pelo crescimento (KEHRIG *et al.*, 1998).

Além da biomassa do sistema, no verão, podem ocorrer mudanças na carga de material em suspensão devido a eventos de chuva mais intensos, o que pode também influenciar numa maior adsorção de Hg livre na coluna d'água, diminuindo a biodisponibilidade do mercúrio no sistema. As chuvas também trazem novas fontes de alimento, o que pode mudar a dose a qual os animais estão expostos.

Em relação a Baía da Ribeira (tabela 8), as concentrações de Hg em músculo do bagre *G. genidens* encontradas durante o inverno foram 3 vezes maiores do que no verão, sendo diferentes de todas as outras estações do ano ($p < 0,001$). Padrão similar foi encontrado para o bagre *A. luniscutis*, sendo as concentrações no inverno duas vezes maiores do que as encontradas no outono ($p < 0,001$).

Tabela 10. Concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), em fígado (HgF) e em rim (HgR) e parâmetros biométricos, peso (P), comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) de 03 espécies de peixes da Baía da Ribeira em cada estação do ano. (n)= número de espécimes.

Parâmetros	Primavera	Verão	Outono	Inverno
<i>Genidens genidens</i>				
HgM (ng/g)	154,7 ± 97,9 (14)	87,3±82,9 (72)	113,3±63,9 (10)	255,5±136,6 (118)
Tamanho (cm)	19,9 ±4,2 (14)	14,1±5,0 (72)	20,8±3,8 (10)	17,8±3,6(118)
<i>Aspistor luniscutis</i>				
HgM (ng/g)	196,5 ± 92,3 (13)	169,9±49,0 (13)	152,0±96,9 (5)	337,7±112,4 (38)
Tamanho (cm)	22,2 ± 5,1(12)	26,5±4,3 (13)	25,5±3,1 (5)	23,5±4,9(38)
<i>Haemulon steindachneri</i>				
HgM (ng/g)	370,0±237,4 (14)	407,9 ± 209,8 (6)	224,4 ± 110,7 (13)	117,7±95,9 (52)
Tamanho (cm)	19,1±1,9 (14)	21,3 ± 4,5 (6)	19,3 ± 2,1 (13)	14,4±3,0 (52)

Já para as cocorocas *H. steindachneri*, o cenário é o oposto. As menores concentrações foram encontradas durante o inverno e as maiores no verão, com a mesma diferença (3 vezes mais) ($p < 0,001$). Isso pode estar associado a mudanças nos itens alimentares durante o inverno ou até mesmo no metabolismo da espécie devido a temperaturas menores.

5.2 ESTADO TRÓFICO E ACUMULAÇÃO DE Hg

Objetivo específico 2: avaliar a biomagnificação do Hg em peixes por meio da identificação do estado trófico das espécies estudadas.

Neste capítulo serão abordados os dados de composição isotópica de duas das espécies estudadas na Baía da Ribeira, relacionando a posição na cadeia trófica com as concentrações de mercúrio.

Foram escolhidas quatro amostras de músculo de bagres *Genidens genidens* e quatro de cocorocas *Haemulon steindachneri* da Baía da Ribeira, coletadas nas mesmas estações descritas anteriormente, em 2005, para serem determinados os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Os músculos são comumente utilizados para estudos isotópicos associados a dietas animais, pela integração do sinal isotópico da dieta com a do músculo.

A assinatura isotópica do carbono reflete o tipo de alimentação e a de nitrogênio, o nível trófico da espécie naquele local. É importante salientar que a mesma espécie pode apresentar sinais isotópicos diferentes dependendo do ecossistema no qual vive, visto que processos biogeoquímicos podem controlar o enriquecimento do substrato (água, sedimento) em isótopos mais pesados.

Na literatura, são descritos alguns itens alimentares encontrados em estômagos das espécies estudadas. Para o bagre *G. genidens* foram descritos itens como alga, restos de vegetal superior, crustáceo, molusco, poliqueta e peixes pequenos. Para a cocoroca *H. steindachneri*, zooplâncton, peixes, bentos e alga. Durante a dissecação dos animais foi possível observar em estômagos cheios, sem auxílio de lupa, alguns desses itens alimentares supracitados. Para o bagre *Genidens genidens* foram encontrados, além de sedimento, siri, mexilhão, camarão, ossos de peixes. Para a cocoroca, peixes pequenos e camarões.

Ambas são consideradas espécies onívoras, com tendência carnívora por outros autores (CHAVES, VENDEL, 1996; SANTOS, 1982; CARVALHO-FILHO, 1999), e conseqüentemente os níveis de mercúrio esperados seriam altos, levando-se em consideração a biomagnificação trófica. Entretanto, em trabalhos anteriores, concentrações de Hg total encontradas em bagres eram

significativamente mais baixas que as encontradas nas cocorocas (RODRIGUES, 2006). Isso demonstra que apesar de itens alimentares em comum, essas espécies parecem assimilar esses nutrientes, e consequentemente o Hg, de forma diferente.

Sabe-se que nem todos os itens alimentares encontrados no conteúdo estomacal de um animal serão obrigatoriamente digeridos e assimilados por ele na mesma proporção. BRITO *et al.* (2006) demonstraram que em córregos da Ilha Grande-RJ, apesar de tricópteras ingerirem uma maior proporção de material particulado do que de microalga, o sinal isotópico era típico de um consumidor primário, herbívoro-algal, demonstrando que a maior parte do que é ingerido (material particulado) não é assimilado. Por isso, trabalhos utilizando as razões isotópicas tem sido tão importantes para a compreensão da transferência dos nutrientes e absorção dos mesmos. Mudanças sazonais na alimentação podem ser observadas através da mudança na composição isotópica.

Os resultados encontrados para o percentual médio de carbono e nitrogênio nas amostras de músculo analisadas no presente trabalho foram para *Genidens genidens* $43,1 \pm 0,8\%$ e $13,7 \pm 0,2\%$ e para *Haemulon steindachneri* $42,6 \pm 0,3\%$ e $13,7 \pm 0,2\%$, respectivamente, não diferenciando entre si. Ambas as espécies são enriquecidas em nitrogênio, com uma relação C/N de 3:1. Os resultados da assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ podem ser observados na figura 20 e na tabela 11. De forma geral, os bagres apresentaram composição isotópica mais leve de nitrogênio e de carbono do que as cocorocas da Baía da Ribeira. Esses valores mais elevados em cocorocas podem estar ligados a uma dieta mais pelágica e os valores encontrados pelos bagres indicariam uma dieta mais bentônica.

Observando a figura 20, a espécie de cocoroca *Haemulon steindachneri* apresentou uma relação um pouco mais linear entre $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, relacionada possivelmente com o crescimento do animal. Já o bagre *Genidens genidens* teve uma maior dispersão dos dados, não apresentando relação aparente com o crescimento e nem com a estação do ano em que os espécimes foram coletados. Faz-se necessário lembrar que para estabelecer melhor essas

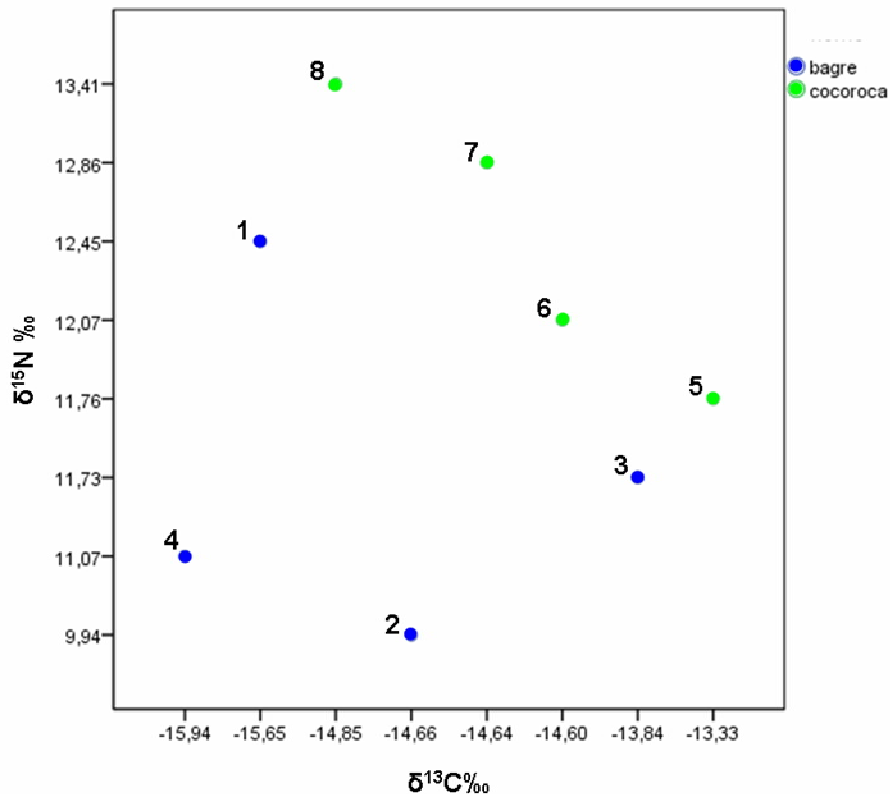


Figura 20. Composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em músculo de bagres (*Genidens genidens*), em azul, e de cocorocas (*Haemulon steindachneri*), em verde, oriundas da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. O número em cada ponto é referente ao número da amostra, vide tabela 11.

Tabela 11. Dados das amostras de músculo de peixes da Baía da Ribeira utilizadas para determinação da composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

Amostra	Estação do ano	Espécie	CT (cm)	Peso (g)	HgM (ng/g)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
1	Verão	<i>G. genidens</i>	25,0	134	373,5	-15,7	12,5
2	Verão	<i>G. genidens</i>	21,5	96	196,7	-14,7	9,9
3	Primavera	<i>G. genidens</i>	18,6	50	129,5	-13,8	11,7
4	Primavera	<i>G. genidens</i>	15,0	30	45,0	-15,9	11,1
5	Primavera	<i>H. steindachneri</i>	21,3	140	619,3	-13,3	11,8
6	Primavera	<i>H. steindachneri</i>	16,6	63	193,0	-14,6	12,9
7	Primavera	<i>H. steindachneri</i>	19,6	107	261,0	-14,6	12,1
8	Verão	<i>H. steindachneri</i>	29,8	142,7	417,5	-14,8	13,4

relações seria necessário um maior número de amostras. Por isso, esses resultados serão tratados como possíveis indicações do que acontece no meio. Comparando os resultados encontrados com os esperados para diferentes níveis tróficos de uma cadeia aquática dulcícola (Figura 21), pode-se observar que a composição isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ definiria ambas as espécies como carnívoras, mas os valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados são muito mais pesados.

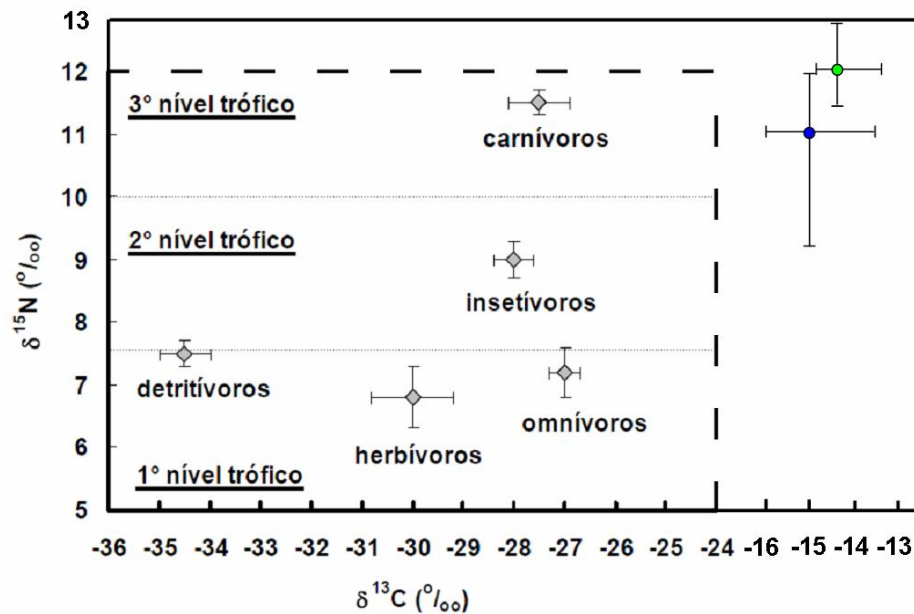


Figura 21. Composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e a estrutura trófica hipotética correspondente em um sistema dulcícola. Fora da escala, em verde, está representado o resultado obtido para a espécie de cocoroca *Haemulon steindachneri* e em azul, o resultado obtido para o bagre *Genidens genidens*. Adaptado de Ferraz *et al.*, 2009.

Assinatura parecida de $\delta^{15}\text{N}$ foi encontrada em golfinhos do nordeste do oceano Atlântico (8 a 12‰), mas os valores encontrados para $\delta^{13}\text{C}$ foram mais leves (-16,9 a -20,4‰) (DAS *et al.*, 2000).

Sinais isotópicos de material orgânico particulado e dissolvido de estuários nos Estados Unidos variaram entre 5 e 11‰ $\delta^{15}\text{N}$ e -29 a -22‰ $\delta^{13}\text{C}$, indicando que o material pode ser de origem alóctone ou resultado de um retrabalhamento da matéria orgânica autóctone (MCCALLISTER *et al.*, 2006).

Estas composições isotópicas de carbono mais pesadas em espécies estuarinas ou marinhas do que as encontradas para espécies de peixe carnívoras de ambientes de água doce podem ser explicadas devido a fatores como:

- o maior sinal isotópico para o fitoplâncton e de plantas aquáticas, que não possuem o problema de perda de água para o ambiente, não regulando a entrada de isótopos mais pesados ou mais leves pelo fechamento total ou parcial dos estômatos, tendo em média sinal isotópico de -21‰;

- a temperatura da água, que está ligada a solubilidade do gás carbônico. Quando a temperatura é mais alta, o gás carbônico é liberado para a atmosfera, sendo o mais leve mais facilmente exportado, ficando a água enriquecida em $\delta^{13}\text{C}$. Logo, boa parte do CO_2 utilizado para geração de energia pelos fotossintetizantes terá composição mais pesada, sendo incorporado na biomassa fitoplanctônica. Além do fitoplâncton, os carbonatos formados a partir deste CO_2 serão incorporados pelo zooplâncton para compor suas carapaças, obtendo-se sinais isotópicos mais pesados. A temperatura da água de fundo na Baía da Ribeira pode variar entre 20-28°C (dados obtidos nas campanhas de 2004-2005; Rodrigues, 2006). Esta faixa de temperatura pode favorecer os processos de enriquecimento em isótopos pesados;

- atividade microbológica, visto que uma maior taxa de decomposição de matéria orgânica pode liberar formas mais leves de CO_2 e enriquecer a coluna d'água ou os sedimentos com formas isotópicas mais pesadas;

- as transformações de N-orgânico para N mineral e mesmo entre moléculas inorgânicas de N levam a um enriquecimento deste no sedimento. Ou seja, conforme as reações de mineralização, nitrificação, desnitrificação e volatilização ocorrem, a matéria orgânica restante torna-se enriquecida em átomos de ^{15}N ;

- a composição de matéria orgânica do sedimento marinho, que é rica em carapaças e outras estruturas de carbonato de cálcio ou sílica, que ao serem decompostas podem enriquecer o sedimento em $\delta^{13}\text{C}$, variando de -10 a -19‰;

- influência de rios próximos, que estão transportando materiais orgânicos que podem precipitar ou sedimentar nas áreas estuarinas, que irão gerar sinais isotópicos diferenciados, dependendo do uso do solo da bacia de drenagem, da granulometria dos sedimentos transportados e da cobertura vegetal do solo carregada pelas chuvas até os rios e dos rios até o estuário. Se há uma grande área de gramíneas ou plantas C4 nesta bacia, o sinal isotópico seria mais pesado do que se o predomínio fosse de plantas C3;

- o tempo de retrabalhamento dessa matéria orgânica pela biota, visto que isótopos mais pesados são mais lentos, então de forma geral, os processos biológicos tendem a liberar mais rapidamente isótopos mais leves, acumulando os mais pesados;

- abundância do nitrogênio no sistema, pois caso ele seja um fator limitante, o sistema tende a segurar este nutriente, tendo menos perdas e, conseqüentemente, um fracionamento isotópico também menor.

Diferenças entre as espécies podem estar ligadas a fatores intrínsecos como as taxas de ingestão e de assimilação de nutriente e a produção e a excreção de metabólitos. Quando a ingestão de alimentos é diferenciada durante a vida do animal ou quando este possui mais de uma fonte de energia, para uma melhor compreensão do sinal isotópico encontrado é necessário saber a proporção de cada item alimentar na sua dieta e os sinais isotópicos de cada uma das fontes para calcular fatores de enriquecimento.

Considerando o comportamento destas espécies, ambas são consideradas demersais, ou seja, vivem perto do fundo, sendo que as cocorocas são encontradas mais facilmente em fundos rochosos e os bagres, nos sedimentos finos e grossos, mais próximos a rios. Ambas são capturadas perto do continente.

Observando todos os fatores, tanto os intrínsecos à espécie quanto os ambientais, somados aos resultados encontrados pode-se dizer que, apesar da diferença entre as espécies estudadas não ser acentuada, o sinal isotópico mais leve encontrado para os bagres pode refletir uma alimentação mais variada (onívora) e uma maior assimilação de matéria orgânica recém chegada

de rios, com um sinal isotópico mais leve. A cocoroca, vivendo um pouco mais longe das fontes continentais, poderia ter uma assinatura isotópica mais pesada de nitrogênio, indicando possivelmente uma alimentação mais restritiva do que os bagres, podendo ser consideradas carnívoras, e em relação ao carbono, como elas vivem perto de costões rochosos, o retrabalhamento da matéria orgânica pode ter maior influência nos isótopos pesados, lembrando que a Baía da Ribeira pode ser considerada um sistema oligotrófico.

Investigando a possível relação entre os sinais isotópicos encontrados e as concentrações de Hg total no músculo dessas amostras (figuras 22 e 23) pode-se observar que não há uma relação muito clara entre $\delta^{13}\text{C}$ e a acumulação de Hg. Já em relação ao $\delta^{15}\text{N}$, as cocorocas, que possuem uma razão isotópica mais pesada, também apresentam maiores concentrações de mercúrio.

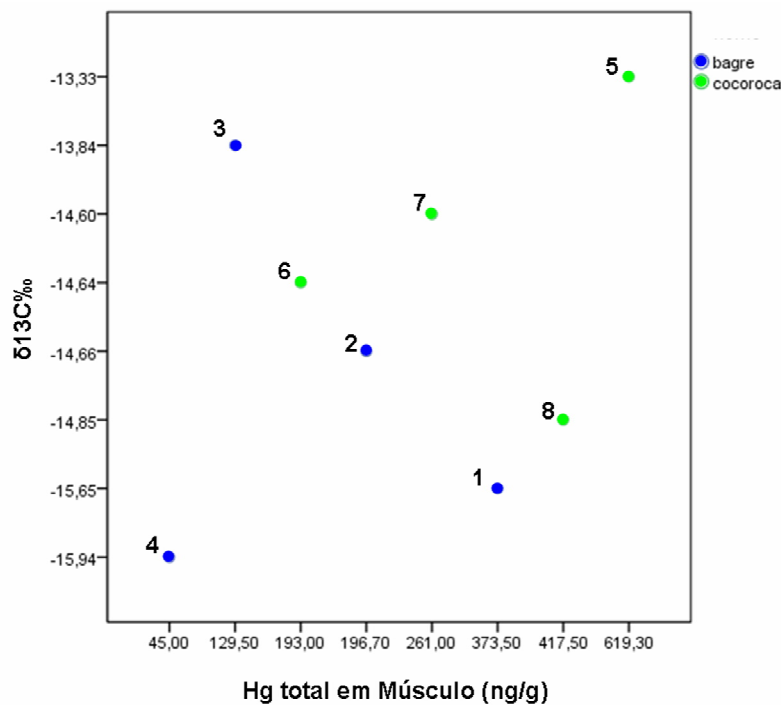


Figura 22. Relação entre as concentrações de mercúrio (Hg) total em músculo e o sinal isotópico para $\delta^{13}\text{C}$, em bagres (bolinhas azuis) e em cocorocas (bolinhas verdes), oriundos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. O número em cada ponto é referente ao número da amostra, vide tabela 11.

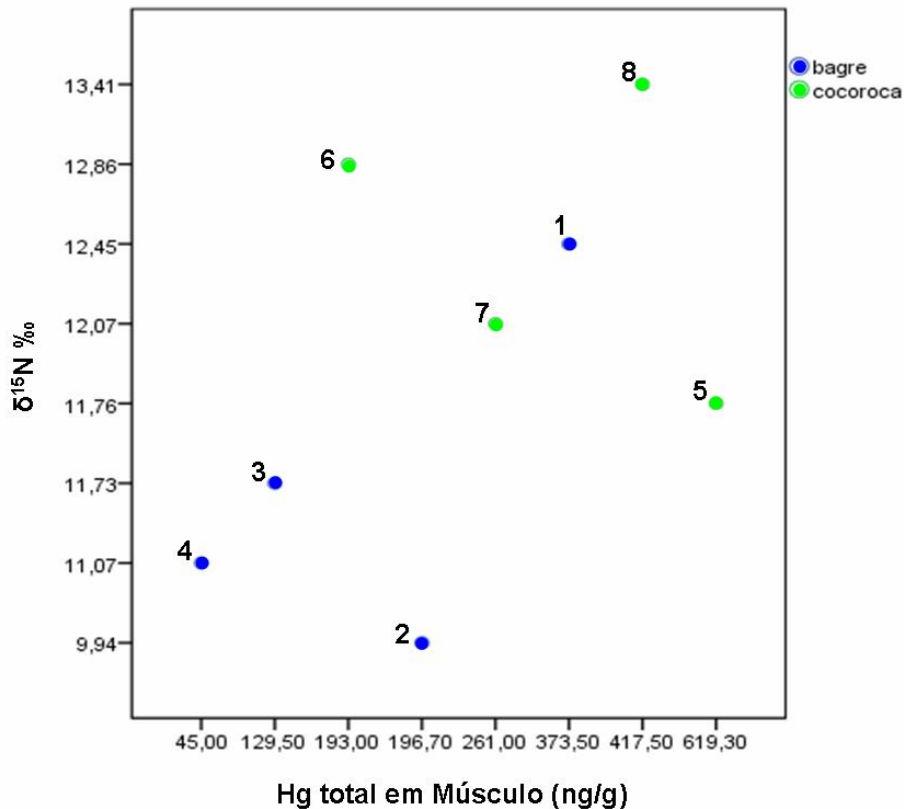


Figura 23. Relação entre as concentrações de mercúrio (Hg) total em músculo e o sinal isotópico para $\delta^{15}\text{N}$, em bagres (bolas azuis) e em cocorocas (bolas verdes), oriundos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. O número em cada ponto é referente ao número da amostra, vide tabela 11.

Isto poderia estar refletindo, de acordo com os dados acima, essa maior restrição na alimentação das cocorocas e seu maior nível trófico, definido por um maior consumo ou uma melhor assimilação dos nutrientes oriundos de presas de níveis tróficos maiores, como peixes. Todas as relações discutidas neste capítulo podem servir como indicações para trabalhos futuros. Estes resultados foram apenas preliminares.

Não foi possível realizar esta mesma análise para os peixes coletados na Baía de Guanabara. No entanto, seria interessante que em futuros trabalhos essa relação seja confirmada, evidenciando possíveis similaridades nos níveis tróficos.

Seria importante em trabalhos futuros acompanhar a evolução da composição isotópica através do tempo, para detectar possíveis mudanças na alimentação de acordo com as estações do ano, o que poderia refletir na acumulação do mercúrio por esses peixes.

5.3 CURVAS DE BIOACUMULAÇÃO

Objetivo específico 3: caracterizar curvas de acumulação de mercúrio total através do tamanho para as espécies de peixes nas áreas de estudo.

Neste capítulo, com o objetivo de verificar a possível influência da idade dos indivíduos, conseqüentemente do tempo de exposição dos mesmos, na acumulação do Hg no tecido muscular, serão apresentadas as curvas de acumulação construídas de acordo com faixas de tamanho, utilizando os dados de comprimento total (CT) e de Hg total em músculo (HgM).

Na Baía da Ribeira, os dados de HgM do bagre *Genidens genidens* foram distribuídos em 6 grupos de acordo com o tamanho dos espécimes, em faixas de comprimento total divididas de 3 em 3 cm; para o bagre *Aspistor luniscutis*, foram 6 intervalos de 3 cm; e, para a cocoroca *Haemulon steindachneri*, 6 intervalos de 2 cm. Na Baía de Guanabara, os dados da espécie de bagre *Genidens genidens* foram agrupados em 5 intervalos de 3 cm e os dados da espécie *Haemulon* sp., em 6 intervalos de 2 cm cada um.

As curvas estão apresentadas a seguir nas figuras de 24 a 28. As equações da reta foram colocadas nos gráficos somente para comparação direta entre os dados, visto que o comportamento de acumulação do mercúrio através do tempo não seguiu um padrão de uma reta em todos os casos.

O bagre *Aspistor luniscutis* e a cocoroca *Haemulon steindachneri* demonstraram um padrão polinomial de acumulação de Hg em músculo, sendo que a cocoroca ainda obteve bons resultados com o padrão exponencial para os dados obtidos na Baía da Ribeira. Para o bagre *Genidens genidens* obteve-se excelentes resultados com um padrão exponencial para ambas as áreas.

As equações encontradas foram utilizadas para predizer quando concentrações de mercúrio no músculo proibitivas para consumo humano seriam atingidas para cada espécie estudada. Na Baía da Ribeira, a espécie de bagre *Aspistor luniscutis* teve uma curva negativa, mostrando uma tendência de decréscimo com o tamanho. Na figura 24, pode ser observado que as médias nas faixas de tamanho possuem pouca oscilação, ou seja, esta espécie não estaria demonstrando uma relação clara entre o seu crescimento e tempo

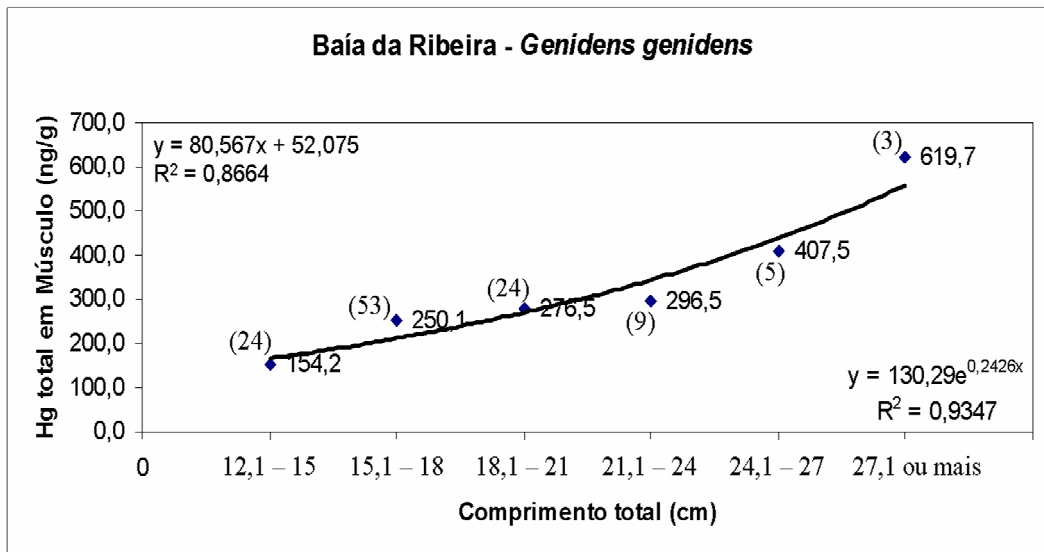


Figura 24. Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em bagres (*Genidens genidens*) oriundos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. (n)= número de espécimes.

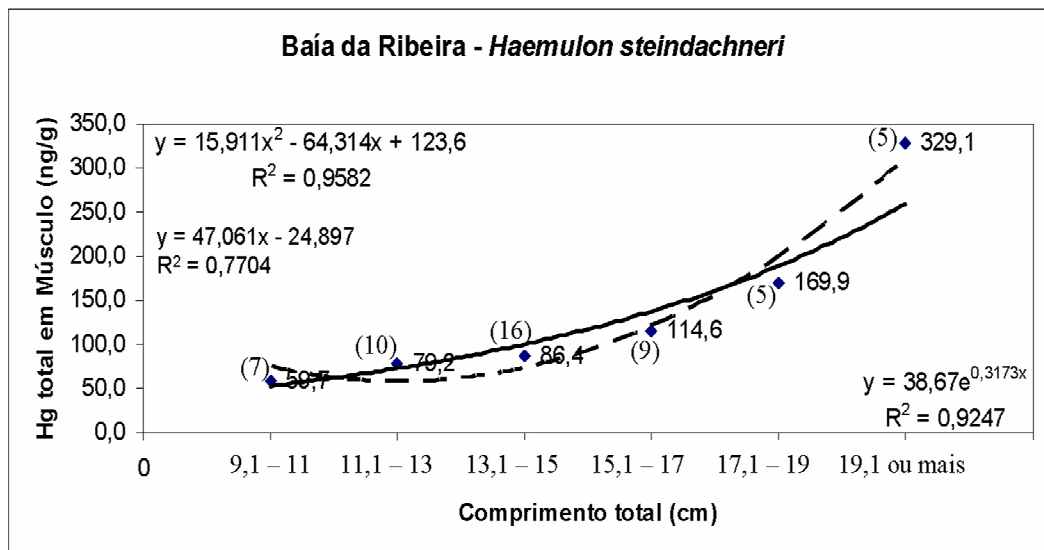


Figura 25. Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em cocorocas (*Haemulon steindachneri*) oriundas da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. Em linha pontilhada, a curva referente à equação polinomial. Em linha inteira, a equação exponencial. (n)= número de espécimes.

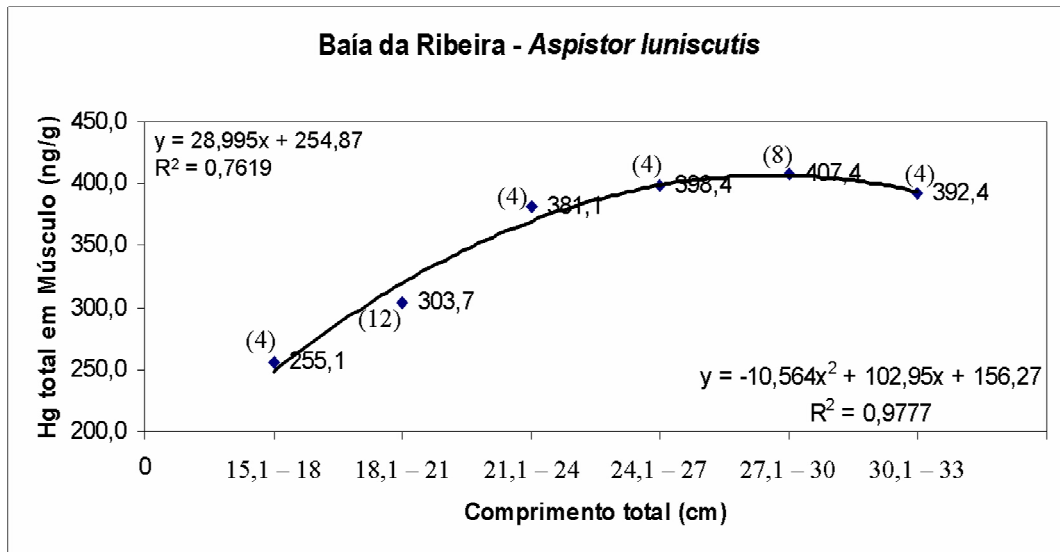


Figura 26. Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em bagres (*Aspistor luniscutis*), oriundos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ. (n)= número de espécimes.

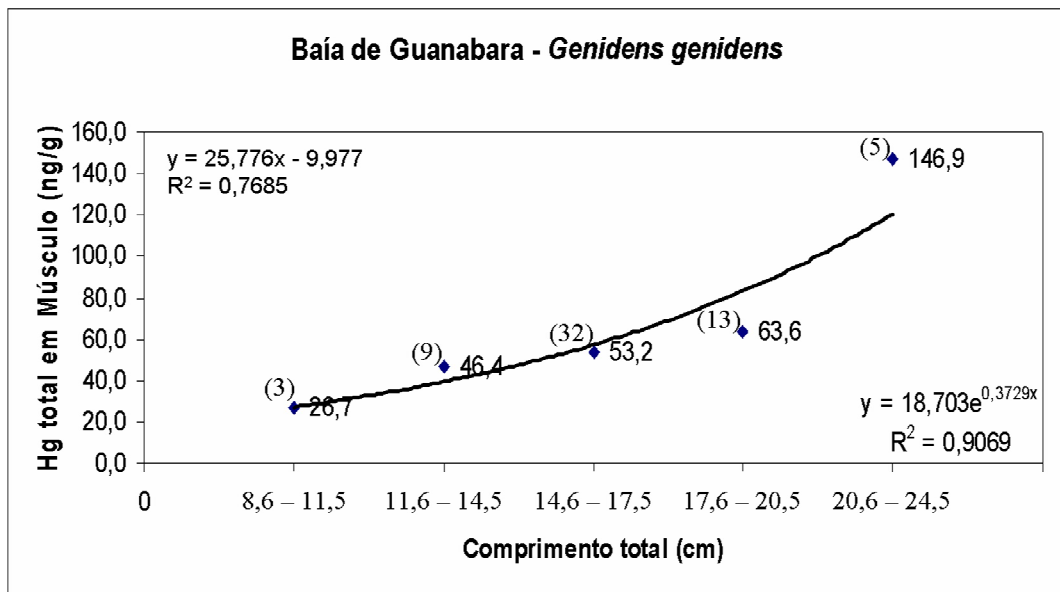


Figura 27. Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em bagres (*Genidens genidens*), oriundos da Baía de Guanabara, RJ. (n)= número de espécimes.

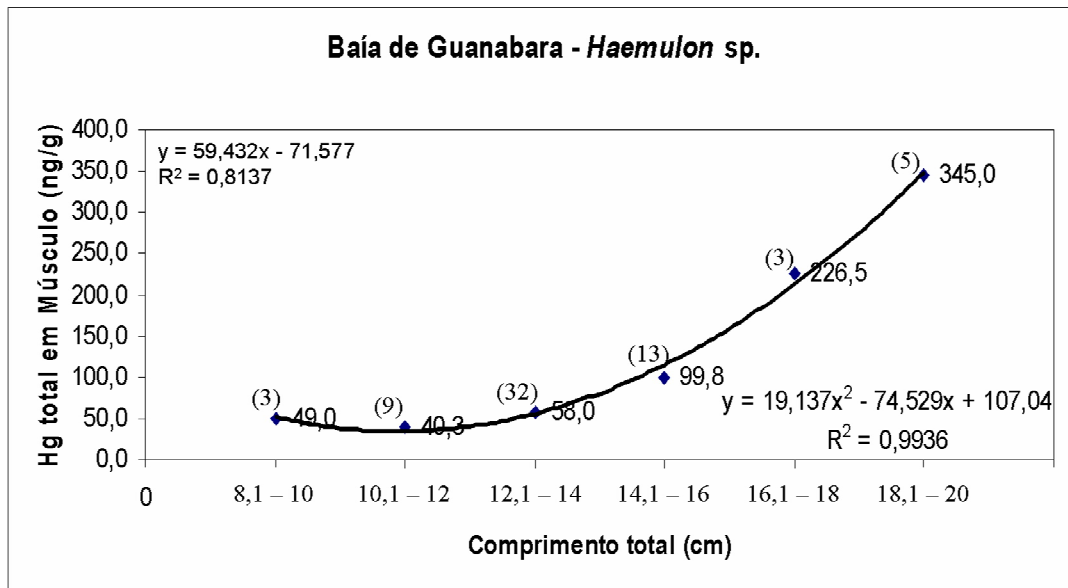


Figura 28. Curva de bioacumulação de mercúrio total em músculo (ng/g) em cocorocas (*Haemulon* sp.), oriundas da Baía de Guanabara, RJ. (n)= número de espécimes de exposição com a acumulação do mercúrio. Resultado diferente foi obtido anteriormente, com espécimes da mesma espécie, coletadas no mesmo local, entre 2004 e 2005, onde foi encontrada uma relação positiva entre os dois (tamanho e mercúrio em músculo), gerando uma curva de bioacumulação positiva com padrão polinomial (RODRIGUES, 2006).

Ainda na Baía da Ribeira, a outra espécie de bagre *Genidens genidens* já apresentou na figura 22, concentrações maiores que 500ng/g nos espécimes coletados maiores que 27cm, não sendo necessária a aplicação da curva. Já para a Baía de Guanabara, as concentrações acima do limite permitido para esta mesma espécie seriam encontradas em espécimes de 30 a 33 cm, demonstrando uma acumulação mais lenta do Hg neste ambiente, sugerindo uma menor disponibilidade do mesmo, considerando-se como biodisponível o mercúrio absorvido e acumulado pelo peixe.

Entretanto, para a espécie de cocoroca *Haemulon* sp. acontece o inverso. Na baía da Ribeira, essa acumulação seria um pouco mais lenta, sendo o limite para consumo desses peixes alcançado por espécimes maiores que 22cm e na Baía de Guanabara, por espécimes maiores que 20 cm.

Em uma breve análise temporal, comparando os resultados obtidos em

2004-2005 com os resultados do presente trabalho, pode-se observar que houve uma diminuição no tamanho necessário para ultrapassar a concentração de 500ng/g em tecido muscular por parte da espécie de bagre *Genidens genidens*, onde em 2005 os espécimes alcançariam tal concentração com 36cm na Baía da Ribeira e em 2009, já com 27cm essa concentração foi observada. O mesmo pôde ser observado para esta espécie na baía de Guanabara, onde em 2005, o tamanho seria de 39cm e com os presentes resultados, este tamanho diminuiu para 30cm. Em relação a cocoroca *Haemulon steindachneri*, o tamanho necessário para estar acima do limite aumentou na baía da Ribeira, saindo de 18cm para 22cm. Não há dados anteriores sobre esta espécie na Baía de Guanabara para eventual comparação.

Levando em consideração que as espécies estudadas alcançam a idade adulta em diferentes tamanhos e que possuem tamanhos máximos registrados diferenciados, para ilustrar melhor as diferenças na acumulação, um espécime de *Genidens genidens*, que possui tamanho máximo (comprimento total) de 35cm, teria na Baía da Ribeira, uma concentração de Hg em músculo por volta de 1.156ng/g, já na Baía de Guanabara, seria de apenas 540ng/g. Para a espécie de cocoroca *Haemulon steindachneri*, que pode crescer até 30cm, esses níveis na Baía da Ribeira e Baía de Guanabara seriam respectivamente, 1.643ng/g e 1.968ng/g.

São poucos os estudos onde se observa o comportamento da acumulação do mercúrio através do tempo, apesar da relação entre a acumulação de mercúrio no músculo e o tamanho do peixe ser amplamente reconhecida. WIENER *et al.* (2003) plotaram seus dados de Hg em músculo de perca pelo tamanho do animal observando que a relação entre os dois parâmetros é forte em diversas áreas, mas o padrão de acumulação é diferenciado, de acordo com a disponibilidade de Hg no sistema.

DOWNS *et al* (1999) observaram a relação entre Hg total no corpo de enguias e a idade dos espécimes, obtendo novamente padrões similares de acordo com a idade, mas diferentes em relação às áreas de estudo. Diferenças no ritmo de acumulação entre espécies de uma mesma área foram relatadas

por PHILLIPS *et al* (1980).

As espécies estudadas no presente trabalho não possuem dados secundários publicados e/ou disponíveis para comparações, exceto os dados gerados por este grupo de trabalho, atualmente submetido para publicação e disponíveis em RODRIGUES (2006). Seria interessante também uma comparação entre as taxas de crescimento dessas espécies nas duas áreas, pois se uma espécie cresce em ritmo mais rápido em uma área do que em outra, pode gerar diferenças nas concentrações de mercúrio total em músculo.

Sucintamente, as cocorocas apresentaram praticamente o mesmo ritmo/taxa de acumulação em ambas as áreas, sendo que na Baía da Ribeira a acumulação está mais lenta do que em 2005. O mercúrio está mais disponível para ambos os bagres, no entanto, para o bagre *A. luniscutis*, a acumulação não parece ter ligação com o tamanho durante todas as fases de crescimento. A acumulação do mercúrio possui uma fase de crescimento exponencial entre 15 e 21cm e depois se torna quase uma constante. E para o bagre *G. genidens* a acumulação mais rápida foi na Baía da Ribeira, sendo que em ambas as áreas o ritmo/taxa de acumulação aumentou em relação aos dados encontrados anteriormente (RODRIGUES, 2006). Essa maior velocidade na acumulação pode interferir na saúde de animais cada vez mais jovens, estando estes expostos a doses maiores ainda pequenos.

5.4 METILMERCÚRIO

Objetivo específico 4: biomarcadores de exposição I: quantificar as concentrações de mercúrio total e metilmercúrio encontradas em músculo e hemácias de peixes, causadas por possíveis diferenças na disponibilidade / incorporação do mercúrio.

Neste capítulo serão apresentados os resultados encontrados para mercúrio total e metilmercúrio em amostras de peixes. Como a determinação de metilmercúrio demanda alto custo, foram escolhidas algumas amostras de acordo com as concentrações de mercúrio total encontradas nas espécies. Não foi possível realizar análises em amostras coletadas na Baía da Ribeira, devido a perda de material por falha em equipamento (freezer danificado durante o fim de semana) e também por problemas técnicos com o equipamento de cromatografia gasosa, que não puderam ser resolvidos a tempo hábil. Os resultados encontrados para o percentual de metilmercúrio nas amostras de músculo e hemácias analisadas são apresentadas na tabela 12. Todas as amostras analisadas foram da primeira campanha na Baía de Guanabara (março/2008).

Tabela 12. Concentrações de mercúrio total (HgT) e metilmercúrio (ng/g; peso úmido) e seus respectivos percentuais de metilmercúrio (MeHg) em amostras de músculo e de hemácias de bagres *Genidens genidens* e cocorocas *Haemulon steindachneri* oriundas da Baía de Guanabara. (n)= número de espécimes.

Parâmetros	<i>Genidens genidens</i>	<i>Haemulon sp.</i>
HgT_M	104,4±74,7 (8)	111,7±87,7 (6)
MeHg_M	76,7±66,3 (8)	39,3±38,7 (6)
% MeHg	85,7± 43,5 (8)	31,3± 13,2 (6)
HgT_He	19,0 (1)	14,0±5,6 (2)
MeHg_He	25,1 (1)	12,8±3,1 (2)
% MeHg	132,1 (1)	94,2±15,2 (2)

O percentual encontrado para hemácias do bagre *Genidens genidens* ter sido maior que 100% pode ser explicado pelas diferenças metodológicas e diferentes sensibilidades dos equipamentos utilizados para mercúrio total e para metilmercúrio. Os percentuais acima de 90% de metilmercúrio encontrados para as hemácias estão

de acordo com indicado por outros autores (LOCKHART *et al.*, 1972), para humanos, onde as hemácias podem ser utilizadas como indicadores de exposição por metilmercúrio e o plasma por mercúrio inorgânico.

O percentual de metilmercúrio em músculo encontrado para os bagres *Genidens genidens* está de acordo com a maior parte dos trabalhos anteriormente relatados, onde a estimativa do percentual permanecia entre 70 a 90% (HUCKABEE *et al.*, 1979; AKAGI *et al.*, 1994). Já para as cocorocas, o percentual encontrado foi bem mais baixo. Outros trabalhos já observaram percentuais baixos de metilmercúrio para peixes marinhos. KEHRIG *et al.* (2001) encontraram percentuais de metilmercúrio de 98% para a corvina *Micropogonias furnieri* e de 32 a 62% para a tainha *Mugil lisa* coletadas na Baía de Guanabara. A diferença foi explicada devido ao hábito alimentar da tainha ser herbívoro e o da corvina ser carnívoro.

KANNAN *et al.* (1998) encontraram percentuais entre 45 e 124% de metilmercúrio para 10 espécies de peixes coletadas em estuários na Flórida, EUA. No entanto, um dos espécimes de bagres coletados apresentou apenas 20% de metilmercúrio no músculo. Uma das hipóteses apresentadas para a ocorrência deste percentual baixo foi a de que peixes juvenis que passam maior tempo perto de sedimentos contaminados apresentam menor percentual de metilmercúrio.

SWEET; ZELIKOFF (2001) relatam que em peixes de áreas não contaminadas, a variação no percentual de metilmercúrio em relação ao mercúrio total na amostra de músculo de peixe pode ser de 30 a 100%. LASORSA, ALLEN-GIL (1995) encontraram 100% de metilmercúrio em músculo de peixes piscívoros no Alasca e somente 40 a 80% de metilmercúrio no fígado desses peixes.

Para a espécie *Genidens genidens*, dentre as 8 amostras com determinação de metilmercúrio, 2 eram de peixes jovens da Praia da Bica e 5 eram de jovens do Gradim. Somente uma era de um espécime adulto coletado no Gradim. De modo geral, os espécimes jovens apresentaram um percentual mais alto, estando os dados bem relacionados com o tamanho dos espécimes (Figura 29). A média do percentual de mercúrio encontrada para os jovens na Praia da Bica foi de 72,3% e para os jovens mais o único adulto no Gradim foi de 99,4%. Nenhum desses espécimes teve seu sexo determinado, lembrando que foram coletados todos na mesma campanha.

Para a cocoroca *Haemulon* sp., todas as amostras são relativas a estação Jurujuba, sendo das 6 amostras, 4 oriundas de espécimes adultos e 2 de espécimes jovens. Estes apresentaram respectivamente, 25,5% e 42,9% de metilmercúrio nas amostras de músculo, demonstrando novamente uma indicação da diminuição do percentual com o tamanho. No entanto, a relação encontrada entre essas duas variáveis foi menos forte do que para a espécie de bagre *Genidens genidens*, possivelmente pelo baixo número de espécimes jovens (Figura 30).

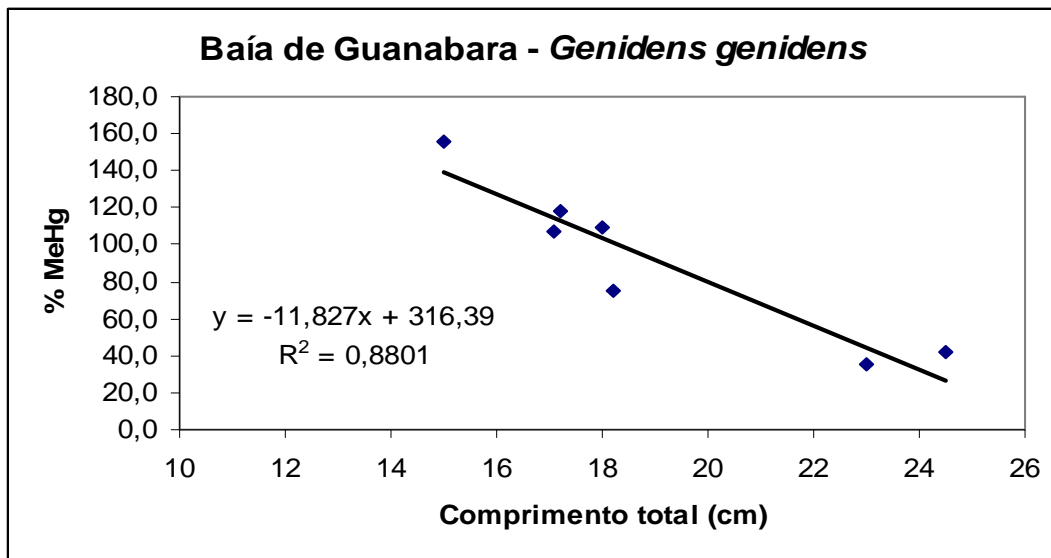


Figura 29. Relação entre tamanho e percentual de metilmercúrio em músculo de bagres *Genidens genidens* coletados na Baía de Guanabara, em março de 2008.

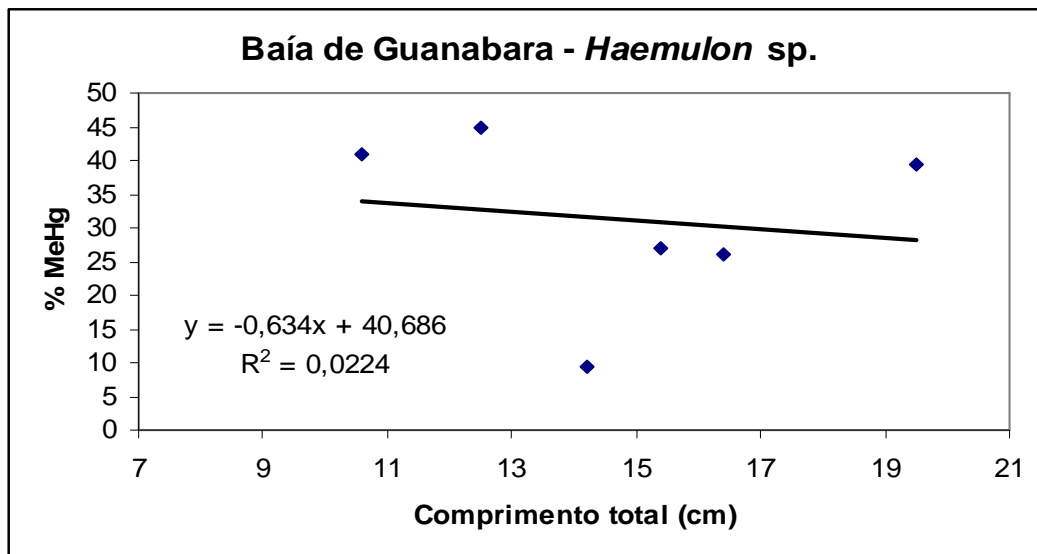


Figura 30. Relação entre tamanho e percentual de metilmercúrio em músculo de cocorocas *Haemulon* sp. coletadas na Baía de Guanabara, em março de 2008.

Dentre as cocorocas adultas *Haemulon* sp., 2 eram fêmeas, 1 era macho e 1 não foi identificado o sexo. As fêmeas apresentaram um percentual de metilmercúrio maior (26,6%) do que o macho (9,5%), mas o número de amostras é pequeno para poder indicar um acúmulo maior de metilmercúrio por fêmeas nesta área.

Na tabela 4 do capítulo 5.1 (página 95) foram apresentados os valores médios encontrados para os parâmetros biométricos e as concentrações de mercúrio nas diversas matrizes estudadas. De modo geral, as espécies apresentaram comportamentos diferenciados em relação a distribuição e posterior acumulação do mercúrio no organismo. Na Baía de Guanabara, os níveis de mercúrio em músculo (HgM) e em fígado (HgF) encontrados para o bagre *G. genidens* e a cocoroca *Haemulon* sp. foram diferentes (Anova, $p < 0,05$), sendo os níveis mais altos em músculo encontrados na cocoroca e os mais altos no fígado encontrados no bagre. Na Baía da Ribeira, essas espécies também mostraram níveis diferentes de mercúrio em músculo e fígado, no entanto, ambas foram maiores para *G. genidens* ($p < 0,001$; $F = 26,4$). A espécie de bagre com maior concentração de HgHe foi a que apresentou maior concentração de HgM, *A. luniscutis*, sendo diferente das concentrações em *G. genidens* ($p < 0,005$) e em *H. steindachneri* ($p < 0,001$). Essa diferença pode ser reflexo da exposição ao mercúrio e em qual das suas formas ele se encontra predominantemente.

Observando os resultados encontrados para as hemácias, que possuem alta afinidade por MeHg, pode-se entender melhor sobre a exposição atual dos espécimes coletados ao mercúrio. Para as concentrações de mercúrio em hemácias (HgHe), o bagre *Aspistor luniscutis* apresentou as maiores concentrações de HgHe tanto em relação a outra espécie de bagre *G. genidens* ($p < 0,001$) quanto em relação a cocoroca *H. steindachneri* ($p < 0,001$). O bagre *G. genidens* e a cocoroca *H. steindachneri* não são diferentes nesse parâmetro.

Se a concentração de mercúrio em hemácias é igual, indicando uma mesma exposição atual a MeHg, logo as duas espécies teoricamente teriam níveis de concentração em músculo similares. No entanto, elas demonstraram diferentes acumulações no músculo e no fígado, tendo as cocorocas, uma menor acumulação.

Para verificar se essas diferenças são devido aos mecanismos de excreção inerente a cada espécie, seriam necessárias determinações de metilmercúrio nos

organismos da Baía da Ribeira, verificar níveis de Hg nos rins de cocorocas e determinar os percentuais de metilmercúrio nos órgãos internos. Estimar a taxa de excreção do mercúrio inorgânico e orgânico em laboratório poderia esclarecer essa possível diferença na acumulação.

Outra hipótese é a excreção do metilmercúrio pelas escamas das cocorocas a exemplo do que ocorre em humanos com a excreção de metilmercúrio pelo cabelo. A eliminação pela transferência para o cabelo é mais baixa em humanos do que em ratos (CARRIER *et al.*, 2001). Como os bagres não possuem escamas, essa via de excreção do metilmercúrio seria inexistente para esta espécie, acumulando-o eficientemente. CEMBER *et al.* (1976) demonstraram que as combinações químicas realizadas entre o Hg e os constituintes sanguíneos provavelmente determinam, em grande escala, o mecanismo de distribuição e eliminação do Hg pelas fezes via bile ou por secreção da mucosa intestinal, através das excretas após passagem pelos rins ou até mesmo pela descamação de células epiteliais contendo mercúrio agregado. Acredita-se que na superfície da pele dos peixes, exatamente na camada de muco que os revestem, possa ocorrer a metilação do mercúrio inorgânico (WIENER *et al.*, 2001). No caso dos bagres, como possuem muito muco e nenhuma escama, esse metilmercúrio produzido pode estar entrando em contato direto com a pele e sendo absorvido.

Diferenças no fluxo de sangue nos diferentes tecidos são as causas das características da eliminação poliexponencial e multicompartmental de uma substância qualquer, incluindo o mercúrio, determinando o ritmo de absorção e excreção desta substância (BARRON, 1990). Fatores externos ou ambientais como a temperatura podem modificar a velocidade de ventilação do animal, modificando a velocidade no fluxo sanguíneo, logo aumentando a velocidade de absorção e de excreção do organismo.

Como ambas as espécies de peixe estão carreando na corrente sanguínea um percentual igual de metilmercúrio e as concentrações de mercúrio total encontradas foram similares, esses peixes estão igualmente expostos ao metilmercúrio na Baía de Guanabara. No entanto, elas apresentaram padrões diferenciados de incorporação e acumulação do metilmercúrio no músculo. As concentrações de mercúrio total nas cocorocas são mais altas do que nos bagres.

Entretanto, cerca de 70% dessa concentração é de outras formas de mercúrio. Para explicar porque duas espécies, expostas a concentrações iguais de mercúrio, retratadas pelo mercúrio no sangue, possuem uma diferença tão grande no percentual de metilmercúrio, podem ser citadas algumas hipóteses.

A primeira está relacionada a eficiência de excreção do metilmercúrio do organismo. Nos bagres, a relação entre músculo e rins é praticamente de 1:1, mostrando um equilíbrio entre essas matrizes. O fígado apresentou uma concentração 3 vezes maior. Neste caso, o mercúrio inorgânico parece estar sendo retido no fígado, transformado e eliminado com eficiência pelo rim. O Hg no plasma desses bagres denota que os mesmos também estão expostos ao mercúrio inorgânico. Mas este deve ser eliminado rapidamente e o metilmercúrio continua no organismo ficando acumulado no músculo. Já nas cocorocas, o fígado tem quase duas vezes mais que o músculo, mas não há informação sobre os rins. Como tem muito mercúrio supostamente inorgânico no músculo, pode-se imaginar que o fígado não consegue reter eficientemente o mercúrio inorgânico ou leva-lo até os rins para ser excretado, sendo acumulado em outros órgãos por uma ineficiência de sua excreção.

Outra hipótese está ligada à capacidade de metilação e de demetilação do mercúrio pelos peixes. O metilmercúrio pode estar sendo absorvido pela alimentação por ambas as espécies de peixe, mas nas cocorocas ele seria demetilado, gerando mercúrio inorgânico dentro do organismo. Ou até mesmo, a exposição dos peixes ao mercúrio seria preferencialmente de Hg inorgânico, sendo transformado em metilmercúrio eficientemente no trato intestinal dos bagres, mas não no das cocorocas. A demetilação dos compostos orgânicos de Hg dentro do organismo pode levar a exposição deste ao mercúrio inorgânico, que pode permear as camadas lipídicas das membranas, sendo citotóxico (SWEET, ZELIKOFF, 2001). Essa demetilação pode ser realizada em células dos rins. A biodisponibilidade do Hg pode ser afetada também por variações no pH e nas concentrações de íons Cl^- no estômago do animal. Baixo pH e altos níveis de íons cloreto podem favorecer a formação de cloreto de metilmercúrio, que rapidamente transportado pela corrente sanguínea (SWEET, ZELIKOFF, 2001).

Estima-se que a conversão do mercúrio orgânico a inorgânico por organismos

pode variar entre 10 a 90% no citossol dos rins, 5% nas mitocôndrias do cérebro e 30% nas mitocôndrias do fígado, através de mecanismos de biotransformação incluindo a flora microbiana, a produção de formas reativas de oxigênio e interação com grupos sulfidríla (SWEET, ZELIKOFF, 2001). O metilmercúrio ingerido por alimento pode ter seu radical alquil retirado antes mesmo de sua excreção, sendo transformado em Hg^{+2} no próprio tecido.

A demetilação ocorre em duas etapas. A primeira retira o grupamento metila para gerar Hg^{+2} e metanol. A segunda transforma o Hg^{+2} em Hg^0 , facilmente eliminado pela respiração (WIENER *et al.*, 2003). Esse processo pode ocorrer no fígado e de lá o Hg^0 é carregado na corrente sanguínea até os pulmões ou até às brônquias para ser eliminado.

Em humanos, o mecanismo de transformação do metilmercúrio inicia-se no fígado, seguindo o mesmo caminho do mercúrio inorgânico. Ambos formam complexos com a glutatona, que é excretada pela bile, voltando ao intestino. Entretanto, o metilmercúrio é rapidamente reabsorvido enquanto o mercúrio inorgânico consegue ser eliminado junto com as fezes. Se o metilmercúrio alcança partes do intestino delgado onde a microflora local possa quebrar-lo, retirando o grupo metila, o mercúrio consegue ser eliminado pelas fezes. Os rins excretam apenas uma pequena quantidade de metilmercúrio, pois lá também ocorre reabsorção desta substância nos túbulos renais (CLARKSON, 1994).

Uma terceira hipótese deve-se a diferenças nas vias de exposição dessas espécies ao metilmercúrio. Os bagres poderiam estar expostos ao metilmercúrio também via dérmica por contato com o sedimento ou via brônquias, com uma absorção mais rápida desta forma de mercúrio no músculo.

Em humanos, a transferência do mercúrio orgânico acumulado no corpo para as fezes é 100 vezes menor do que em ratos, não sendo excretado pela urina. Essa diferença na eliminação do metilmercúrio pelas fezes entre humanos e ratos pode ser explicada por diferenças na excreção biliar, que é parcialmente eliminada nas fezes após conjugação com glutatona e seus derivados (CARRIER *et al.*, 2001). Características morfológicas do trato intestinal irão influenciar na absorção de substâncias em geral. Intestinos mais longos geram a possibilidade de uma melhor absorção do que foi ingerido. Peixes herbívoros possuem um trato digestivo mais

longo do que o de carnívoros (REINFELDER *et al.*, 1998). É possível que estas espécies tenham diferença de tamanho desse intestino.

Outro fato relevante é que animais carnívoros, apesar de serem topo de cadeia, podem ser afetados por biotransformações de elementos-traço ocorridas no organismo da presa, em processos de detoxicação (REINFELDER *et al.*, 1998).

Em relação ao mercúrio inorgânico, a transferência do sangue para o cabelo é 5 vezes menor que no rato, no entanto para humanos o papel de retenção desta forma do Hg pelos rins é mais pronunciado, sendo 19 vezes maior do que em ratos. E boa parte do que ficou retido nos rins não volta a corrente sanguínea, sendo acumulado no próprio rim ou excretado através da urina. Isso faria com que o mercúrio inorgânico estivesse menos disponível para acúmulo em outros tecidos como o muscular ou o cerebral (CARRIER *et al.*, 2001).

A eficiência de absorção dos nutrientes oriundos do alimento para peixes carnívoros está em torno de 80%. Já para herbívoros, em torno de 40 a 50% (BONE *et al.*, 1999). Mas a eficiência de absorção é diferenciada para cada item alimentar. A bioacumulação do metilmercúrio é dependente da eficiência da absorção do item alimentar, o percentual de metilmercúrio que este item contém e o total de alimento consumido (RODGERS, 2004).

Em geral, orgânicos hidrofóbicos são mais difundidos pelas células do que se mover por espaços intercelulares ou por canais intracelulares. O fluxo de sangue em diferentes órgãos. O fluxo é intenso em alguns órgãos do que em outros (SWEET, ZELIKOFF, 2001).

Em bivalves, quando partículas de sedimento estão enriquecidas em óxidos de ferro, a assimilação dos metais adsorvidos na superfície é mais baixa do que em sedimentos ricos em matéria orgânica. Isso poderia explicar diferenças na acumulação entre bagres e cocorocas, visto que a ingestão de sedimentos é eminente em bagres.

5.5 DISTRIBUIÇÃO INTERNA

Objetivo específico 5: biomarcadores de exposição II: investigar a distribuição interna do mercúrio nos peixes estudados.

Neste capítulo, serão discutidos os resultados de mercúrio total encontrados para todas as matrizes estudadas – sangue, fígado, rim, conteúdo estomacal e músculo e suas relações. Também será abordada a possível diferença entre acumulação do mercúrio entre machos e fêmeas, diferenciação esta realizada durante a dissecação dos espécimes coletados nas duas áreas. Diferenças na acumulação entre jovens e adultos serão abordadas, bem como a possível influência de uma alimentação recente nas concentrações de Hg em sangue.

Dentro do peixe, durante o processo digestivo e de absorção dos nutrientes, o mercúrio vai ser distribuído para o corpo através do sangue. No sangue, as formas orgânicas, em especial o metilmercúrio, apresentam alta afinidade pelas hemácias, como pode ser observado no capítulo anterior e descrito por outros autores anteriormente (CEMBER, 1968). O Hg inorgânico permanece ligado a proteínas plasmáticas, como a albumina.

Como todo elemento não essencial, sem função conhecida no organismo, o primeiro órgão a tentar retirar do organismo o que não é essencial para ele é o fígado. Mas nem todas as tentativas de transformar o que é tóxico em não tóxico dão certo. Um dos mecanismos de detoxicação do organismo depois da exposição a metais é a produção de metalotioneína, capaz de complexar metais e não deixar que eles atinjam órgãos vitais ao organismo exposto. O mercúrio inorgânico tenderá a ser excretado, podendo alcançar os rins, que nos peixes, também é um órgão hematopoiético. O que não é excretado é acumulado, em especial em tecidos muscular e cerebral, no caso de metilmercúrio, que tem uma taxa de excreção bem menor.

Foram investigadas as possíveis correlações entre os dados de mercúrio nas diferentes matrizes para cada espécie estudada. Para *G. genidens*, as concentrações de Hg encontradas em todas as matrizes estão relacionadas positivamente com o tamanho e o peso dos espécimes ($p < 0,001$). O mercúrio nas hemácias está positivamente relacionado às concentrações de Hg nos outros

órgãos, denotando que uma maior concentração no sangue, que está distribuindo os nutrientes pelo organismo, irá carrear mais Hg para outros tecidos, causando bioacumulação. O Hg no músculo também está relacionado positivamente com os outros órgãos ($p < 0,001$), o que pode indicar uma estreita relação entre esses parâmetros, mostrando que há uma proporcionalidade das concentrações entre os órgãos.

Uma correlação interessante encontrada foi entre o mercúrio no conteúdo estomacal e no fígado, que seria uma das primeiras portas de entrada do mercúrio digerido e absorvido no trato intestinal, contudo o número de análises é pequeno, sendo considerado apenas como indicação (0,69; $p < 0,05$; $n=11$). Relações fortes entre o Hg no conteúdo estomacal e o Hg no músculo foram registradas anteriormente para dois mamíferos carnívoros coletados em Rhode Island, Estados Unidos (LAKE *et al.*, 2006). No presente trabalho, não houve identificação de todos os itens alimentares encontrados no conteúdo estomacal. Somente os observados a olho nu foram anotados em forma de observação durante a dissecação. Os itens encontrados foram descritos anteriormente no capítulo 5.2.

Para cocorocas, as relações encontradas foram similares. Da mesma forma, as concentrações de mercúrio estavam correlacionadas com peso e tamanho ($p < 0,001$), bem como a concentração nas hemácias esteve correlacionada com as concentrações em fígado (0,70; $p < 0,001$) e músculo (0,74; $p < 0,001$).

5.5.1 Distribuição interna do mercúrio total

De acordo com as correlações encontradas, foram investigadas as proporções de Hg acumulado em cada órgão, tentando simular um caminho preferencial do Hg em cada área e para cada espécie de peixe. Na tabela 13, estão demonstradas as médias encontradas para algumas relações entre as concentrações de Hg nos diversos órgãos.

Na Baía de Guanabara, o bagre *G. genidens* mostrou valores mais altos para as relações (razões) entre HgHe/HgPI ($F=10,6$; $p < 0,005$) e HgF/HgHe ($F=21,8$; $p < 0,001$) em relação a cocoroca *H. sp.* Já a cocoroca apresentou os maiores valores para HgM/HgHe ($F=5,2$; $p < 0,05$) e para HgM/HgF ($F=35,7$; $p < 0,001$). Na Baía da

Tabela 13. Médias \pm desvio padrão das relações (razões) entre as concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), hemácias (HgHe), plasma (HgPI); fígado (HgF), rim (HgR) e conteúdo estomacal (HgEt) de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= número de espécimes.

Área/Espécies	HgHe/HgPI	HgM/HgHe	HgF/HgHe	HgR/HgHe	HgEt/HgHe	HgM/HgF	HgM/HgR	HgM/HgEt
Baía da Ribeira								
<i>G. genidens</i>	24,8 \pm 13,9 (9)	8,0 \pm 5,9 (59)	28,0 \pm 25,6 (37)	13,2 \pm 18,6 (39)	-	3,1 \pm 9,9 (57)	0,8 \pm 0,2 (59)	-
<i>H. steindachneri</i>	20,5 \pm 7,3 (3)	5,2 \pm 1,7 (26)	15,5 \pm 6,0 (21)	-	-	0,4 \pm 0,1 (37)	-	-
<i>A. luniscutis</i>	19,7 \pm 15,1 (15)	3,7 \pm 2,2 (25)	15,1 \pm 9,8 (19)	337,7 \pm 112,4 (38)	-	1,2 \pm 5,2 (30)	0,7 \pm 0,3 (31)	-
Baía de Guanabara								
<i>G. genidens</i>	5,2 \pm 7,6 (21)	4,7 \pm 3,2 (33)	15,5 \pm 9,5 (33)	60,6 \pm 50,5 (62)	2,7 \pm 3,4 (6)	0,3 \pm 0,2 (62)	0,8 \pm 0,5 (62)	1,4 \pm 2,3 (11)
<i>H. sp.</i>	21,1 \pm 28,9 (11)	4,9 \pm 2,4 (27)	6,7 \pm 3,5 (26)	-	-	0,9 \pm 0,5 (50)	-	-

Ribeira, os bagres *G. genidens* e *A. luniscutis* mostraram uma relação diferente para HgM/HgHe ($p < 0,001$).

Levando em consideração diferenças entre áreas, pode-se observar que maiores valores para as relações entre HgHe/HgPI ($F=5,4$; $p < 0,05$), HgM/HgF ($F=20,9$; $p < 0,001$) na Baía da Ribeira para o bagre *G. genidens*. Para as cocorocas, o inverso é verdadeiro, os maiores valores para a relação HgM/HgF foram encontrados para a Baía de Guanabara ($F=27,0$; $p < 0,001$). Os maiores valores para a relação HgM/HgR foram encontradas na Baía de Guanabara ($F=11,5$; $p < 0,001$). As razões HgM / HgF encontradas foram similares às relatadas por Downs *et al* (1999), variando de 0,5 a 1,6. Já para peixes coletados em águas costeiras ao sul do mar do Caribe, costa da Venezuela, esta razão foi bem menor, alcançando o valor mínimo de 0,2 (SHRESTHA, NOGUEIRA, 1988).

Alguns trabalhos utilizam a razão das concentrações de MeHg encontradas em músculo e em fígado para avaliar um possível equilíbrio das concentrações de Hg em peixes (LASORSA, ALLEN-GIL, 1995; DOWNS *et al.*, 1999). Uma razão HgM:HgF > 1 indicaria um equilíbrio do peixe e o ambiente em que vive; uma razão > 1,5 sugeriria um decréscimo do conteúdo de Hg; e, uma razão < 1, que o peixe migraria de uma área para outra, variando os graus de contaminação aos quais ele estaria exposto. Como não foi possível mensurar as concentrações de metilmercúrio em músculo de espécimes da Baía da Ribeira e como não houve determinações em fígado para nenhuma das duas áreas, esta razão não poderia ser utilizada no momento, visto que variações consideráveis no percentual de metilmercúrio podem ser encontradas entre áreas (30 a 90%).

As razões encontradas para HgM:HgHe foram mais altas do que as encontradas anteriormente (4:1), indicando uma maior acumulação de Hg nessas espécies após 4 anos. As razões de HgHe e HgPI seguem a tendência apontada em literatura, onde o Hg estaria mais concentrado nas hemácias do que no plasma sanguíneo (RIBEYRE, BOUDOU, 1984).

As concentrações de Hg encontradas em hemácias das espécies estudadas variaram de 5 a 25 vezes maiores do que as encontradas no plasma. Essas relações foram muito mais altas do que as encontradas anteriormente para ambas as áreas e espécies (RODRIGUES, 2006), onde a razão entre essas matrizes foi de 6:1. Para

seres humanos, resultados como este, indicariam que esses peixes estão expostos ao mercúrio orgânico, já que essa forma de Hg possui maior afinidade pelas hemácias do que o inorgânico encontrado no plasma sanguíneo, como demonstrado no capítulo anterior (5.4). Esse aumento na exposição ao mercúrio orgânico foi mais pronunciado para os espécimes coletados na Baía da Ribeira. Para *G. genidens* da Baía de Guanabara foram encontradas as menores razões, demonstrando que este está menos exposto ao metilmercúrio, mas, no entanto, apresenta proporções de metilmercúrio no músculo maiores que as das cocorocas.

Entre espécies de peixes marinhos podem ser encontradas diferenças morfológicas nos rins, tanto no tamanho, como já reportado neste trabalho (rins de bagres são maiores), quanto em relação a histologia, possuindo diferentes néfrons, com redução do glomérulo ou até mesmo a sua perda. O número de néfrons ativos também pode ser diferente, o que leva a diferenças na produção de urina (BONE *et al.*, 1999).

5.5.2. Relação entre Hg e o percentual de estômagos cheios e vazios

Como a maior via de exposição dos peixes ao mercúrio é via alimentação, investigou-se quaisquer alterações nas concentrações de Hg nos órgãos estudados de acordo com a ingestão recente de alimentos, em especial a possível influência direta nas concentrações sanguíneas devido a exposição recente pela digestão do alimento. Nas figuras 31 e 32 são apresentadas as concentrações de mercúrio em hemácias de acordo com a frequência de estômagos cheios e vazios.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre esses parâmetros para nenhuma das espécies estudadas. No entanto, para *G. genidens*, oriundos da Baía de Guanabara observou-se uma diferença significativa entre as concentrações de mercúrio total em plasma e a ingestão recente de alimentos ($F=5,5$; $p<0,05$), com médias de $61,0\pm 90,7$ ng/g ($n=18$) para espécimes com estômago cheio e de $2,2\pm 1,3$ ng/g ($n=9$) para os espécimes com estômago vazio. Isto pode estar demonstrando um carreamento do Hg pelo plasma logo após sua absorção no trato intestinal, teoricamente inorgânico.

Os resultados sugerem que os itens alimentares consumidos pelos peixes da

Baía da Ribeira devem estar mais enriquecidos em metilmercúrio, conseqüentemente este mercúrio acaba sendo mais acumulado na hemácia do que no plasma. Já na Baía de Guanabara, as fontes de Hg inorgânico parecem ser importantes, ficando este mercúrio inorgânico após a absorção e conseqüente chegada à corrente sanguínea preferencialmente no plasma, sendo mais facilmente excretado do que o Hg orgânico.

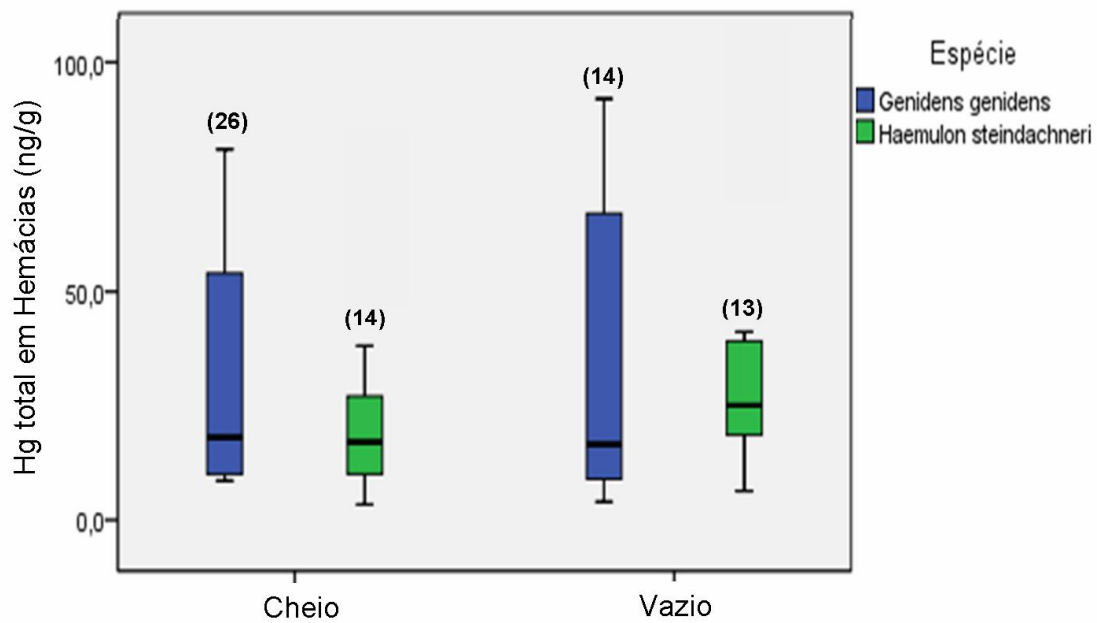


Figura 31. Concentração de mercúrio em sangue (ng/g, peso úmido) de acordo com a ingestão de alimento, levando-se em consideração espécimes com estômago vazio ou cheio, de bagre *G. genidens* e cocoroca *H. sp.* capturados na Baía de Guanabara. (n)= número de espécimes.

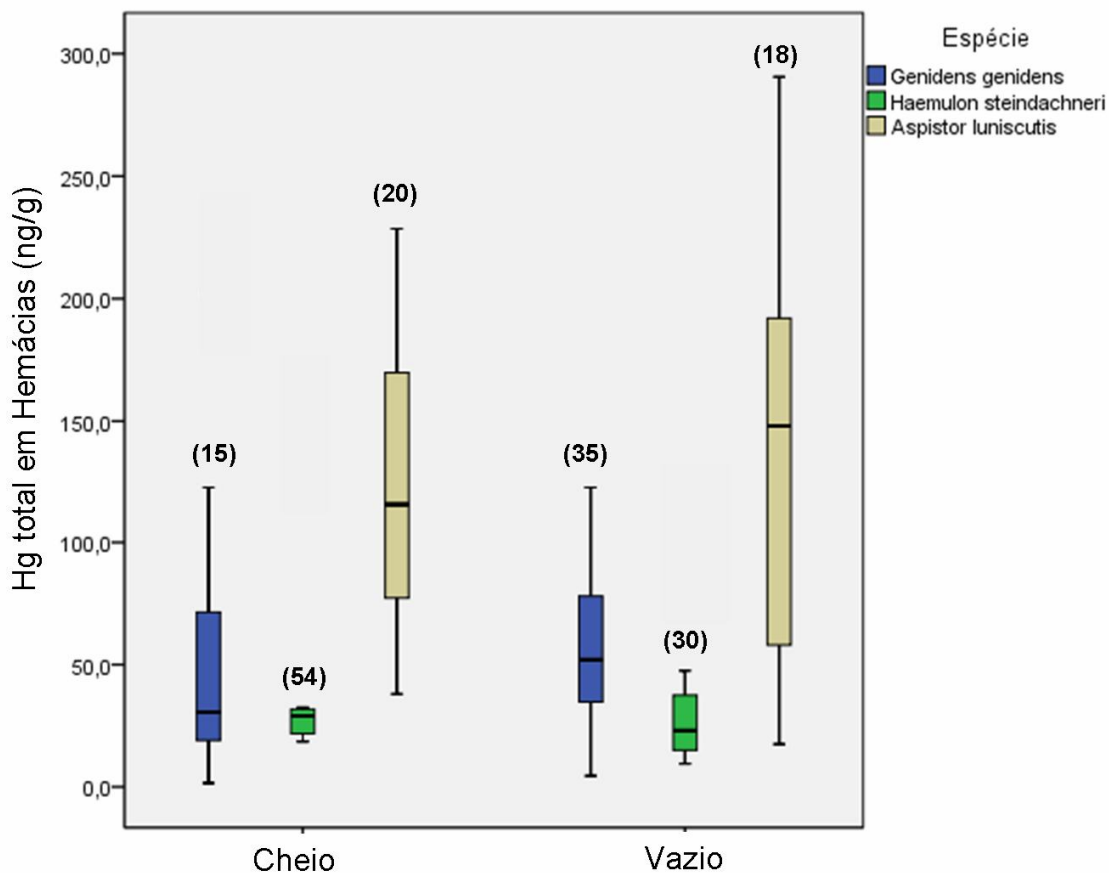


Figura 32. Concentração de mercúrio em sangue (ng/g, peso úmido) de acordo com a ingestão de alimento, levando-se em consideração espécimes com estômago vazio ou cheio, de bagre *G. genidens* e *A. luniscutis* e de cocoroça *H. sp.* capturados na Baía da Ribeira. (n)= número de espécimes.

5.5.3 Acumulação de Hg em relação ao estágio de vida

Quando se trata de exposição de algum animal a uma substância tóxica, um dos fatores importantes é o tempo de exposição, que pode ser estimado pelo tamanho do espécime, estando implícito no cálculo de dose. Por isso, quando uma substância é acumulativa, espera-se que adultos possuam uma maior concentração desta substância do que os jovens, variando de acordo com a idade, ou seja, com o tempo de exposição. Foram investigadas possíveis diferenças entre os espécimes jovens e adultos coletados em ambas as áreas. Nas figuras 33 e 34 são apresentadas as concentrações de mercúrio total classificadas por estágio de vida

do animal.

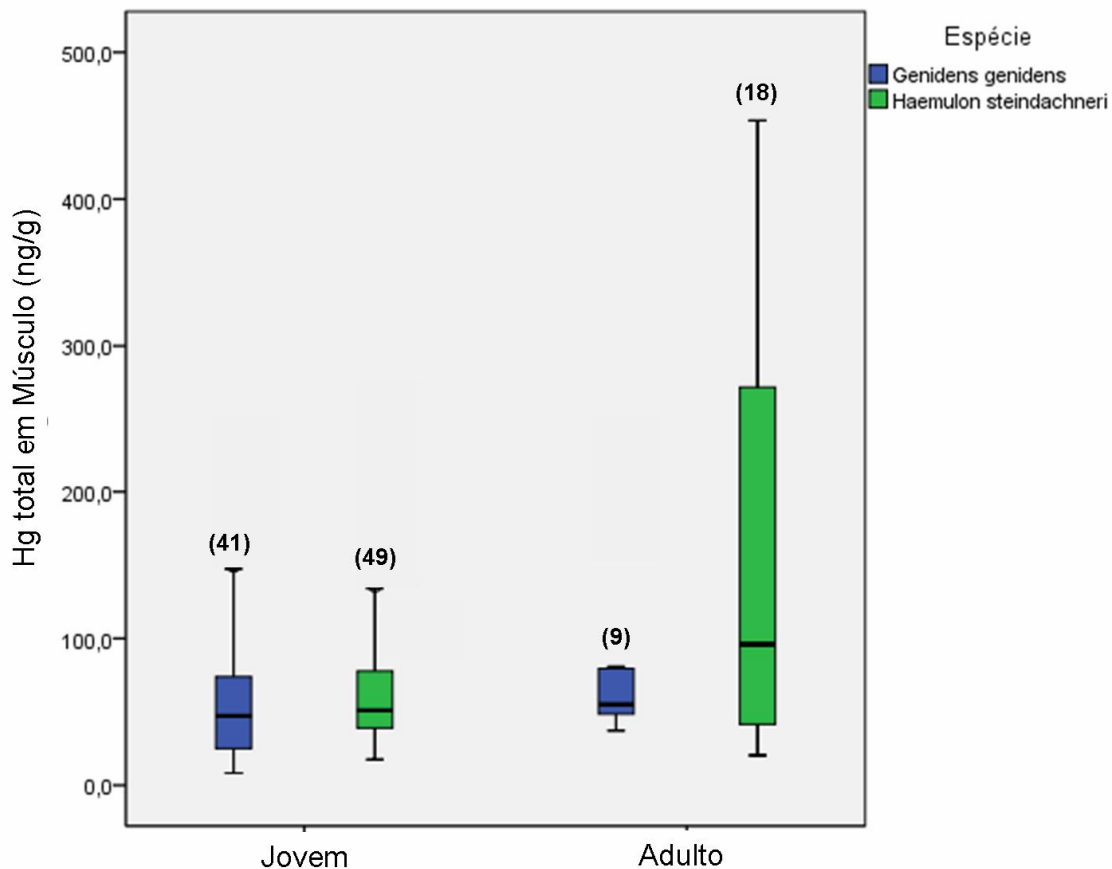


Figura 33. Concentração de mercúrio em músculo (ng/g, peso úmido) de acordo com o estágio de vida do animal, levando-se em consideração espécimes jovens e adultos, de bagre *G. genidens* e cocoroca *H. sp.* capturados na Baía de Guanabara. (n)= número de espécimes.

Na Baía da Ribeira, o percentual de jovens coletados da espécie *G. genidens* foi de 92,2%, sendo maior do que na Baía de Guanabara (82%). Para a cocoroca, na Baía da Ribeira, 80% dos indivíduos da espécie *H. steindachneri* eram jovens, e na Baía de Guanabara, 73,1%. Para o bagre *A. luniscutis*, a proporção entre jovens e adultos foi equilibrada, obtendo-se 48,6% e 51,4%, respectivamente.

Na baía da Ribeira, os espécimes adultos do bagre *G. genidens* apresentaram concentrações HgM similares a espécimes jovens. No entanto, as concentrações de mercúrio total em fígado ($F=4,2$; $p<0,05$) e em rim ($F=37,0$; $p<0,001$) são mais altas nos adultos ($1.560,3\pm 1259,7\text{ng/g}$; $1.092,1\pm 634,0$,

respectivamente) do que em jovens ($1.024,5 \pm 693,6 \text{ ng/g}$; $321,9 \pm 148,9 \text{ ng/g}$, respectivamente).

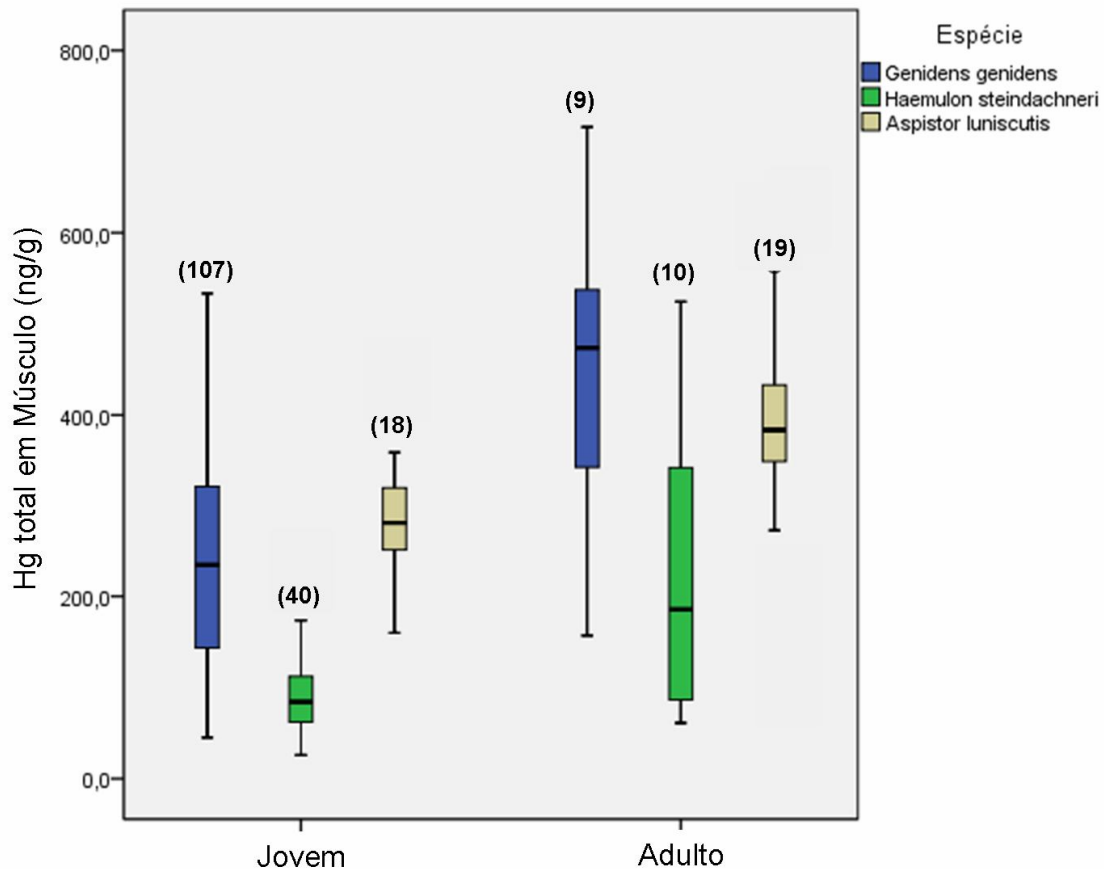


Figura 34. Concentração de mercúrio em músculo (ng/g, peso úmido) de acordo com o estágio de vida do animal, levando-se em consideração espécimes jovens e adultos, de bagre *G. genidens* e *A. luniscutis* e de cocoroca *H. sp.* capturados na Baía da Ribeira. (n)= número de espécimes.

Isto poderia estar demonstrando uma maior exposição dos adultos ao mercúrio inorgânico, pois tanto o fígado quanto o rim são órgãos responsáveis pelas transformações do mercúrio inorgânico para sua excreção. Ou até mesmo refletindo uma acumulação através do tempo de exposição mais longo (espécimes mais velhos), podendo comprometer o funcionamento de ambos os órgãos.

Para a outra espécie de bagre *A. luniscutis*, além das concentrações de mercúrio em fígado ($p < 0,05$) e em rim ($p < 0,01$) serem mais altas em adultos, as concentrações em músculo também o são ($p < 0,01$). De forma similar, a cocoroca *H.*

steindachneri também apresentou concentrações mais altas de HgM ($F=53,1$; $p<0,001$) e HgF ($F=10,8$; $p<0,001$) em adultos. Em especial, esta espécie também apresentou diferença em relação às concentrações em hemácias ($F=22,4$; $p<0,001$), mostrando que espécimes mais jovens estão expostos a uma dose menor de mercúrio, provavelmente devido a mudanças no hábito alimentar quando alcançam a vida adulta, cessando o consumo de zooplâncton e incluindo peixes em sua dieta, como retratado na literatura (CARVALHO-FILHO, 1999).

Na baía de Guanabara, o comportamento do mercúrio em relação ao estágio de vida nas cocorocas foi similar ao encontrado para a Baía da Ribeira, onde os espécimes adultos apresentaram concentrações mais altas para HgHe ($F=9,0$; $p<0,01$), HgM ($F=42,0$; $p<0,001$) e HgF ($F=13,1$; $p<0,001$).

Já para *G. genidens*, não houve diferença para as concentrações em fígado, somente para as concentrações nos rins ($F=5,2$; $p<0,05$). No entanto, apesar do número de análises ser pequeno, utilizando-se testes não-paramétricos, observou-se que há uma diferença entre jovens e adultos para as concentrações de Hg no plasma (Kruskal-Wallis, $p<0,005$), que são maiores nos jovens do que nos adultos. Apesar de não serem diferentes estatisticamente para HgM, o valor médio pareceu ser mais alto em adultos, acompanhando a indicação encontrada para os percentuais de metilmercúrio.

5.5.4 Acumulação de Hg em relação ao sexo

Alguns trabalhos apontam para possíveis diferenças na acumulação do mercúrio entre machos e fêmeas. Em bioensaio, HAMMERSCHMIDT *et al.* (2002) observaram que fêmeas apresentaram maiores concentrações de mercúrio do que machos, possivelmente devido a uma maior taxa de ingestão de alimento pelas fêmeas, que precisam de mais energia para a produção dos ovos. PHILIPS *et al.* (1990) demonstraram que espécimes machos de “*northern pike*” coletados em um reservatório apresentavam maiores concentrações de mercúrio do que fêmeas de mesmo tamanho, como consequência de uma menor taxa de crescimento dos machos. Além disso, boas relações entre o mercúrio total na fêmea e a concentração de metilmercúrio nos ovos produzidos por ela foram encontradas em

bioensaios por HAMMERSCHMIDT *et al.* (2005), evidenciando a transferência do mercúrio absorvido pela mãe para seus futuros filhotes. Por isso se torna importante a investigação das concentrações de mercúrio relacionando o sexo dos indivíduos.

Como não foram realizadas determinações de mercúrio nas gônadas dos peixes coletados nas baías, os dados de mercúrio nos órgãos estudados foram classificados de acordo com o sexo dos espécimes, para se observar quaisquer diferenças da acumulação do Hg.

Nas figuras 35 e 36 são observadas as concentrações de Hg total em músculo de acordo com o sexo dos espécimes coletados. Em estágios gonadais iniciais, as gônadas de machos e de fêmeas são de difícil identificação sem a utilização de cortes histológicos. Na Baía da Ribeira, 60,5% dos indivíduos de *G. genidens* coletados não tiveram a identificação do sexo, por serem muito jovens. Dos espécimes com sexo identificado, 5,9% foram machos e 33,6% fêmeas. Para a *H. steindachneri*, 56,% dos indivíduos não foram identificados, 35,8% foram identificados como machos e 7,5 como fêmeas. Para o bagre *A. luniscutis*, 36,8% não foram identificados, 28,9% eram machos e 34,2% eram fêmeas.

Na Baía de Guanabara, o percentual de indivíduos sem sexo identificado para o bagre *G. genidens* foi maior, 83,9%. Dos 16,1% de indivíduos com sexo identificados, todos eram fêmeas. A cocoroca *H. sp.*, com 60% de indivíduos não identificados, 15,4% de machos e 24,6% de fêmeas.

Na baía da Ribeira, os bagres *G. genidens* apresentaram maiores concentrações de Hg em rim (teste-t; $p < 0,001$) de machos ($1.006,2 \pm 767,4 \text{ ng/g}$) do que fêmeas ($394,1 \pm 210,1 \text{ ng/g}$). Não foi observada diferença nos níveis de mercúrio de acordo com o sexo para o bagre *A. luniscutis*.

Já para a cocoroca *H. steindachneri*, houve diferença significativa tanto para HgM (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$) quanto para HgF (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$), sendo ambas as concentrações mais altas nas fêmeas ($280,0 \pm 194,5 \text{ ng/g}$; $848,3 \pm 740,3 \text{ ng/g}$, respectivamente) do que nos machos ($145,4 \pm 95,6 \text{ ng/g}$; $396, \pm 166,9 \text{ ng/g}$, respectivamente). Essas maiores concentrações em fêmeas podem ser explicadas por um maior consumo de alimento visto que fêmeas tem um gasto energético maior por causa da produção de ovos, especialmente quando estes são

grandes e muito ricos em vitelo (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2002).

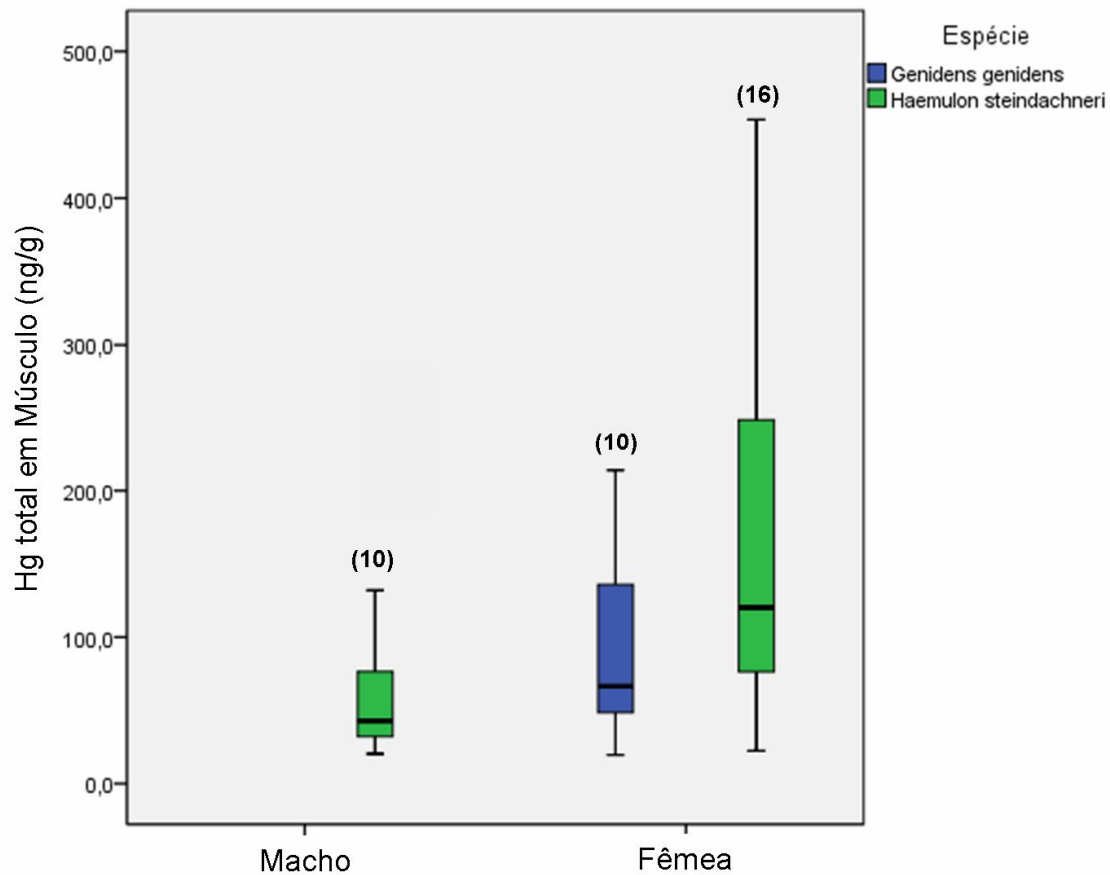


Figura 35. Concentração de mercúrio em músculo (ng/g, peso úmido) de acordo com o sexo do animal, levando-se em consideração espécimes machos e fêmeas de bagre *G. genidens* e de cocoroca *H. sp.* capturados na Baía de Guanabara.

Na baía de Guanabara, não foram observados machos da espécie de bagre *G. genidens*, não podendo ser analisada a ocorrência ou não de diferenças entre o sexo. Para a cocoroca *H. sp.*, as concentrações de Hg em músculo foram mais altas em fêmeas (teste-t; $p < 0,05$), seguindo o mesmo padrão apresentado pelas fêmeas da baía da Ribeira.

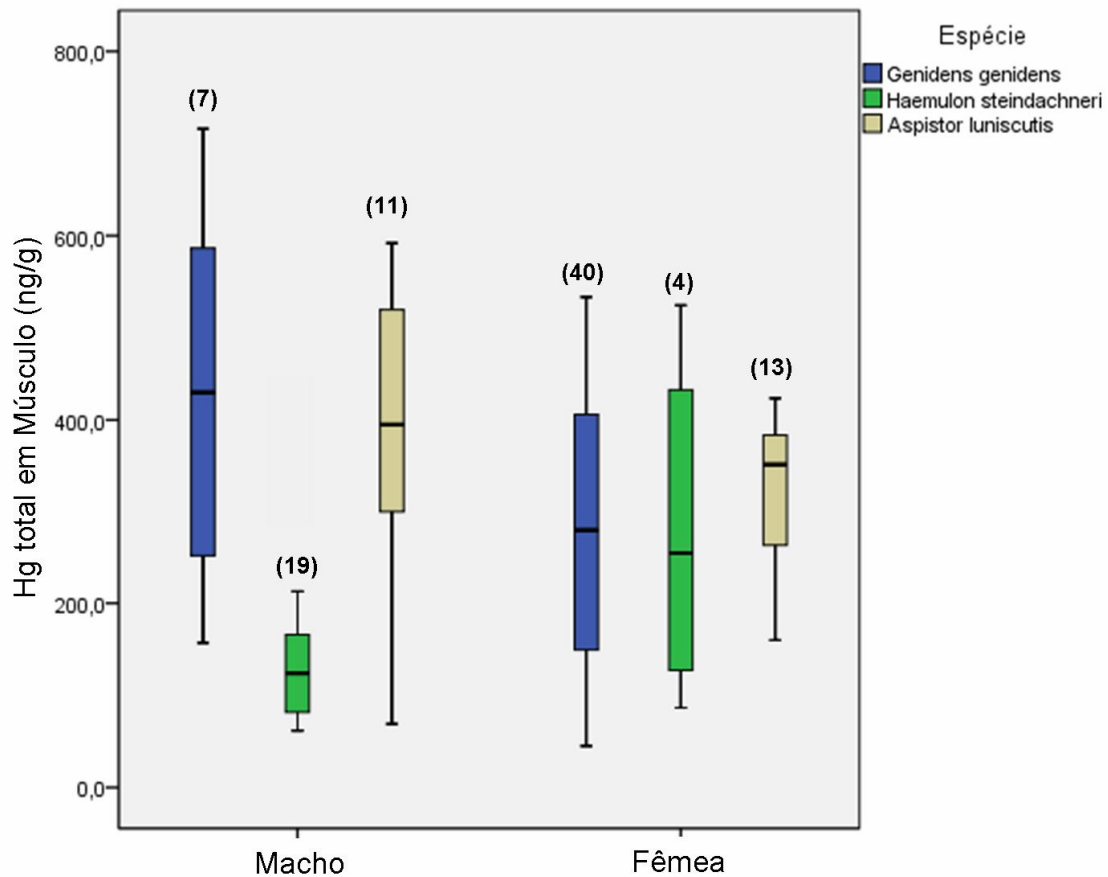


Figura 36. Concentração de mercúrio em músculo (ng/g, peso úmido) de acordo com o sexo do animal, levando-se em consideração espécimes machos e fêmeas de bagre *G. genidens* e *A. luniscutis* e de cocoroca *H. sp.* capturados na Baía da Ribeira.

Comparando entre áreas, os espécimes fêmeas de bagres *Genidens genidens* da Baía da Ribeira apresentaram maiores níveis de mercúrio em músculo do que as fêmeas coletadas na Baía de Guanabara (Teste-t; $p < 0,001$). Da mesma forma os níveis de mercúrio em músculo encontrados para os espécimes machos de cocoroca *Haemulon steindachneri* foram maiores na Baía da Ribeira (Teste-t; $p < 0,01$). Fêmeas desta espécie não apresentaram diferenças significativas entre áreas.

5.6 BIOMARCADORES DE EFEITO

Objetivo específico 6: avaliar a ocorrência de alterações em biomarcadores de efeito em sangue dos peixes oriundos das baías estudadas (hemograma; bioquímica sérica; micronúcleo; atividades enzimáticas) como consequência da exposição ao mercúrio e definir uma matriz de efeitos encontrados em ambas as áreas, de acordo com valores de referência.

Neste capítulo serão abordados os potenciais efeitos toxicológicos sobre os peixes das áreas estudadas através dos resultados encontrados para diversos biomarcadores de efeito, que são por definição qualquer resposta anatômica, fisiológica e/ou bioquímica de um organismo vivo, que, dependendo da magnitude, pode ser reconhecido como um comprometimento à saúde ou doença em um indivíduo, população ou comunidade no ecossistema (ATSDR, 1994).

5.6.1 Parâmetros hematológicos

Os resultados encontrados no presente trabalho para o eritrograma e leucograma estão apresentados nas tabelas 14 e 15, respectivamente. As espécies apresentaram valores distintos no eritrograma e no leucograma. Estas variações biológicas entre espécies acontecem naturalmente e estão aqui descritas de forma informativa. As duas espécies de bagres coletadas na Baía da Ribeira apresentaram a mesma variação nos parâmetros, indicando um mesmo padrão hematológico. De modo geral, tanto para os espécimes coletados na Baía da Ribeira quanto para os coletados na Baía de Guanabara, a hematimetria (número de hemácias por mm^3) é maior nas cocorocas *H. steindachneri* do que nos bagres *G. genidens*, tendo estes os maiores valores para hemoglobina, VGM e CHGM (Anova, $p < 0,001$). Ou seja, as cocorocas possuem um maior número de hemácias, com menor concentração de hemoglobina, com hemácias menores em tamanho. Bagres *G. genidens* por sua vez possuem menos hemácias, com maior tamanho e maior concentração de hemoglobina.

Esses valores para os parâmetros hematológicos variam de espécie para espécie, como descrito em Tavares-Dias, Moraes (2004). Para peixes teleósteos marinhos em média, são encontrados hematimetria de $2,3 \pm 0,9 \times 10^6/\text{mm}^3$,

hemoglobina de $13,4 \pm 5,8$ mg/L, hematócrito ou volume globular de $41 \pm 14,3\%$, VGM de $200 \pm 89,8$ fL e CHGM de $39,1 \pm 13,0\%$. Valores esses comparáveis aos encontrados no presente trabalho.

Tabela 14. Médias \pm desvio padrão dos valores encontrados para o hemograma de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. Hematimetria (H), volume globular ou hematócrito (VG), Hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e proteína plasmática total (PPT). (n)= número de espécimes.

Área/Espécies	H ($10^6/\text{mm}^3$)	VG (%)	Hb (mg/L)	VGM (fL)	CHGM (%)	PPT (g/dL)
Baía da Ribeira						
<i>G. genidens</i>	$1,6 \pm 0,3$ (38)	$38,1 \pm 10,8$ (40)	$10,4 \pm 1,2$ (22)	$243,1 \pm 82,8$ (38)	$25,2 \pm 5,4$ (22)	$5,3 \pm 1,2$ (39)
<i>H. steindachneri</i>	$3,1 \pm 0,5$ (37)	$32,5 \pm 8,4$ (38)	$9,8 \pm 0,9$ (28)	$114,9 \pm 57,9$ (35)	$31,9 \pm 7,5$ (27)	$5,4 \pm 0,9$ (38)
<i>A. luniscutis</i>	$1,3 \pm 0,4$ (10)	$36 \pm 10,7$ (10)	$9,4 \pm 1,7$ (9)	$285,4 \pm 73,2$ (10)	$27,7 \pm 7,0$ (9)	$5,9 \pm 1,3$ (10)
Baía de Guanabara						
<i>G. genidens</i>	$1,3 \pm 0,5$ (36)	$33,7 \pm 9,0$ (47)	$7,9 \pm 1,2$ (16)	$308,2 \pm 170,2$ (35)	$23,5 \pm 7,3$ (15)	$6,0 \pm 1,0$ (47)
<i>H. sp.</i>	$2,7 \pm 1,3$ (27)	$30,8 \pm 6,9$ (35)	$3,3 \pm 0,9$ (17)	$144,4 \pm 67,7$ (27)	$9,8 \pm 2,3$ (17)	$5,9 \pm 0,8$ (35)

Levando-se em consideração esses valores, as cocorocas *Haemulon* sp. coletadas na Baía de Guanabara apresentaram valores baixos tanto de hemoglobina quanto de CHGM, indicando uma deficiência na fabricação da hemoglobina pelo organismo, tendo como consequência um transporte de oxigênio menos eficiente, podendo levar a sérios danos ao organismo, visto que o oxigênio é necessário para a respiração celular.

Em relação ao leucograma, pode-se observar que a frequência de leucócitos e de trombócitos é diferente para as espécies *G. genidens* e *H. steindachneri*, em ambas as áreas, onde os bagres possuem mais leucócitos e menos trombócitos e as cocorocas, o inverso (Anova, $p < 0,05$). No entanto, na Baía de Guanabara, essas espécies apresentaram mais duas diferenças em relação a leucometria específica.

Tabela 15. Médias \pm desvio padrão dos valores encontrados para o leucograma de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira (BR) e de Guanabara (BG). Leucometria global (LG), leucometria específica em percentual (Lp), leucometria específica (L), trombócitos em percentual (Tp), trombócitos (T), frequência de linfócitos em percentual (Linfp), contagem de linfócitos (Linf), frequência de monócitos em percentual (Mop), contagem de monócitos (Mo), frequência de neutrófilos em percentual (Neup), contagem de neutrófilo (Neu), frequência de eosinófilos em percentual (Eosp) e contagem de eosinófilo (Eos). (n)= número de espécimes.

Parâmetros (10 ³ /mm ³)	<i>G. genidens</i>		<i>H. steindachneri</i>		<i>A. luniscutis</i>
	BR	BG	BR	BG	BR
LG	456,3 \pm 342,5 (35)	336,4 \pm 288,6 (36)	1.204,7 \pm 601,6 (34)	431,7 \pm 261,1 (27)	299,0 \pm 306,6 (10)
Lp	60,5 \pm 22,9 (31)	72,3 \pm 12,2 (40)	60,1 \pm 17,7 (35)	64,4 \pm 14,9 (33)	54,7 \pm 15,7 (10)
L	285,5 \pm 246,9 (28)	241,7 \pm 219,9 (32)	731,9 \pm 406,1 (32)	277,0 \pm 194,6 (27)	173,7 \pm 192,9 (10)
Tp	39,5 \pm 22,9 (31)	27,7 \pm 12,2 (40)	39,9 \pm 17,7 (35)	35,7 \pm 14,9 (33)	45,3 \pm 15,7 (10)
T	172,9 \pm 220,3 (28)	87,9 \pm 87,7 (32)	511,5 \pm 366,4 (32)	154,6 \pm 118,7 (27)	125,3 \pm 129,1 (10)
Linfp	77,8 \pm 20,5 (31)	90,7 \pm 6,6 (40)	88,2 \pm 8,2 (35)	81,5 \pm 11,2 (33)	88,9 \pm 6,1 (10)
Linf	203,5 \pm 177,4 (28)	220,9 \pm 202,7 (32)	647,4 \pm 374,2 (32)	227,4 \pm 177,1 (27)	151,9 \pm 169,6 (10)
Mop	7,6 \pm 7,3 (31)	5,1 \pm 3,9 (40)	6,5 \pm 5,7 (35)	7,9 \pm 6,8 (33)	2,6 \pm 3,4 (10)
Mo	16,9 \pm 20,4 (28)	10,6 \pm 14,3 (32)	47,4 \pm 59,8 (32)	21,5 \pm 16,3 (27)	7,5 \pm 16,6 (10)
Neup	13,2 \pm 18,6 (31)	3,3 \pm 3,9 (40)	4,9 \pm 4,9 (35)	10,0 \pm 9,4 (33)	5,5 \pm 5,1 (10)
Neu	62,1 \pm 148,2 (28)	8,1 \pm 15,4 (32)	35,5 \pm 48,1 (32)	26,5 \pm 29,8 (27)	12,1 \pm 17,9 (10)
Eosp	1,5 \pm 3,9 (31)	0,9 \pm 1,9 (40)	0,3 \pm 0,9 (35)	0,5 \pm 0,9 (33)	3,0 \pm 5,4 (10)
Eos	3,1 \pm 7,9 (28)	2,1 \pm 5,3 (32)	1,5 \pm 3,6 (32)	1,8 \pm 4,0 (27)	2,1 \pm 3,6 (10)

As cocorocas apresentaram maiores frequências de neutrófilos e menores de linfócitos ($p < 0,001$). O padrão mais comum em peixes é um maior número de linfócitos e menores proporções de outros tipos leucocitários (TAVARES-DIAS, MORAES, 2004). Em comparação com os valores encontrados para essa mesma espécie na Baía da Ribeira, essas frequências de neutrófilo e linfócito são significativamente diferentes ($F=8,952$ $p < 0,005$; $F=4,923$ $p < 0,05$, respectivamente). Este resultado pode indicar uma maior ativação do processo de fabricação dos neutrófilos na baía de Guanabara, talvez causada por pequenas inflamações. No entanto, o percentual de neutrófilos encontrados em ambas as áreas são baixos, não podendo ser classificado como uma neutrofilia ou reação a processos inflamatórios graves. Os neutrófilos são as primeiras células a deixar os vasos sanguíneos e chegar ao sítio inflamado (TAVARES-DIAS, MORAES, 2004). Um fato interessante foi a observação de neutrófilos e linfócitos ativados em quase totalidade dos esfregaços sanguíneos examinados dos peixes da Baía de Guanabara.

Para leucometria de forma geral, as faixas encontradas em diversas espécies variam muito, de 7.300 a 216.360 leucócitos por mm^3 . No geral, a leucometria global encontrada para as espécies estudadas no presente trabalho foi mais alta do que as relatadas para peixes de água doce e também mais alta em relação a leucometria global encontrada para estas espécies em 2004/2005 (RODRIGUES, 2006).

Em relação a leucometria específica, para a tainha *Mugil sp.*, que vive em ambiente estuarino ou marinho, foram relatados anteriormente cerca de 88% de linfócitos, 4% de neutrófilos, 8% de monócitos e 0% de eosinófilos. Essa indicação de um maior número de linfócitos foi observada neste trabalho.

Outras diferenças foram encontradas entre áreas para as cocorocas *H. steindachneri*. A hematimetria ($F=16,765$; $p < 0,001$), o CHGM ($F=21,561$; $p < 0,001$), o número de leucócitos ($F=19,335$; $p < 0,001$) e o número de trombócitos ($F=17,711$; $p < 0,001$) são maiores na Baía da Ribeira do que na Baía de Guanabara. A depleção nos valores de hematimetria e de CHGM pode estar indicando uma deficiência no transporte de oxigênio desses animais da Baía de Guanabara, como foi demonstrado anteriormente tomando-se como base os valores indicados como normais para peixes ósseos marinhos. Esses peixes da Baía da Guanabara teriam um menor número de hemácias com menos hemoglobina por célula, o que pode

estar prejudicando a oxigenação do organismo, sendo indicativo de anemia.

Diferenças entre áreas também foram observadas para o bagre *G. genidens*. A hematimetria foi maior ($F=12,838$; $p<0,001$) e o VGM ($F=7,486$; $p<0,01$) foi menor na Baía da Ribeira, podendo demonstrar um quadro de anemia dos bagres da Baía de Guanabara, com um aumento no volume celular, e diminuição do número de eritrócitos, indicando um maior número de células velhas, sem ter uma renovação do sistema, enquadrando-se em um cenário de anemia não regenerativa. Nos esfregaços sanguíneos dos bagres da Baía de Guanabara foram encontradas hemácias com núcleo picnótico, típico de hemácias adultas perto da morte. Não foi contada a relação entre hemácias jovens e adultas nas áreas, mas a observação dessas hemácias foi mais frequente na Baía de Guanabara. Este mesmo quadro de anemia não regenerativa foi observado para tucunarés (*Cichla* sp.) coletados em áreas de garimpo no rio Tapajós (SOUTO, 2004).

No leucograma, o percentual de leucócitos foi menor ($F=25,354$; $p<0,001$) e o de trombócitos foi maior ($F=25,354$; $p<0,001$) na Baía da Ribeira, com diferença de 10 a 12% nas frequências entre áreas. Teoricamente, em humanos, o número de trombócitos é 3 a 4 vezes maior do que o de leucócitos. No entanto, na Baía de Guanabara, os esfregaços sanguíneos observados apresentaram muitos aglomerados trombocitários, o que pode ter diminuído a proporção entre leucócitos e trombócitos, durante a contagem.

A leucometria específica do bagre *G. genidens* apresentou diferenças entre áreas. O percentual de neutrófilos ($F=9,812$; $p<0,005$) e monócitos ($F=6,417$; $p<0,05$) são mais baixos na Baía de Guanabara e o de linfócitos é mais alto ($F=17,684$; $p<0,001$), demonstrando a predominância desta forma leucocitária nesses espécimes (90% dos leucócitos eram linfócitos). Na Baía da Ribeira, o percentual de linfócitos foi mais baixo (70%), tendo uma maior proporção dos outros tipos leucocitários (neutrófilo e monócito).

Considerando todos os dados (ambas as áreas), correlações entre esses parâmetros e as concentrações de mercúrio nos diferentes órgãos foram verificadas para cada espécie separadamente. Para *G. genidens*, foram observadas correlações positivas entre o volume globular e as concentrações de Hg no músculo (0,359; $p<0,001$; $n=84$), fígado (0,264; $p<0,05$; $n=76$) e rim (0,306; $p<0,01$; $n=76$). Outras

correlações positivas foram encontradas para a concentração de hemoglobina e as concentrações de Hg no músculo (0,563; $p < 0,001$; $n=35$), fígado (0,560; $p < 0,001$; $n=37$) e rim (0,456; $p < 0,005$; $n=37$). Quanto maiores as concentrações de Hg nos órgãos, maior o número de hemácias e maior concentração de hemoglobina no sangue. Isto pode estar indicando um mecanismo de defesa do organismo em relação ao estresse da exposição ambiental ao mercúrio, onde haveria um aumento nas células sanguíneas e hemoglobina para carrear oxigênio para compensar outras deficiências do sistema.

Houve correlações entre o volume globular (VG) e a hemoglobina (0,412; $p < 0,01$; $n=37$) e a CHGM (-0,672; $p < 0,001$; $n=37$). Elas podem estar indicando que apesar do aumento da ocupação das hemácias por volume de sangue e do aumento conseqüente da concentração de hemoglobina, a hemoglobina globular média, ou seja, dentro de cada hemácia será menor.

Correlações entre o volume globular e as concentrações de mercúrio em músculo foram anteriormente descritas para esta espécie de bagre na Baía de Guanabara (RODRIGUES, 2006), gerando um cenário de anemia não regenerativa em peixes. SOUTO (2004), SILVA (2004) E CASTILHOS *et al.* (2004) encontraram resultados similares para peixes amazônicos (*Cichla* sp), onde o mercúrio poderia estar envolvido diretamente no equilíbrio iônico, aumentando o volume celular.

Os percentuais de leucócito e trombócito estão correlacionados negativamente com as concentrações de Hg no músculo (-0,235; $p < 0,05$; $n=68$), fígado (-0,365; $p < 0,005$; $n=64$) e rim (-0,253; $p < 0,05$; $n=65$). Bem como os percentuais de linfócitos com Hg em músculo (-0,385; $p < 0,001$; $n=68$), fígado (-0,341; $p < 0,01$; $n=64$) e rim (-0,342; $p < 0,005$; $n=65$). Ambas demonstram a relação entre o aumento da exposição ao mercúrio e a inibição do sistema defensor do organismo, diminuindo o número de leucócitos. Dentre os leucócitos, há uma diminuição na frequência de linfócitos, juntamente com um aumento de neutrófilos, segundo as correções destes tipos leucocitários com o mercúrio no músculo (0,363; $p < 0,005$; $n=68$), no fígado (0,294; $p < 0,05$; $n=64$) e no rim (0,36; $p < 0,01$; $n=65$).

Para a espécie de cocoroca *H. sp.* correlações entre a hemoglobina e a CHGM com as concentrações de Hg foram encontradas somente para o Hg em fígado (0,4; $p < 0,01$; $n=42$ / 0,374; $p < 0,05$; $n=41$, respectivamente). Uma relação

negativa entre a hematimetria e a hemoglobina está fortemente demonstrada para esta espécie (-0,665 $p < 0,001$ $n = 44$). Isso indicaria que apesar do aumento nas concentrações de hemoglobina com o aumento da exposição ao mercúrio, o número de hemácias decresceria, ou seja, as células eritrocitárias teriam maiores concentrações de hemoglobina para compensar o menor número de hemácias na corrente sanguínea.

Em relação ao leucograma, o percentual de leucócitos também apresentou correlação negativa tanto com as concentrações de Hg no músculo (-0,372; $p < 0,005$; $n = 67$) quanto no fígado (-0,382; $p < 0,005$; $n = 59$). Já o percentual de trombócitos correlacionou positivamente com os níveis de Hg (0,374; $p < 0,005$; $n = 67$ / 0,382; $p < 0,005$; $n = 59$, respectivamente). Um aumento no percentual de eosinófilo é esperado com o aumento da exposição ao Hg, de acordo com as relações encontradas com as concentrações em músculo (0,252; $p < 0,05$; $n = 67$) e em fígado (0,298; $p < 0,05$; $n = 59$). O eosinófilo não possui função muito bem delimitada em peixes, mas acredita-se que esteja associado a defesa de infecções parasitárias e importantes em um quadro pro-inflamatório, podendo ter relação com fagocitose de bactérias, tendo ação microbicida (TAVARES-DIAS, MORAES, 2004).

5.6.2 Bioquímica sérica

Os parâmetros avaliados estão apresentados na tabela 16. Não foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros medidos de bioquímica sérica entre as espécies coletadas na Baía de Guanabara. No entanto, na Baía da Ribeira, os níveis de AST foram mais altos para o bagre *G. genidens* do que para a cocoroca *H. steindachneri* ($F = 7,185$; $p < 0,05$). Já os níveis de creatinina foram mais altos na cocoroca ($F = 7,982$; $p < 0,01$). Para a baía de Guanabara, não houve diferença entre espécies para a bioquímica sérica.

Investigando possíveis diferenças entre áreas, os bagres *G. genidens* apresentaram maiores níveis de creatinina ($F = 19,131$; $p < 0,001$) na Baía da Ribeira e menores valores para ureia ($F = 8,381$; $p < 0,01$) do que na Baía de Guanabara. Levando-se em consideração que os níveis de creatinina e de ureia não devem ser muito altos para peixes saudáveis (entre 10 a 20 mg/dL), ambas as áreas estão bem

abaixo dos valores esperados. Já para ureia, os níveis foram bem altos na Baía de Guanabara, sugerindo uma deficiência na excreção por falha das brânquias e/ou dos rins.

Tabela 16. Médias \pm desvio padrão dos valores encontrados para alanina aminotransferase (ALT); aspartato aminotransferase (AST), creatinina e ureia de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= número de espécimes.

Espécies	ALT (U/L)	AST (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
Baía da Ribeira				
<i>G. genidens</i>	52,6 \pm 38,0 (30)	259,2 \pm 103,1 (33)	4,6 \pm 8,6 (30)	6,8 \pm 7,1 (32)
<i>H. steindachneri</i>	55,3 \pm 37,4 (21)	105,6 \pm 56,1 (26)	11,5 \pm 11,2 (22)	4,6 \pm 7,8 (23)
<i>A. luniscutis</i>	27,4 \pm 21,6 (15)	187,3 \pm 94,1 (16)	8,0 \pm 9,6 (12)	1,9 \pm 4,7 (16)
Baía de Guanabara				
<i>G. genidens</i>	20,2 \pm 28,7 (11)	141,1 \pm 89,2 (7)	0,5 \pm 0,9 (11)	13,6 \pm 6,3 (14)
<i>H. sp.</i>	27,1 \pm 31,7 (8)	46,9 \pm 22,9 (8)	0,3 \pm 0,2 (9)	20,8 \pm 9,2 (10)

Estas diferenças na creatinina estão correlacionadas positivamente com as concentrações de mercúrio no músculo (0,456; $p < 0,005$; $n=38$) e no fígado (0,374; $p < 0,05$; $n=31$). E as diferenças na ureia estão correlacionadas negativamente com o mercúrio no músculo (-0,361; $p < 0,05$; $n=43$), fígado (-0,377; $p < 0,05$; $n=36$) e rim (-0,435; $p < 0,01$; $n=37$). Os resultados sugerem a possível influência da exposição ao mercúrio e alterações na bioquímica de bagres dessa espécie.

Para as cocorocas *H. steindachneri*, os níveis de creatinina, como nos bagres, foram mais altos ($F=81,275$; $p < 0,001$) na Baía da Ribeira. Os níveis de AST também foram mais altos nesta área ($F=5,402$; $p < 0,05$). Isto pode indicar alguma inibição desta enzima nos espécimes da Baía de Guanabara, com consequente falha nos processos hepáticos desses espécimes. Contudo, nenhuma correlação foi encontrada entre os dados de bioquímica sérica e as concentrações de mercúrio para esta espécie, não parecendo ter relação direta com a exposição ao mercúrio.

5.6.3 Atividade enzimática de acetilcolinesterase

Na tabela 17 estão os valores encontrados para as atividades de

acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) nos peixes coletados. Os bagres *G. genidens* apresentaram uma maior atividade enzimática de AChE em músculo na Baía de Guanabara do que as cocorocas *Haemulon* sp ($p < 0,001$). Na baía da Ribeira, a atividade de acetilcolinestare no plasma foi muito baixa nas cocorocas *H. steindachneri*, sendo significativamente diferentes das encontradas nas duas espécies de bagres ($F=11,964$; $p < 0,005$).

Como não foi possível realizar as determinações das atividades desta enzima na musculatura dos peixes da Baía da Ribeira, devido a perda de material durante a estocagem em freezer, somente uma análise comparativa pode ser feita considerando resultados anteriormente encontrados. Na Baía da Ribeira, atividades de $0,79 \pm 0,54$ (33) foram encontradas para o bagre *G. genidens*, de $0,76 \pm 0,25$ (10) para a cocoroca *H. steindachneri*, e de $0,22 \pm 0,15$ (23) para o bagre *A. luniscutis* (RODRIGUES, 2006). Em comparação com esses dados, a atividade enzimática estaria cinco vezes menor nos espécimes coletados na Baía de Guanabara.

Tabela 17. Médias \pm desvio padrão das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase ($\mu\text{moles}/\text{min.}/\text{mg}$) em músculo (AChE-M) e em plasma (AChE-PI) e da butirilcolinesterase em plasma (BChE-PI) de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= número de espécimes.

Espécies	AChE_M	AChE-PI	BChE-PI
Baía da Ribeira			
<i>G. genidens</i>	$0,79 \pm 0,54$ (33)*	$1,314 \pm 0,6$ (8)	$0,006 \pm 0,003$ (6)
<i>H. steindachneri</i>	$0,76 \pm 0,25$ (10)*	$0,142 \pm 0,151$ (9)	$0,006 \pm 0,004$ (2)
<i>A. luniscutis</i>	$0,22 \pm 0,15$ (23)*	$1,4 \pm 0,8$ (4)	$0,007 \pm 0,006$ (3)
Baía de Guanabara			
<i>G. genidens</i>	$0,644 \pm 0,294$ (14)	$2,007 \pm 2,207$ (16)	$0,010 \pm 0,006$ (11)
<i>H. sp.</i>	$0,151 \pm 0,052$ (16)	$0,558 \pm 0,525$ (4)	$0,011 \pm 0,004$ (5)

*atividade encontrada em Rodrigues (2006).

Uma correlação forte e negativa foi encontrada no presente trabalho entre a AChE no músculo e as concentrações de Hg no músculo de cocorocas da Baía de Guanabara ($-0,570$; $p < 0,05$; $n=16$), sugerindo a inibição desta enzima nesta área.

Como não há dados pretéritos da atividade de AChE para cocorocas na Baía de Guanabara, não é possível estabelecer se houve um aumento ou uma diminuição da atividade nesses últimos 4 anos. Já para o bagre *G. genidens*, esta comparação

pode ser realizada. Em RODRIGUES (2006), a atividade média encontrada foi de $0,91 \pm 0,41$ (39), sendo maior do que a atividade encontrada nos espécimes coletados para o presente trabalho. Uma correlação negativa entre a atividade da AChE no músculo e as concentrações de Hg nos rins desses bagres foi encontrada, reforçando a possibilidade da inibição desta enzima devido a exposição ao mercúrio ($-0,55$; $p < 0,05$; $n=14$).

Em relação aos dados de atividade enzimática em plasma, a atividade de AChE foi mais baixa nas cocorocas coletadas na Baía da Ribeira ($F=15,767$; $p < 0,001$), contudo essa diferença será considerada apenas como indicação visto o número reduzido de espécimes analisados na Baía de Guanabara. Para o bagre *Genidens genidens* não houve diferença significativa.

Em ensaios laboratoriais, a atividade de acetilcolinesterase foi diminuída em razão a exposição ao mercúrio nos tecidos do cérebro, brânquias e fígado, mas não no músculo de peixes (GILL *et al.*, 1990). TUNNICLIFF E WOOD (1973) não encontraram sinais de inibição desta enzima no cérebro de ratos expostos a metilmercúrio.

MAGNOTTI *et al.* 1994 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2007, ao encontrarem uma ativação da acetilcolinesterase após a exposição a xenobióticos, observaram que existem diferenças importantes entre os tipos de acetilcolinesterase presentes nas diversas espécies de peixes. Sugeriram a existência de dois grandes grupos, um com maior atividade enzimática e o outro com menor atividade. Diferenças na sensibilidade da acetilcolinesterase foi anteriormente reportada para diferentes peixes e invertebrados (MONSERRAT *et al.*, 2007) e essas diferenças podem estar ligadas a muitos fatores, como a habilidade do sítio ativo da enzima encaixar na cadeia de alquil dos substratos como o iodeto de acetiltiocolina (AcSCh) e o iodeto de butiriltiocolina (BSCh). MONSERRAT *et al.* (2007) mostraram que, geralmente, as colinesterases de peixes são mais sensíveis que as de invertebrados.

5.6.4 Efeitos genotóxicos - Micronúcleo

As frequências de MN e de NB encontradas nos esfregaços sanguíneos são apresentadas na tabela 18. Não houve diferença significativa entre as frequências

encontradas para micronúcleo e núcleo bilobado entre as duas espécies coletadas na Baía de Guanabara. Entretanto, a frequência de núcleo bilobado foi maior nas cocorocas *H. steindachneri* em comparação com as duas espécies de bagres, oriundos da Baía da Ribeira ($F=32,296$; $p<0,001$).

Tabela 18. Médias \pm desvio padrão dos valores encontrados para as frequências de micronúcleo (MN) e núcleo bilobado (NB) em 1.000 células contadas de 03 espécies de peixes oriundas das Baías da Ribeira e de Guanabara. (n)= número de espécimes.

Espécies	MN	NB
Baía da Ribeira		
<i>G. genidens</i>	0,03 \pm 0,16 (40)	0,1 \pm 0,3 (40)
<i>H. steindachneri</i>	0,05 \pm 0,3 (38)	1 \pm 1,5 (38)
<i>A. luniscutis</i>	0,1 \pm 0,3 (10)	0,1 \pm 0,3 (10)
Baía de Guanabara		
<i>G. genidens</i>	0,1 \pm 0,2 (48)	0,3 \pm 0,7 (48)
<i>H. sp.</i>	0,06 \pm 0,2 (36)	1,9 \pm 3,4 (36)

Entre áreas, as frequências de núcleo bilobado em bagres *G. genidens* foram maiores na Baía de Guanabara do que na Baía da Ribeira ($F=11,159$; $p<0,001$), mostrando a maior exposição desses animais ao estresse. Em comparação com as frequências anteriormente encontradas para esta espécie, na Baía da Ribeira a frequência diminuiu drasticamente, saindo da média de 0,6 \pm 0,9 (19) para 0,1 \pm 0,3 (40). Já na Baía de Guanabara, a frequência foi mantida (0,4 \pm 0,9, n=20). Todavia, não houve correlações entre os dados apresentados e as concentrações de mercúrio nos peixes, indicando que outros fatores podem ser importantes.

Essas frequências são bem mais baixas do que as encontradas em outras áreas para outras espécies de peixes. BOMBAIL *et al.* (2001) observaram frequências de até 32 micronúcleos em 1.000 eritrócitos para o peixe *Pholis gunnellus*, coletado no estuário de Firth of Forth, Escócia, relatada como área poluída.

A ocorrência de micronúcleo está estritamente relacionada com a hematopoiese, que em peixes é realizada principalmente nos rins. Se o rim não apresenta algum tipo de disfunção, erros durante a divisão celular e formação de

novos eritrócitos serão baixos, fazendo com que os novos eritrócitos liberados para a corrente sanguínea sejam normais. Em ensaios laboratoriais, foi encontrado um intervalo entre a exposição e o início da detecção no aumento da frequência de micronúcleos, o que está relacionado com a meia-vida dos eritrócitos, sendo substituídos por novos alguns dias após o início da exposição. E esses novos eritrócitos apresentam maior taxa de erros na mitose durante a hematopoiese (GRISOLIA, CORDEIRO, 2000).

SANCHEZ-GALAN *et al.* (2001) demonstraram que tanto o cádmio quanto o mercúrio podem induzir a expressão de micronúcleo em enguias quando soluções de compostos contendo esses metais são injetadas no animal (concentração testada: 1,7mg metal por kg peso no corpo do animal), obtendo-se uma frequência de 2,64 e 2,35 micronúcleos por 1.000 eritrócitos para cádmio e para mercúrio, respectivamente.

PORTO *et al.* (2005) encontraram frequências significativamente maiores de MN em *Prochilodus nigricans* (espécie detritívora), *Mylossoma duriventris* (espécie onívora) e *Hoplias malabaricus* (espécie piscívora) oriundos do rio Madeira, altamente impactado por atividade mineradora de ouro, quando comparadas às frequências encontradas no rio Solimões. Além disso, as frequências encontradas para a traíra *Hoplias malabaricus* foram quase 5 vezes maior do que as encontradas na espécie detritívora e na onívora.

Outros estudos que determinaram a frequência de MN em eritrócitos de peixes demonstraram a mesma tendência com maiores frequências em áreas poluídas (LEMOS *et al.*, 2007; PORTO *et al.*, 2005), onde existem mais estressores físicos e químicos, como metais tóxicos. No Rio de Janeiro, LINDE-ARIAS *et al.* (2008) avaliaram as frequências de MN em *Oreochromis niloticus* da bacia do rio Paraíba do Sul e a maior frequência foi encontrada no rio Guandu, o qual é utilizado para abastecimento de água na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro.

5.6.5 Avaliação qualitativa: risco potencial nas áreas de estudo

Cada espécime coletado foi analisado individualmente de acordo com faixas de normalidade indicadas na literatura para todos os biomarcadores de exposição e

de efeito aqui estudados, obtendo-se um diagnóstico individual. Os valores de normalidade utilizados variaram de acordo com a espécie. Para esse diagnóstico fosse numericamente comparável entre áreas, foi adotado o seguinte conceito: se o animal apresentou um valor normal para aquele parâmetro, ele receberia o valor zero, como símbolo de ausência de efeito. Se para um outro parâmetro esse mesmo peixe obteve um valor fora da faixa de normalidade, ele recebeu como valor para este parâmetro o número 1, simbolizando a presença de um efeito naquele indivíduo. Assim, ao final da avaliação, a soma dos valores dados para cada parâmetro para aquele indivíduo estaria diretamente ligada à saúde do animal. Como nem todos os parâmetros foram analisados para todos os indivíduos, foram utilizadas as médias e não a soma dos parâmetros. No fim da avaliação de todos os indivíduos coletados, foi realizada a média dos valores das médias de efeitos observados para aquela área, gerando um valor comparável entre áreas e espécies. Um exemplo genérico da planilha montada é demonstrado na figura 37. Os valores utilizados como padrão de normalidade são apresentados na tabela 19.

Variável 1	Variável 2	Variável 3	Variável 4	Número de variáveis	Soma dos valores	S/N	Soma total da área
1	1	1	0	4	3	0,75	11,25
1	1	1	-	3	3	1,00	Média total da área
1	1	1	1	4	4	1,00	0,80
1	1	1	0	4	3	0,75	Desvio padrão
1	0	1	0	4	2	0,50	0,21
1	1	1	1	4	4	1,00	
1	-	1	1	3	3	1,00	
1	1	1	1	4	4	1,00	
1	1	1	0	4	3	0,75	
1	1	1	0	4	3	0,75	
1	1	1	0	4	3	0,75	
0	1	0	-	3	1	0,33	
1	1	0	-	3	2	0,67	
1	1	1	-	3	3	1,00	

Figura 37. Modelo da planilha utilizada para a avaliação qualitativa dos dados.
N= número de variáveis; S=soma dos valores.

Tabela 19. Valores utilizados como padrão de normalidade para as espécies de peixes estudadas, determinados de acordo com os dados obtidos no presente trabalho e com dados para peixes ósseos (CAMPBELL, 2004; TAVARES-DIAS, MORAES, 2004).

Variáveis	<i>Genidens genidens e Aspistor luniscutis</i>	<i>Haemulon steindachneri</i>
HgHe (ng/g)	200	200
HgPI (ng/g)	200	200
HgM (ng/g)	200	200
HgF (ng/g)	200	200
HgR (ng/g)	200	-
H ($10^6/\text{mm}^3$)	1,2 a 2,2	2,5 a 3,5
VG (%)	30 a 50	25 a 40
VGM (fl)	200 a 300	100 a 200
Hb (mg/l)	9 a 11	9 a 11
CHGM (%)	20 a 30	20 a 40
PPT (g/dl)	4 a 6	4 a 6
ALT (U/L)	15 a 40	20 a 50
AST (U/L)	120 a 250	60 a 100
Creatinina (mg/dL)	10 e 20	10 e 20
Ureia (mg/dL)	< 10	< 10
LG ($10^3/\text{mm}^3$)	100 a 500	500 a 900
Leuco %	50 a 70	50 a 70
Tromb %	30 a 50	30 a 50
Linfócito (%)	70 a 85	70 a 85
Monócito (%)	5 a 10	5 a 10
Neutrófilo (%)	5 a 10	5 a 10
Eosinófilo (%)	5 a 10	5 a 10
MN ($n/10^3\text{cels}$)	< 2	< 2
NB ($n/10^3\text{cels}$)	< 2	< 2
AChE_músculo ($\mu\text{moles}/\text{min.}/\text{mg}$)	> 1,0	> 1,0
AChE_plasma ($\mu\text{moles}/\text{min.}/\text{mg}$)	> 1,0	> 1,0
BChE_plasma ($\mu\text{moles}/\text{min.}/\text{mg}$)	> 0,01	> 0,01

As médias de efeitos observados na Baía da Ribeira foram de 0,63 para o bagre *Aspistor luniscutis*, de 0,52 para o bagre *Genidens genidens* e de 0,38 para a cocoroca *Haemulon steindachneri*. Todas as médias foram diferentes entre si (teste t; $p < 0,05$). As médias na Baía de Guanabara foram de 0,34 para o bagre *Genidens genidens* e de 0,32 para a cocoroca *Haemulon sp.*, não sendo diferentes entre as espécies.

Entre áreas, as médias no geral foram mais altas na baía da Ribeira. Comparando entre espécies por área, para o bagre *G. genidens* a maior média foi encontrada na baía da Ribeira. Mas para a cocoroca, as médias foram similares. Essas médias mais altas na baía da Ribeira podem estar sendo superestimadas devido às maiores concentrações de mercúrio encontradas na área, especialmente quando são observados os bagres. Por isso, foi investigado como ficariam as médias sem a interferência dos biomarcadores de exposição, analisando somente os biomarcadores de efeito.

Os resultados não sofreram modificações significativas, mesmo sem considerar as concentrações de mercúrio nos tecidos. Apenas para o bagre *Aspistor luniscutis*, os efeitos observados diminuíram significativamente (0,39). Com as novas médias, o bagre *Genidens genidens* não foi mais diferente da cocoroca na baía da Ribeira e nem diferente dos espécimes da mesma espécie coletados na Baía de Guanabara.

Sumarizando, os efeitos observados foram maiores na Baía da Ribeira quando foram consideradas as concentrações de Hg nos animais. Retirando-as da análise, os efeitos são similares entre as áreas, ou seja, os animais mostraram condições fisiológicas semelhantes nos dois sistemas costeiros estudados.

5.7 BIOENSAIOS

Objetivo específico 7: realizar bioensaios crônicos em peixes para investigação da inter-relação dose-resposta dos biomarcadores de exposição com biomarcadores de efeito investigados em trabalhos de campo previamente.

Neste capítulo serão apresentados os resultados encontrados para os dois ensaios laboratoriais, aqui chamados de bioensaios, realizados com peixes da espécie *Astronotus ocellatus*, na Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Fluminense.

5.7.1 Bioensaio I – teste piloto

Este primeiro bioensaio teve duração de 6 meses e os biomarcadores de exposição (concentração de mercúrio no sangue) e de efeitos (parâmetros hematológicos, frequências de micronúcleo e núcleo bilobado) selecionados foram avaliados bimestralmente. No fim do experimento, amostras de tecidos foram retiradas para determinação de mercúrio total, para atividade enzimática de AChE e para realização de cortes histológicos.

Os valores encontrados para o hemograma e o leucograma estão apresentados na tabela 20. Na figura 38 é apresentada uma prancha com os tipos celulares encontrados no sangue de apaiaris. Da coleta branco até 6 meses, houve perda de 04 espécimes, três do grupo teste e um do controle. Na coleta branco, um espécime não foi pesado e nem medido. Na coleta de 2 meses, não foi possível coletar sangue suficiente de um dos peixe para análise.

Os animais cresceram em peso e tamanho de forma similar no grupo controle e no grupo teste durante o experimento, não mostrando qualquer inibição no crescimento. As concentrações de mercúrio total encontradas, a princípio serão tratadas como concentrações de metilmercúrio, visto que os animais estavam expostos a somente esta forma do mercúrio via alimentação. Comparando-se os resultados obtidos na primeira coleta (branco) com os resultados das coletas de 2, 4 e 6 meses, de maneira geral o grupo controle apresentou aumento do VGM ($p < 0,05$), da frequência de linfócitos ($p < 0,05$) e diminuição da leucometria ($p < 0,05$).

Tabela 20. Médias \pm desvio padrão dos parâmetros acompanhados durante o experimento: peso (g); tamanho (cm); concentrações de mercúrio (peso úmido; ng/g) em sangue (HgSt), em hemácias (HgHe) e em plasma (HgPI); hematimetria (H) ($H \times 10^6/\text{mm}^3$); contagem de leucócitos ($L \times 10^3/\text{mm}^3$); contagem de trombócitos (T) ($T \times 10^3/\text{mm}^3$); leucometria global (LG) ($10^3/\text{mm}^3$); volume globular (VG) (%); volume globular médio (VGM) (fL); proteína plasmática total (PPT) (g/dL); Eosinófilos (%); Neutrófilos (%); Linfócitos (%); Monócitos (%); MN (n/1000 eritrócitos); NB (n/1000 eritrócitos). (n)= n° de espécimes.

Parâmetros	Coleta BRANCO		Coleta - 2 meses		Coleta - 4 meses		Coleta - 6 meses	
	Controle	Teste	Controle	Teste	Controle	Teste	Controle	Teste
Peso	163,1 \pm 31,6 (3)	127,9 \pm 45,8 (7)	188,3 \pm 30,5 (3)	160,0 \pm 69,9 (8)	220,0 \pm 42,4 (2)	216,7 \pm 83,2 (6)	229,0 \pm 32,5 (2)	186,6 \pm 70,7 (5)
Tamanho	22,2 \pm 0,9 (3)	19,4 \pm 2,9 (7)	21,0 \pm 1,3 (3)	20,0 \pm 2,1 (8)	21,5 \pm 2,1 (2)	20,6 \pm 2,4 (6)	22,3 \pm 0,4 (2)	20,3 \pm 2,1 (5)
HgSt	17,3 \pm 5,0 (3)	8,5 \pm 5,2 (8)	6,67 \pm 6,4 (3)	1004,1 \pm 345,1 (7)	20,5 \pm 9,8 (2)	1210,8 \pm 388,9 (6)	8,0 \pm 7,1 (2)	3447,5 \pm 590,4 (4)
HgHe	-	-	-	-	-	-	9,5 \pm 6,4 (2)	1405 \pm 121,2 (4)
HgPI	-	-	-	-	-	-	20 (1)	1150 \pm 139,0 (4)
H	3,3 \pm 0,7 (3)	3,2 \pm 0,8 (8)	1,9 \pm 0,6 (3)	1,5 \pm 0,8 (7)	1,9 \pm 1,5 (2)	1,8 \pm 0,6 (6)	1,1 \pm 0,9 (2)	1,5 \pm 0,7 (3)
Leucócitos	186,7 \pm 55,0 (3)	203,1 \pm 145,9 (8)	88,3 \pm 22,7 (3)	101,4 \pm 84,3 (7)	-	-	-	-
Trombócitos	130,0 \pm 109,7 (3)	86,8 \pm 72,7 (8)	-	-	-	-	-	-
LG	316,7 \pm 98,8 (3)	290,0 \pm 175,1 (8)	-	-	90,0 \pm 7,1 (2)	154,2 \pm 104,5 (6)	105,0 \pm 49,5 (2)	196,7 \pm 90,7 (3)
VG	23,3 \pm 4,0 (3)	21,0 \pm 2,9 (8)	25,0 \pm 7,0 (3)	23,7 \pm 7,9 (7)	16,5 \pm 12,0 (2)	23,7 \pm 5,8 (6)	18,0 \pm 9,9 (2)	22,3 \pm 8,3 (4)
VGM	73,3 \pm 23,2 (3)	67,0 \pm 11,5 (8)	132,8 \pm 6,3 (3)	186,9 \pm 91,8 (7)	91,7 \pm 11,8 (2)	140,4 \pm 31,6 (6)	176,2 \pm 47,1 (2)	199,5 \pm 86,2 (3)
PPT	4,5 \pm 0,4 (3)	4,5 \pm 0,4 (8)	5,0 \pm 0,4 (3)	5,4 \pm 0,4 (7)	3,4 \pm 0,8 (2)	3,7 \pm 0,8 (6)	4,2 \pm 0,6 (2)	4,4 \pm 0,6 (4)
Eosinófilos	72,0 \pm 13,2 (3)	75,3 \pm 9,8 (8)	28,3 \pm 25,7 (3)	38,4 \pm 18,4 (7)	50,0 \pm 38,2 (2)	55,8 \pm 15,8 (6)	52 (1)	62,5 \pm 23,3 (2)
Neutrófilos	5,7 \pm 4,0 (3)	6,5 \pm 3,1 (8)	3,7 \pm 2,3 (3)	3,6 \pm 2,8 (7)	8,5 \pm 10,6 (2)	4,7 \pm 2,3 (6)	2 (1)	0,5 \pm 0,7 (2)
Linfócitos	19,0 \pm 7,2 (3)	14,6 \pm 8,3 (8)	60,7 \pm 21,4 (3)	47,3 \pm 19,3 (7)	22,0 \pm 7,1 (2)	27,3 \pm 12,8 (6)	46 (1)	33,5 \pm 19,1 (2)
Monócitos	3,3 \pm 2,1 (3)	3,6 \pm 4,1 (8)	7,3 \pm 6,5 (3)	11,0 \pm 10,2 (7)	19,5 \pm 20,5 (2)	12,5 \pm 6,7 (6)	0 (1)	3,5 \pm 3,5 (2)
MN	0 \pm 0 (3)	0,13 \pm 0,3 (8)	0 \pm 0 (2)	0 \pm 0 (6)	0,5 \pm 0,7 (2)	0 \pm 0 (6)	-	-
NB	0,3 \pm 0,6 (3)	8 \pm 12,7 (8)	0,5 \pm 0,7 (2)	9,3 \pm 12,6 (6)	16 \pm 21,2 (2)	13 \pm 17,1 (6)	-	-

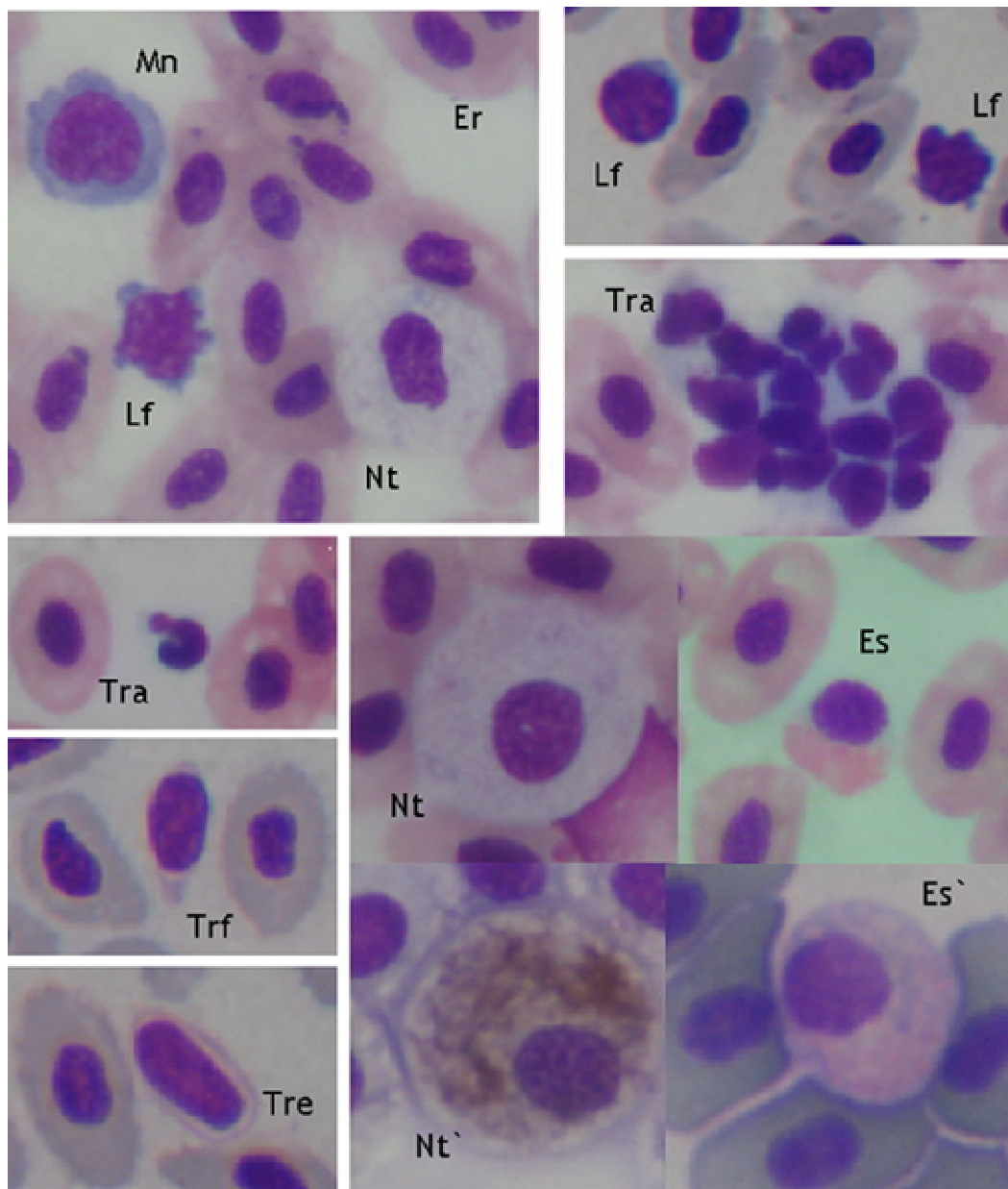


Figura 38: Células sanguíneas do sangue periférico de *Astronotus ocellatus* mantidos em laboratório na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. Eritrócito (Er); Trombócito arredondado (Tra); Trombócito fusiforme (Trf); Trombócito esférico (Tre); Linfócito (Lf); Monócito (Mn); Neutrófilo (Nt); Eosinófilo (Es); Neutrófilo POX-positivo (Nt') e Eosinófilo POX-negativo (Es'). POX: Reação citoquímica de Peroxidase. Coloração Wrigth, Giemsa (Trf e Ter) e Peroxidase (Nt' e Es').

Já o grupo teste, além do incremento nas concentrações de mercúrio ($p < 0,001$), apresentou um aumento de VGM ($p < 0,001$) e de linfócitos ($p < 0,05$) e a diminuição da hematimetria ($p < 0,001$) e da frequência de eosinófilos ($p < 0,05$). Os valores de PPT decresceram na segunda avaliação em ambos os grupos sem distinção e não se pode concluir se estes valores são fisiológicos para a idade ou se devido às condições de alimentação.

No entanto, dentre os parâmetros medidos durante o experimento, só há diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e teste para as concentrações de MeHg em sangue, onde o grupo controle manteve concentrações de MeHg similares às do branco. Como tanto o controle quanto o teste tiveram parâmetros hematológicos alterados ao longo do tempo, não foi possível estabelecer uma relação dose-resposta, já que os dados do controle não puderam ser utilizados como referência.

Entretanto, foram observadas correlações entre MeHg em sangue total e a hematimetria ($-0,48$; $p < 0,01$; $n=29$) e com o VGM ($0,56$; $p < 0,001$; $n=29$), relacionadas à diminuição do número de hemácias e a alterações eletrolíticas e minerais ou à idade dos animais com o aumento das concentrações de Hg. Essas mesmas relações foram encontradas para as concentrações de Hg em plasma ($-0,56$; $p < 0,05$ $n=15$ / $0,74$; $p < 0,005$; $n=15$).

Investigando correlações nos grupos controle e teste separadamente, não foi observada correlação entre MeHg no sangue e os parâmetros hematológicos para o grupo controle, enquanto que para o grupo teste, as correlações supra-relatadas se mantêm.

Correlações entre as frequências de eosinófilos ($-0,41$; $p < 0,05$; $n=29$) e monócitos ($0,49$; $p < 0,01$; $n=29$) e a concentração de MeHg indicam uma diminuição de eosinófilos e o aumento de monócitos com a exposição mercurial, indicando possível quadro clínico crônico de monocitose e aumento de reação imunológica.

Já as frequências de micronúcleo e núcleo bilobado se mantiveram estatisticamente iguais entre os grupos controle e teste até o quarto mês de experimento, quando a frequência de núcleo bilobado aumentou consideravelmente no grupo teste ($p < 0,001$). Observando a evolução dos espécimes do grupo teste, em

comparação com os dados da primeira coleta, o aumento também foi observado ($p < 0,01$). Não foram encontradas correlações entre os dados de mercúrio e as frequências de MN e de NB, mas a avaliação do NB parece ser de grande valia para identificação da exposição do peixe a um estressor como o mercúrio. Talvez o tempo de exposição não foi capaz de aumentar a frequência de micronúcleos, mais raros, casos mais graves. Não foi possível realizar a contagem de micronúcleo e NB na coleta do sexto mês devido a coloração das lâminas não ter ficado apropriada para tal, tendo muitos artefatos, impossibilitando uma leitura com o menor erro possível de identificação das células.

As concentrações de Hg encontradas para músculo, fígado e gônada estão apresentadas na tabela 21 juntamente com os resultados da atividade enzimática de AChE. Todas as concentrações foram duas ordens de grandeza maior nos espécimes do grupo teste ($p < 0,001$). Há uma forte relação entre as concentrações de MeHg no sangue e nas hemácias com as encontradas em músculo (0,83; $p < 0,05$; $n=7$ / 0,9; $p < 0,05$; $n=5$, respectivamente) e em fígado (0,77; $p < 0,05$; $n=7$). Também foi observada uma forte relação entre o Hg no fígado e no músculo (0,96; $p < 0,001$; $n=7$). Todos indicam um equilíbrio na distribuição do mercúrio nesses órgãos-alvo.

Tabela 21. Concentrações de Hg total (peso úmido; ng/g) em músculo (HgM), fígado (HgF) e gônada (HgG) e atividade enzimática de acetilcolinesterase em músculo (AChE_M) ($\mu\text{moles}/\text{min.}/\text{mg}$) de apaiaris *Astronotus ocellatus* expostos artificialmente a metilmercúrio. (n)= número de espécimes.

Grupo	HgM	HgF	HgG	AchE_M
Controle	39,5±31,8 (2)	23,2±3,9 (2)	32,0 (1)	0,128±0,039 (2)
Teste	6.368,7±1.089,3 (4)	7.845,8±439,6 (3)	4.199,2±1.504,0 (3)	0,184±0,049 (5)

Em relação a atividade enzimática da acetilcolinestare, o grupo controle apresentou em média atividades mais baixas que o grupo teste ($p < 0,005$), demonstrando uma possível ativação dessa enzima a partir da exposição desses animais ao MeHg. Correlações positivas entre Hg em músculo e a atividade de AChE foram anteriormente encontradas tanto em estudos em áreas contaminadas quanto em ensaios laboratoriais (SOUTO, 2004), mas outros estudos demonstram o contrário, o que pode estar relacionado com o metabolismo de cada espécie

utilizada no estudo. Para apaiaris, não há dados pretéritos para maiores comparações.

Na tabela 22 são apresentadas as alterações histológicas encontradas através da análise microscópica dos cortes histológicos de fígado de espécimes do grupo controle (apenas 1, simbolizado pela letra C) e do grupo teste (4 espécimes, simbolizados com a letra T). No geral, todos apresentaram um aumento no volume dos hepatócitos devido ao acúmulo exarcebado de gordura, incluindo o espécime do grupo controle, formando macrovacúolos. Todos apresentaram degeneração dos hepatócitos, pois a maioria das células não tinha a forma normal de um hepatócito.

Tabela 22. Alterações histológicas em fígados de apaiaris *Astronotus ocellatus* expostos artificialmente a metilmercúrio por 6 meses.

Alterações	C6	T4	T5	T9	T10
<i>Degeneração</i>	+	+	+	+	+
<i>Necrose</i>	+	-	-	+	+
<i>Infiltração inflamatória no parênquima hepático</i>	+	-	-	-	-
<i>Macrovacúolos</i>	+	+	+	+	+
<i>Congestão de vasos</i>	-	-	-	-	+

Essas observações levaram a considerar problemas na alimentação dos peixes, pois casos de acúmulo excessivo de gordura, com perda de hepatócitos, muitas vezes diagnosticados como lipidoses, podem ser provocados ou por um grande intervalo entre uma refeição e outra ou devido às altas taxas de gordura encontrada na ração utilizada para alimentação. A ração utilizada neste primeiro ensaio é a mesma utilizada na criação de peixes para abate e posterior consumo humano. Como não há uma identificação dos componentes desta ração, foram definidas algumas mudanças para o bioensaio posterior, como: alimentação duas vezes ao dia; a ração utilizada no grupo controle seria com alto teor protéico – acima de 40% de proteína; tanto o grupo controle quanto o teste deveriam receber uma alimentação balanceada, com mudanças nos tipos de rações, para que uma complementasse a outra e não houvesse interferência ou influência de uma má alimentação nos resultados encontrados.

Além do fígado, foram examinadas 3 gônadas, todas de animais do grupo

teste, através dos cortes histológicos. Duas gônadas eram de fêmeas e uma de macho. A gônada de macho apresentou degeneração das células, ausência de espermatogônia, espermatozoides jovens, e um espaço maior entre a parede celular e os espermatozoides. As gônadas de fêmeas apresentaram hipertrofia e hiperplasia da camada folicular. No espécime T4, além dessas duas alterações foram encontrados folículos atrésicos e degeneração vitelínica. No espécime T10, foi encontrado material protéico disperso entre as células e infiltrados inflamatórios. Apesar de ser um número pequeno e não haver análise de uma gônada do grupo controle para comparação, pode-se notar que todos os 3 espécimes do grupo teste apresentaram alterações severas nas gônadas, o que prejudicaria inevitavelmente a reprodução desses animais, caso eles estivessem em vida livre.

5.7.2 Bioensaio II

A partir da experiência obtida no bioensaio I, este segundo bioensaio sofreu algumas alterações: (1) O número de espécimes foi aumentado tanto no grupo controle quanto no grupo teste; (2) A temperatura foi o máximo possível controlada, bem como a luminosidade; (3) Trocas parciais de água foram adotadas em lugar das trocas totais de água, para uma maior estabilização do aquário; (4) Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água semanal e da temperatura da água, diariamente; (5) Mudanças na alimentação, citadas no item anterior, 5.7.1; (6) Inclusão de outros biomarcadores de efeito para uma maior abrangência da análise.

O monitoramento da qualidade da água mostrou que o pH foi mantido próximo a neutralidade ($6,7 \pm 0,3$) e a dureza, entre 50-150ppm de CaCO_2 , considerada como branda durante todo o bioensaio. A temperatura da água foi de $27,3 \pm 2,2^\circ\text{C}$. O oxigênio dissolvido obteve média de $5,3 \pm 1,5\text{ppm}$, o que indica que as condições de oxigenação dos aquários foram adequadas. A amônia ($0,001 \pm 0,006\text{ppm}$) e o nitrito ($0,2 \pm 0,3\text{ppm}$) permaneceram em níveis não tóxicos para os peixes durante o experimento.

Inicialmente serão discutidos os resultados encontrados para os biomarcadores de exposição utilizados no experimento. As concentrações de mercúrio total nos órgãos internos dos espécimes do grupo controle e do grupo teste

estão apresentadas na tabela 23 e foram significativamente maiores no grupo teste em relação ao grupo controle, inclusive as concentrações normalizadas por peso e por tamanho dos espécimes e dos órgãos ($p < 0,001$). Os percentuais de metilmercúrio em algumas dessas amostras estão apresentadas na tabela 24.

Tabela 23. Concentrações de mercúrio (Hg) em diferentes órgãos (ng/g; peso úmido) e as relações entre essas concentrações encontradas em apaiaris *Astronotus ocellatus*, após 6 meses de exposição a metilmercúrio. (n)= número de espécimes.

Parâmetros	Controle	Teste
HgHe (ng/g)	7,0±6,9 (n=7)	882,3±101,3 (9)
HgPI (ng/g)	3,2±2,2 (n=6)	78,2±56,2 (8)
HgM (ng/g)	36,4±30,9 (15)	2417,3±395,4 (13)
HgF (ng/g)	19,8±17,8 (11)	1858,1±638,1 (13)
HgG (ng/g)	40,1±30,9 (6)	6595±4892,2 (5)
Peso do Fígado (g)	4,5±2,6 (11)	4,9±2,1 (12)
Peso da Gônada (g)	4,4±2,4 (7)	2,6±2,1 (5)
HgMnormCP (ng/g x cm de peixe)	2,8±2,0 (15)	153,9±33,7 (13)
HgMnormPeso (ng/g x g de peixe)	0,5±0,7 (15)	13,0±4,8 (13)
HgFnormPeso do fígado (ng/gxg)	7,6±8,8 (11)	523,9±457,8 (12)
HgGnormPeso da gônada (ng/gxg)	12,1±8,5 (6)	3685,5±3610,8 (5)
HgHe / HgPI	3,9±4,5 (n=6)	15,5±7,9 (8)
HgHe / HgM	0,13±0,05 (6)	0,37±0,05 (9)
HgHe / HgF	0,4±0,3 (7)	0,6±0,2 (9)
HgHe / HgG	0,5±0,5 (4)	0,5±0,6 (4)
HgM / HgF	1,8±1,1 (11)	1,4±0,5 (13)
HgM / HgG	3,2±3,7 (5)	1,1±1,6 (5)

HgHe= concentração de Hg total em hemácias; HgPI= concentração de Hg total em plasma; HgM= concentração de Hg total em músculo; HgF= concentração de Hg total em fígado; HgG= concentração de Hg total em gônada; CP= comprimento padrão; norm= normalizado.

Apesar de não haver diferença significativa, observou-se uma possível atrofia nas gônadas dos animais do grupo teste, onde o peso desse órgão foi praticamente a metade do que encontrado no grupo controle. Maiores detalhes sobre as

diferenças estruturais das gônadas do grupo controle e do grupo teste serão analisadas a seguir através da histopatologia.

As concentrações de mercúrio em hemácias estão significativamente relacionadas com as concentrações em músculo (0,76; $p < 0,001$; $n=15$), em fígado (0,75; $p < 0,001$; $n=16$) e em gônadas (0,76; $p < 0,05$; $n=9$). O mesmo foi observado para as concentrações em plasma (0,73; $p < 0,005$; $n=13$ / 0,58; $p < 0,05$; $n=13$ / 0,98; $p < 0,001$; $n=8$, respectivamente). As concentrações no músculo estão altamente relacionadas com as encontradas no fígado (0,77; $p < 0,001$; $n=23$) e na gônada (0,606; $p < 0,05$; $n=11$). Todas indicam uma relação na distribuição interna do metilmercúrio no organismo.

Tabela 24. Percentuais de metilmercúrio em amostras de hemácias, plasma, músculo e fígado de indivíduos de apaiari *Astronotus ocellatus* do grupo teste, exposto a 7 ppm de metilmercúrio durante 6 meses. (n)= número de espécimes.

Parâmetros	Grupo teste
HgHe	1.150,4±296,3 (3)
MeHg_He	1.350,6±70,9 (3)
% MeHg	121,5±23,8 (3)
HgPI	74,2±50,9 (3)
MeHg_PI	19,7±10,7 (3)
% MeHg	28,3±3,8 (3)
HgM	2.130 (1)
MeHg_M	1.879,9 (1)
% MeHg	88,26 (1)
HgF	1.980,0 (1)
MeHg_F	1.436,3 (1)
%MeHg	72,5 (1)

Em relação ao metilmercúrio, os percentuais encontrados em hemácias e em plasma estão de acordo com o reportado na literatura e discutido anteriormente em outros capítulos deste trabalho, onde realmente o metilmercúrio, com maior afinidade pelas hemácias, encontra-se em percentuais de 100%, e em plasma, ligado a algumas proteínas plasmáticas, atingindo percentuais de 28%.

Apesar de os espécimes do grupo teste estarem expostos somente ao metilmercúrio através da alimentação, os percentuais de metilmercúrio encontrados tanto em músculo quanto em fígado foram abaixo dos 100%, demonstrando que o ao entrar no organismo ele é biotransformado, sendo quebrada a ligação entre o grupamento metila e o mercúrio, liberando mercúrio inorgânico na corrente sanguínea. Este poderia ser facilmente oxidado ou reduzido e eliminado pelas brânquias, pela urina ou pelas fezes. A razão entre as concentrações de metilmercúrio em músculo e em fígado foi maior que a unidade, denotando um equilíbrio das concentrações encontradas no peixe e no meio em que vive, como sugerido por DOWNS *et al.* (1999).

Foram investigadas as relações entre as concentrações no sangue e nos órgãos, bem como no músculo e em outros órgãos, para se observar padrões de acumulação do mercúrio. Dessas relações entre as concentrações nos tecidos e órgãos estudados, somente a relação entre HgHe e HgPI foram diferentes entre o grupo teste e o grupo controle, sendo maior no grupo teste.

Todas as outras relações foram similares, o que indicaria uma rota preferencial do metilmercúrio no organismo (toxicocinética), não relacionada com a dose, mas com a forma do Hg ao qual o organismo está exposto. Assim do tecido sanguíneo, o metilmercúrio é distribuído pelos órgãos, tendo uma maior afinidade pelo músculo, onde ele ficou acumulado em um maior percentual para este ensaio. No bioensaio I não foram realizadas determinações de metilmercúrio.

Essa acumulação maior no músculo observada no experimento, vem reforçar que as diferenças encontradas entre espécies, e em especial, entre as áreas de estudo, discutidas no capítulo 5.5, estão relacionadas a forma de mercúrio ao qual esses animais estão expostos e que relações mais altas, com maior acumulação no músculo, indicam uma maior exposição ao metilmercúrio.

Em relação aos biomarcadores de efeito, a tabela 25 mostra os resultados encontrados para o eritrograma, a bioquímica sérica, a concentração de Hg total nos eritrócitos e os parâmetros biométricos, a tabela 26, os dados de leucograma e frequências de micronúcleo e núcleo bilobado, e a tabela 27 os valores encontrados para os biomarcadores de efeito analisados somente na coleta de 6 meses.

Tabela 25. Resultados encontrados para hemograma, bioquímica sérica, concentração de mercúrio total (peso úmido) nos eritrócitos e parâmetros biométricos de apaiaris (*Astronotus ocellatus*) expostos a metilmercúrio (7ppm) em laboratório. (n)= número de espécimes.

Parâmetros	Coleta Branco		2 meses		4 meses		6 meses	
	Controle	Teste	Controle	Teste	Controle	Teste	Controle	Teste
CT (cm)	14,6±0,7 (13)	14,4±0,6 (13)	16,8±1,8 (11)	17,5±0,6 (13)	19,2±1,3 (9)	19,0±1,2 (11)	17,3±3,8 (16)	19,9±1,4 (13)
CP (cm)	11,7±0,7 (13)	11,5±0,6 (13)	13,8±1,2 (11)	14,4±0,7 (13)	15,2±1,3 (9)	15,0±0,9 (11)	13,6±3,0 (16)	15,9±1,1 (13)
Peso (g)	69,9±11,3 (13)	68,1±9,8 (13)	109,2±23,4 (11)	108,8±18,0 (13)	181,8±45,2 (9)	180,1±29,3 (12)	145,6±77,3 (16)	196,5±38,1 (13)
FC	2,2±0,2 (13)	2,3±0,1 (13)	2,2±0,3 (11)	2,0±0,2 (13)	2,5±0,4 (9)	2,6±0,2 (11)	2,4±0,4 (16)	2,5±0,1 (13)
HgHe (ng/g)	57,2±41,8 (11)	5,3±5,8 (13)	7,4±12,4 (9)	543,7±258,9 (11)	9,7±4,7 (6)	1090,6±231,0 (5)	7,0±6,9 (7)	882,3±101,3 (9)
VG(%)	22,8±7,4 (13)	22,8±5,9 (13)	25,1±9,3 (10)	30,5±4,8 (13)	24,8±3,0 (5)	20,4±2,1 (8)	27,1±5,1 (8)	24,6±2,7 (9)
H (10 ⁶ /mm ³)	1,8±0,5 (12)	1,6±0,5 (13)	1,6±0,7 (11)	1,4±0,6 (13)	1,8±0,5 (5)	1,2±0,2 (8)	2,2±0,6 (7)	2,0±0,5 (9)
Hb (mg/l)	4,7±1,9 (8)	6,5±2,9 (9)	2,5±0,3 (10)	2,5±0,6 (13)	4,7±1,7 (5)	5,4±1,4 (8)	5,6±0,9 (7)	6,5±0,9 (9)
VGM (fl)	129,9±42,5 (12)	144,0±45,6 (13)	166,5±72,8 (10)	262,0±121,7 (13)	148,3±37,1 (5)	155,0±37,5 (8)	120,5±22,8 (7)	137,0±60,6 (9)
CHGM (%)	19,8±8,6 (8)	28,8±13,9 (9)	11,2±4,3 (9)	8,5±2,7 (13)	19,7±9,6 (5)	27,0±9,0 (8)	22,1±2,6 (7)	26,8±3,8 (9)
PPT (g/dl)	5,3±0,5 (13)	5,1±0,5 (13)	6,1±1,2 (11)	5,9±0,7 (13)	5,9±0,3 (5)	5,2±0,4 (8)	5,8±0,4 (8)	6,0±0,5 (9)
ALT (U/L)	5,0±5,0 (3)	5,0±0,0 (1)	5,6±1,8 (8)	7,5±5,4 (10)	15,5±21,0 (4)	6,0±6,1 (10)	-	-
AST (U/L)	85,7±51,0 (9)	79,2±42,3 (5)	28,9±13,7 (8)	16,8±3,8 (9)	33,0±14,7 (4)	25,2±13,5 (10)	45,8±21,8 (8)	41,2±9,0 (8)
Creat (mg/dL)	0,1±0,0 (2)	-	0,1±0,0 (8)	0,1±0,0 (9)	0,2±0,1 (4)	0,2±0,1 (10)	0,3±0,2 (8)	0,3±0,1 (9)
Ureia (mg/dL)	3,6±1,1 (5)	4,3±1,5 (3)	3,2±1,6 (6)	3,6±0,9 (5)	6,0±0,8 (4)	5,0±1,5 (10)	8,4±3,1 (8)	8,6±4,6 (9)

CT= Comprimento total; CP= comprimento padrão; FC= fator de condição; HgHe= mercúrio total em hemácias; VG=Volume globular; H=hematimetria; Hb=hemoglobina; VGM = volume globular médio; CHGM=concentração de hemoglobina globular média; PPT= proteína plasmática total; ALT= alanina aminotransferase; AST= aspartato aminotransferase; Creat= creatinina.

Tabela 26. Resultados encontrados para leucograma e frequência de micronúcleo e núcleo bilobado em apaiaris (*Astronotus ocellatus*) expostos a metilmercúrio (7ppm) em laboratório. (n)= número de espécimes.

Parâmetros	Coleta Branco		2 meses		4 meses		6 meses	
	Controle	Teste	Controle	Teste	Controle	Teste	Controle	Teste
Leucócito %	52,3±12,6 (13)	54,2±11,9 (13)	54,2±12,0 (11)	49,3±9,3 (12)	54,2±10,9 (6)	61,4±16,9 (12)	51,1±6,9 (8)	59,6±5,1 (9)
Trombócito %	47,7±12,6 (13)	45,8±11,9 (13)	45,8±12,0 (11)	50,7±9,3 (12)	45,8±10,9 (6)	38,6±16,9 (12)	48,9±6,9 (8)	40,4±5,1 (9)
LG (n/mm ³)	175,0±92,6 (3)	387,5±222,7 (2)	235,4±107,8 (11)	167,3±54,8 (13)	412,0±124,1 (5)	559,4±262,8 (8)	354,3±412,3 (7)	197,2±90,1 (9)
L (n/mm ³)	69,8±40,0 (3)	188,6±87,8 (2)	129,4±73,8 (11)	83,6±28,9 (12)	218,7±87,2 (5)	331,1±191,0 (8)	182,9±215,7 (7)	115,2±42,6 (9)
T (n/mm ³)	105,2±54,7 (3)	198,9±134,9 (2)	106,1±50,0 (11)	86,8±34,3 (12)	193,3±69,7 (5)	228,2±115,0 (8)	171,3±197,2 (7)	81,9±49,6 (9)
Eosinófilo (%)	1,6±1,7 (13)	1,6±1,5 (13)	10,9±5,8 (11)	6,2±4,9 (12)	3,8±2,7 (6)	2,2±2,6 (12)	12±6,9 (8)	10,3±5,6 (9)
Eosinófilo (n/mm ³)	0,8±0,7 (3)	5,0±3,5 (2)	13,9±10,3 (11)	4,8±3,6 (12)	8,4±4,6 (5)	6,2±10,2 (8)	23,3±29,2 (7)	11,9±7,4 (9)
Neutrófilo (%)	2,5±1,4 (13)	1,3±1,6 (13)	7,5±4,8 (11)	2,6±2,4 (12)	3,8±4,0 (6)	1,0±1,5 (12)	5,9±2,0 (8)	4,4±2,5 (9)
Neutrófilo (n/mm ³)	2,1±1,6 (3)	1,9±0,9 (2)	9,9±8,8 (11)	2,4±2,8 (12)	6,2±5,9 (5)	3,6±4,7 (8)	10,0±10,5 (7)	5,4±4,3 (9)
Linfócito (%)	94,1±3,5 (13)	93,2±3,8 (13)	74,0±9,8 (11)	85,2±6,4 (12)	88,0±6,8 (6)	93,5±3,6 (12)	71,4±9,1 (8)	76,4±4,9 (9)
Linfócito (n/mm ³)	65,7±38,9 (3)	178,5±87,9 (2)	96,3±57,8 (11)	71,2±25,3 (12)	195,9±91,6 (5)	310,5±180,2 (8)	133,9±171,2 (7)	88,4±34,1 (9)
Monócito (%)	1,7±1,7 (13)	4,0±3,1 (13)	7,5±4,7 (11)	6,1±2,9 (12)	4,3±4,9 (6)	3,2±2,3 (12)	11,1±6,2 (8)	8,8±4,7 (9)
Monócito (n/mm ³)	1,1±0,3 (3)	3,2±4,5 (2)	9,2±6,3 (11)	5,2±3,2 (12)	8,2±7,5 (5)	10,7±9,4 (8)	16,3±10,5 (7)	9,5±4,2 (9)
MN (n/1.000cels)	0,1±0,3 (12)	0,8±1,5 (13)	0,1±0,3 (11)	0,2±0,6 (13)	0±0 (6)	0,2±0,4 (12)	0,5±1,1 (8)	0,2±0,4 (9)
NB (n/1.000cels)	0,5±0,7 (12)	0,8±1,4 (13)	0,2±0,4 (11)	0,8±0,8 (13)	2,2±1,9 (6)	3,1±2,0 (12)	1,1±0,9 (8)	0,9±1,3 (9)

LG= leucometria global; L= número de leucócitos; T= número de trombócitos; MN= micronúcleo; NB= núcleo bilobado.

Tabela 27. Médias±desvio padrão das atividades enzimáticas encontradas para o grupo controle e para o grupo teste do ensaio de 6 meses realizado com apaiaris *Astronotus ocellatus* expostos artificialmente a metilmercúrio. (n)= número de espécimes.

Parâmetros	Controle	Teste
GSHt (µmol/ml)	0,196±0,033 (7)	0,222±0,037 (9)
GR (µmol/min/mg)	16,6±5,9 (7)	17,7±5,4 (8)
GPx (µmol/min/mg)	176,6±30,3 (7)	174,2±26,9 (9)
CAT (µmol/min/mg)	427,9±68,1 (7)	488,1±103,1 (9)
AChE_PI (µmol/min/mg)	0,118±0,012 (5)	0,143±0,057 (9)
BChE_PI (µmol/min/mg)	0,007±0,001 (5)	0,007±0,001 (9)
AChE_M (µmol/min/mg)	0,175±0,084 (16)	0,130±0,041 (13)

GSHt= glutathiona total nas hemácias; GR= glutathiona redutase nas hemácias; GPx= glutathiona peroxidase nas hemácias; CAT= catalase nas hemácias; AChE_PI= acetilcolinesterase no plasma; BChE_PI= butirilcolinesterase no plasma; AChE_M= acetilcolinesterase no músculo.

Os peixes cresceram de forma homogênea entre os grupos, ou seja, o tamanho e o peso dos animais, bem como o fator de condição, no grupo teste não foram diferentes do grupo controle durante o experimento. Entre a primeira coleta (branco) e a quarta (de seis meses de exposição) houve a perda de 10 espécimes, 6 do grupo controle e 4 do grupo teste. Além disso, faz-se necessário ressaltar que o volume de sangue coletado era insuficiente para realização de todos os parâmetros em alguns casos. Por isso, são observadas as diferenças nos números de amostras analisadas em cada parâmetro e durante o tempo do experimento.

Primeiramente, foram investigadas possíveis variações dentro de cada grupo através do tempo do ensaio. Algumas variáveis sofreram oscilações tanto no grupo controle quanto no grupo teste, como por exemplo, a Hb e a CHGM que na coleta de 2 meses ($p<0,05$) apresentaram os menores valores de todo o experimento. As médias encontradas para AST na primeira coleta (tempo 0) foram as maiores do ensaio ($p<0,05$), bem como os valores de ureia na coleta de 6 meses ($p<0,05$). A frequência de núcleo bilobado foi maior na coleta de 4 meses ($p<0,05$) para ambos os grupos. E o comportamento do percentual de eosinófilos e de neutrófilos seguiu o mesmo padrão para os dois grupos, sendo menores na coleta do tempo zero,

aumentando após 2 meses, voltando a decrescer na coleta de 4 meses e aumentado novamente na de 6 meses ($p < 0,01$). O percentual de monócitos seguiu o mesmo padrão dos eosinófilos e neutrófilos, mas apenas para o grupo controle ($p < 0,001$).

A concentração de mercúrio em hemácias, para o grupo controle, obteve a média mais alta no início do experimento (coleta tempo zero), provavelmente estando ligada a ração dada durante o período de aclimação dos animais no laboratório antes do experimento (aproximadamente 4 meses), sem um controle maior na quantidade dada a cada animal. Lembrando que todas as rações comerciais utilizadas possuíam baixas concentrações de mercúrio, mas estas não eram nulas. E como o esperado, o grupo teste apresentou um aumento exponencial nas concentrações de mercúrio nas hemácias nas três primeiras coletas, mas as concentrações após 6 meses de exposição não diferenciaram das concentrações encontradas na coleta de 4 meses (Anova, $F=9,94$; $p < 0,01$).

Este fato pode ser explicado devido ao início da rejeição de alimento contaminado por parte dos animais do grupo teste, que em alguns dias desse último período de dois meses não comeram 100% da quantidade de ração contaminada que deveriam.

Para o grupo teste, o VG e o VGM apresentaram valores mais altos na coleta de 2 meses em relação a todas as outras coletas ($p < 0,01$). A PPT oscilou durante todo o experimento, começando mais baixa, aumentando após 2 meses, voltando a média da coleta no tempo zero, com um novo aumento na coleta de 6 meses. O percentual de linfócito também oscilou, no entanto iniciou mais alto, decresceu aos dois meses, voltou a subir, alcançando os valores mais altos aos 4 meses, tendo uma queda considerável aos 6 meses, onde apresentou os menores valores de todo o experimento, justamente devido ao aumento do percentual de eosinófilos e de neutrófilos.

Diferenças por sexo e por estágio gonadal foram investigadas, mas não foram observadas, exceto diferenças já esperadas para peso e tamanho entre jovens e adultos ($p < 0,05$).

Analisando possíveis diferenças entre controle e teste, através do tempo, na primeira coleta, onde nenhum espécime fora contaminado ainda, somente houve diferença significativa para o percentual de neutrófilos, que permaneceu mais alto no grupo controle durante todo o experimento ($p < 0,05$) e para o percentual de monócito que foi menor no grupo controle somente na primeira coleta ($p < 0,05$), sendo similar durante o ensaio.

Após 2 meses de exposição, foi observado o aumento do VGM (Anova, $F=4,8$; $p < 0,05$) e o decréscimo de AST (Anova, $F=6,5$; $p < 0,05$), além do aumento exponencial da concentração de mercúrio nas hemácias (Anova, $F=33,6$; $p < 0,001$) no grupo teste. A frequência de NB aumentou ($p < 0,05$). A leucometria global ($p < 0,05$) e o percentual de eosinófilos ($p < 0,05$) diminuíram no grupo teste, já o percentual de linfócitos aumentou ($p < 0,005$).

Aos 4 meses de experimento, as concentrações de mercúrio continuaram a aumentar (Anova, $F=62,1$; $p < 0,001$) e tanto o VG quanto a PPT decresceram (Anova, $F=9,9$; $p < 0,01$; $F=10,0$; $p < 0,01$, respectivamente). A PPT apresentou correlação significativa com a concentração de Hg nas hemácias, reforçando a interação entre ambos (Spearman, $-0,77$; $p < 0,01$; $n=10$). Esses resultados refletem as mudanças no volume ocupado pelos eritrócitos no sangue, sem alteração significativa da hematimetria (número de hemácias), sugerindo desequilíbrios osmóticos ou até mesmo quadro de anemia, onde um aumento do volume poderia estar demonstrando um menor número de eritrócitos jovens e um maior número de eritrócitos adultos, mostrando que a produção e a maturação desses eritrócitos estão sendo alteradas devido a exposição ao metilmercúrio.

No fim dos 6 meses, o grupo teste apresentou um maior valor de CHGM ($p < 0,05$) e de percentual de leucócitos, além de um menor percentual de trombócitos ($0,05$).

Jovens são mais susceptíveis do que adultos a exposição a uma substância tóxica. A resposta rápida encontrada nos primeiros 2 meses, podem denotar esse período de maior vulnerabilidade, com uma rápida adaptação nos mecanismos de detoxicação.

Observou-se que de modo geral, considerando todo o conjunto de dados deste ensaio, o grupo teste apresentou maiores médias para Hb ($F=4,278$; $p<0,05$), VGM ($F=9,635$; $p<0,005$) e CHGM ($F=9,558$; $p<0,005$). Estes resultados sugerem que as hemácias do grupo teste possuem maior volume, estando alteradas eletroliticamente, e com uma maior concentração de hemoglobina, talvez como reação a uma possível perda dos grupos de Fe livres nas hemácias por competição com o Hg.

Tanto a Hb ($0,295$; $p<0,05$; $n=54$ / $0,51$; $p<0,05$; $n=16$, respectivamente) quanto a CHGM ($0,57$; $p<0,05$; $n=15$ / $0,621$; $p<0,05$; $n=16$, respectivamente) estão positivamente correlacionados com as concentrações de Hg nas hemácias, bem como com o Hg em músculo. A CHGM ainda apresentou correlação positiva com o Hg em fígado ($0,656$; $p<0,01$; $n=16$), corroborando ainda mais a relação entre o aumento da hemoglobina no sangue com um aumento da exposição a metilmercúrio.

A hemoglobina está correlacionada negativamente com o volume globular ($-0,253$; $p<0,05$; $n=69$) e com a PPT ($-0,261$; $p<0,05$; $n=69$). Isto indicaria que com o aumento da exposição ao metilmercúrio e consequente aumento na concentração de hemoglobina no sangue, o volume globular diminuiria, ou seja, o percentual do volume do sangue ocupado por hemácias seria menor e o plasma seria menos rico em proteínas.

Tratando-se do leucograma, observou-se que os percentuais de neutrófilos ($F=5,875$; $p<0,05$) e de monócitos ($F=5,288$; $p<0,05$) foram menores no grupo teste e o de linfócitos foi maior ($F=7,768$; $p<0,01$). O maior número de linfócitos está indicando um menor número ou até mesmo ausência de outros tipos leucocitários, o que acarretaria em uma deficiência no sistema imunológico desses animais. Correlações entre os percentuais de neutrófilos ($-0,342$; $p<0,01$; $n=63$) e de linfócito ($0,406$; $p<0,005$; $n=47$) e as concentrações de Hg em hemácias, corroboram a influência da exposição ao metilmercúrio e a inibição na produção de neutrófilos e aumento na produção de linfócitos. O número de monócitos está correlacionado negativamente com as concentrações de Hg no músculo ($-0,580$; $p<0,05$; $n=15$).

Outras correlações encontradas entre as concentrações de Hg em plasma e em músculo e os percentuais de leucócitos ($0,65$; $p<0,05$; $n=14$ / $0,547$; $p<0,05$;

n=15, respectivamente) e trombócitos (-0,65; p<0,05; n=14 / -0,547; p<0,05; n=15) indicam o aumento na produção de leucócitos (como visto, preferencialmente do tipo linfócito), com diminuição no número de trombócitos.

Correlações entre as concentrações de mercúrio nas hemácias (-0,386; p<0,005; n=54) e nas gônadas (0,787; p<0,05; n=9) com a AST também foram encontradas. Níveis de ALT foram diminuídos em função da exposição a mercúrio em ensaios realizados por GILL e colaboradores (1990).

De acordo com os resultados encontrados, possíveis efeitos genotóxicos são desencadeados devido a exposição ao metilmercúrio, visto que maiores frequências tanto de micronúcleo (F=6,327; p<0,05), quanto de núcleo bilobado (F=4,075; p<0,05) foram encontradas para o grupo teste. Além disso, a frequência de micronúcleo está positivamente relacionada com as concentrações de mercúrio nas hemácias (0,423; p<0,001; n=63). No entanto, as frequências encontradas foram muito baixas, especialmente quando comparadas com outros ensaios laboratoriais com outras espécies de peixe, chegando a frequências de micronúcleo iguais a 80 ou 113 em 1.000 eritrócitos (AL-SABTI, METCALFE, 1995).

NEPOMUCENO *et al.* (1997) observaram que carpas *Cyprinus carpio* expostas a 20 e 200ppm de mercúrio metálico obtiveram indução da ocorrência de micronúcleo em eritrócitos, alcançando o máximo de 21 micronúcleos em 1.000 eritrócitos. No entanto, o aumento na ocorrência de micronúcleo se deu nos primeiros dois meses de experimento, decrescendo até o fim do quinto mês.

Em relação aos biomarcadores de efeito medidos somente após os 6 meses de exposição (grupo das glutatona e das colinesterases), não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo teste. Todavia, foram encontradas relações destes parâmetros com as concentrações de Hg em diferentes órgãos, o que pode demonstrar uma indicação.

A acetilcolinesterase em músculo (AChEM) apresentou correlação negativa com a relação HgM / HgF (-0,46; p<0,05; n=24), indicando uma possível inibição desta enzima neste tecido devido ao acúmulo de metilmercúrio no músculo. E quando foram observadas correlações utilizando somente o grupo de dados dos espécimes expostos ao metilmercúrio, outras correlações negativas foram

encontradas para a atividade de acetilcolinesterase e a relação HgHe / HgPI (-,0762; $p < 0,05$; $n=8$) e a concentração de Hg no fígado (-0,817; $p < 0,01$; $n=9$).

Apesar de não haver diferença significativa entre grupos controle e teste para as atividades de glutatona, uma correlação negativa entre a relação HgM / HgF e a glutatona total foi encontrada (-0,601; $p < 0,05$; $n=15$), indicando uma possível inibição de sua atividade com o aumento da exposição a metilmercúrio. Trabalhos utilizando fígados de bagres *G. genidens* oriundos do litoral de Santa Catarina, demonstraram que há um aumento da glutatona total, glutatona redutase e diminuição da glutatona redutase e da catalase em peixes de áreas contaminadas (WILHELM FILHO *et al.*, 2001). ARIZA *et al.* (1994) mostraram uma inibição da glutatona reduzida em células expostas a altas concentrações de mercúrio Hg⁺². Já para o peixe *Danio rerio* a atividade do grupo das glutatonas no fígado foi incrementada após 63 dias de exposição a metilmercúrio (GONZALEZ *et al.*, 2005).

O grupo das enzimas de estresse oxidativo está estritamente ligado ao transporte e transformações do Hg no fígado e em outros tecidos com diferentes mecanismos para eliminação do mesmo. A catalase pode oxidar o Hg⁰ a Hg⁺² fazendo com que este permaneça mais tempo na corrente sanguínea sem atingir órgãos vitais como o cérebro. Chegando ao fígado, esse Hg⁺² pode ser reduzido novamente e é excretado pelos pulmões ou pelas brânquias (CLARKSON, 1994).

Além das alterações hematológicas e bioquímicas encontradas e descritas acima, foram investigadas possíveis alterações tissulares, utilizando para isso, exames de histopatológico de fígados e gônadas dos espécimes que sobreviveram até o fim do experimento.

Na tabela 28 são apresentadas as alterações encontradas nos cortes histológicos de fígado de espécimes do grupo controle (simbolizado pela letra C) e do grupo teste (simbolizados com a letra T), discutidos primeiramente. Algumas destas alterações podem ser observadas nas figuras 39 e 40.

No geral, todos apresentaram um aumento no volume dos hepatócitos devido ao acúmulo de gordura, incluindo os espécimes do grupo controle, formando macrovacúolos. Este fato, anteriormente considerado como erro de alimentação, pode ser explicado como um armazenamento natural de energia por essa espécie,

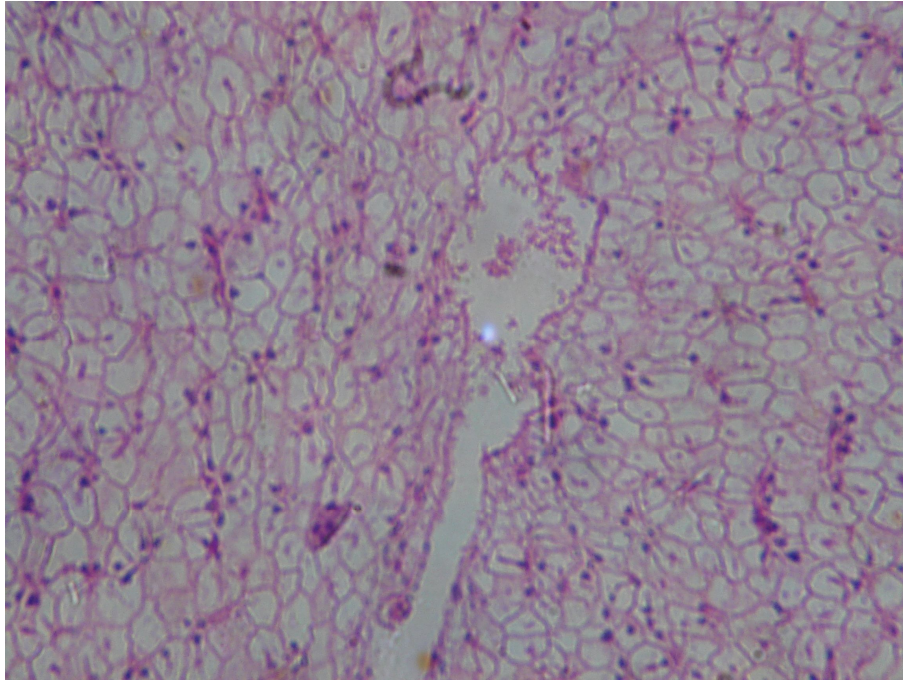


Figura 39. Hepatócitos irregulares com volume maior do que o normal, formando macrovacúolos, quase ausência de núcleos e de sinusóides oriundo de espécime do grupo teste após 6 meses de exposição ao metilmercúrio.

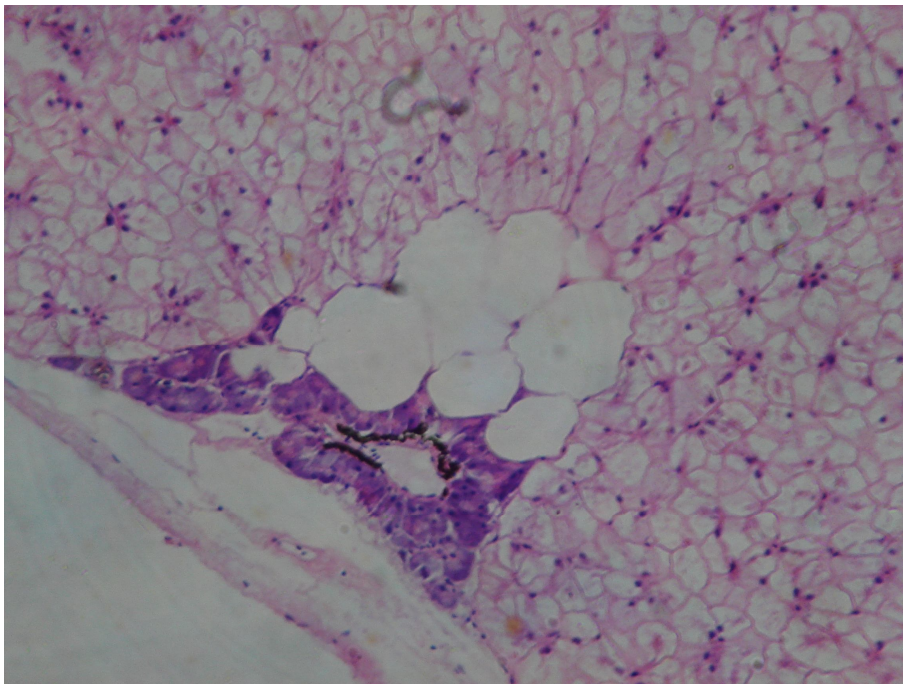


Figura 40. Área de necrose no tecido hepático oriundo de espécime do grupo teste após 6 meses de exposição ao metilmercúrio.

para usá-lo durante o período reprodutivo. Caso esse acúmulo seja realmente de uma reserva energética, o glicogênio, uma coloração específica para glicogênio poderá confirmar esta nova hipótese. Apesar de ambos os grupos apresentarem macrovacúolos, no grupo teste, estes parecem visualmente maiores do que no grupo controle.

Foram observadas células pancreáticas no tecido hepático. Algumas espécies de peixes possuem o sistema pancreático inserido no fígado. Aparentemente o apaiari é uma delas (BONE *et al.*, 1999).

O número de núcleos dos hepatócitos, mesmo no controle não foi normal, pois alguns hepatócitos não tinham núcleo. Contudo, em comparação com o grupo teste, os hepatócitos dos animais do grupo controle possuíam maior número de núcleos, algo próximo ao normal. A mesma relação foi observada em relação a forma do núcleo dos hepatócitos, onde dois espécimes do grupo controle apresentaram tanto células com núcleo alterado como núcleos normais. As outras lâminas do grupo controle apresentavam células com núcleos mais redondos, robustos e com nucléolos evidentes. Como a anomalia no formato estava presente na minoria das células, em uma ou outra área do corte, elas foram consideradas como + / - na tabela.

Apesar de ambos os grupos apresentarem áreas de necrose tanto de células pancreáticas quanto de células do parênquima hepático, as áreas de necrose são visualmente maiores no grupo teste, evidenciando um pior cenário para este grupo. Da mesma forma, a intrusão leucocitária no parênquima hepático é mais frequente nos cortes do grupo teste, um baixo número de ocorrências no grupo teste. Inclusive, foram encontradas várias intrusões inflamatórias abaixo da cápsula hepática.

Esse padrão também foi encontrado para áreas com hemorragias, onde no grupo controle, essas áreas eram bem mais restritas e pequenas, chegando a ser apenas uma.

Os melanomacrófagos livres no parênquima no grupo teste eram em maior número do que no grupo controle, apesar de estar presente em ambos. Já a frequência dos centros de melanomacrófagos no grupo teste (3,9) foi o

dobro da encontrada no grupo controle (2,1). Os resultados encontrados por MELA *et al.* (2007) corroboram com este padrão encontrado no presente estudo. Os centros de melanomacrófagos são encontrados na derme, hipoderme, rim, baço, fígado e grupos de células no sangue e na linfa, removendo partículas estranhas ou produtos da degradação celular por fagocitose (MELA *et al.*, 2007).

Das 15 alterações observadas nos cortes de fígado, 8 ocorreram em ambos os grupos em pelo menos 80% das lâminas. Quatro alterações ocorreram em ambos os grupos, mas de forma mais atenuada no grupo controle, com menor frequência (menos de 50% das lâminas com alteração). E somente duas alterações (diminuição do número de sinusóides e formato do núcleo dos hepatócitos) foram observadas somente no grupo teste.

BAATRUP *et al* (1986) observaram a formação de centros catalíticos com mercúrio e enxofre no fígado de peixes expostos a cloreto de mercúrio.

De modo geral, as condições dos tecidos do fígado eram melhores no grupo controle, mesmo na presença de pequenas alterações, do que no grupo teste. Assim, o grupo controle, com um número de sinusóides normal, há uma garantia de maior ligação dos tecidos, mantendo-os coesos. E com hepatócitos com menores alterações de forma, tamanho e no número de núcleos, há uma maior probabilidade das funções hepáticas e pancreáticas mantidas nesses indivíduos.

Em relação a histopatologia de gônadas, na tabela 29 estão apresentadas as alterações observadas para o grupo teste e para o grupo controle. Na figura 41 podem ser observadas algumas das alterações em espécime do grupo teste após os 6 meses de exposição.

As células perifoliculares são normalmente colunares. No grupo teste a maioria das células eram achatadas. Quando colunares, as células apresentavam uma vacuolização, ficando arredondadas.

Degeneração vitelínica, hiperplasia da camada folicular, presença de material protéico entre folículos e a degeneração de folículos primários e

secundários foram observadas em ambos os grupos em 80% ou mais dos cortes analisados.

Tabela 29. Alterações histológicas em gônadas de apaiaris *Astronotus ocellatus* fêmeas expostas artificialmente a metilmercúrio por 6 meses. NI= parâmetro não identificado nesta lâmina.

ALTERAÇÕES NO TECIDO GONADAL	GRUPO CONTROLE					GRUPO TESTE			
	C1	C4	C5	C6	C8	T3	T4	T5	T12
Aumento no número de folículos atrésicos	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Degeneração vitelínica	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hipertrofia da camada folicular	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Hiperplasia da camada folicular	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Presença de material protéico entre folículos	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Presença de infiltrado inflamatório	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Aumento no número de centros de melanomacrófagos	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Diminuição do número de folículos primários	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Diminuição do número de folículos secundários	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Degeneração de folículos primários e secundários	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Vacuolização das células de revestimento dos folículos	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Fibrose – proliferação de células do tecido conjuntivo	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Alteração na forma das células perifoliculares	-	-	-	-	+/-	+	+/-	+/-	+

A vacuolização das células de revestimento dos folículos, a fibrose e a alteração nas células perifoliculares foram observadas em menos de 40, 20 e 20%, respectivamente, das lâminas do grupo controle, estando presentes em 100% das lâminas do grupo teste.

Das 13 alterações observadas nas gônadas, 6 não foram observadas no grupo controle. São elas: aumento no número de folículos atrésicos, hipertrofia da camada folicular, presença de infiltrado inflamatório, aumento no número de centros de melanomacrófagos e diminuição do número de folículos primários e

secundários. O número de centros de melanomacrófagos foi 20 vezes maior no grupo teste (8,0) do que no grupo controle (0,4).

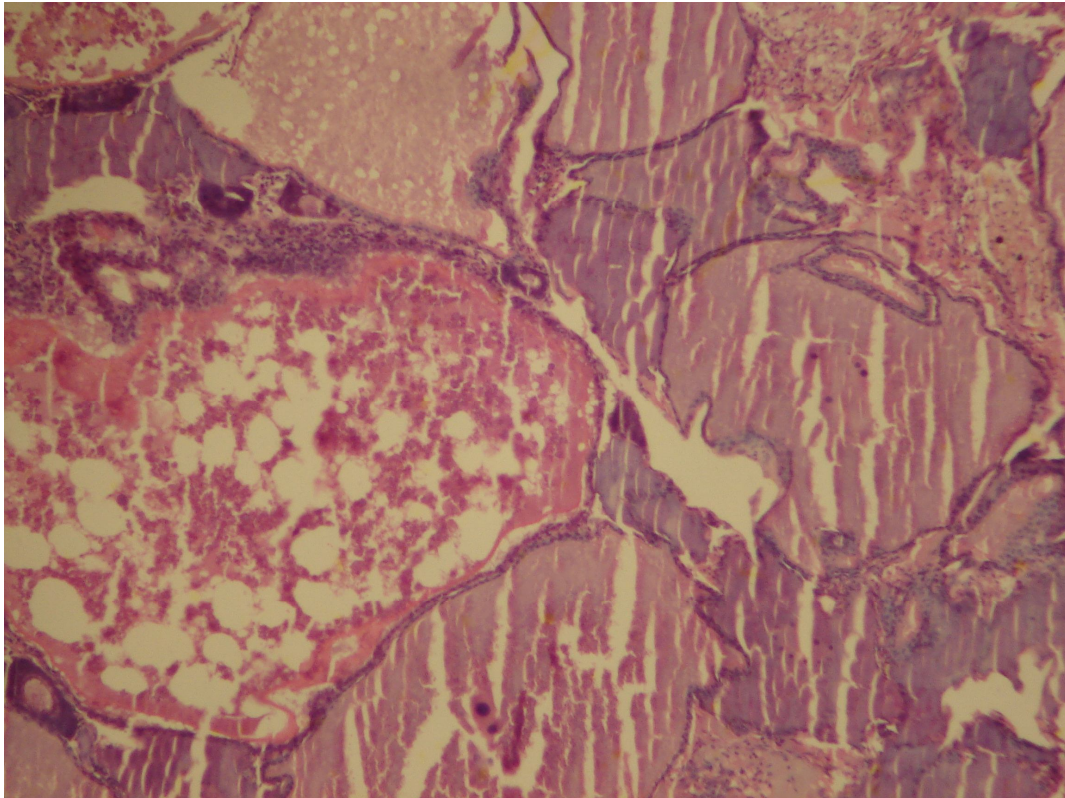


Figura 41. Áreas com degeneração vitelínica, presença de material protéico e degeneração de folículos oriundo de espécime do grupo teste após 6 meses de exposição ao metilmercúrio.

Todas essas alterações podem ser ligadas a exposição ao metilmercúrio, evidenciando uma maior deteriorização dos tecidos do órgão reprodutivo, o que na natureza poderia levar a uma diminuição na taxa de reprodução desta espécie e/ou do sucesso reprodutivo, com uma diminuição do número de filhotes que conseguem sobreviver até a idade adulta.

Ensaio laboratoriais demonstram a relação entre a exposição a metilmercúrio e a diminuição no sucesso reprodutivo de peixes (SANDHEINRICH, MILLER, 2006), através da redução do desenvolvimento da gônada, inclusive do índice gonadosomático (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2002), do aumento do número de folículos sofrendo apoptose (DREVNICK *et al.*,

2006) e da inibição da produção de testosterona pelos machos e de estradiol pelas fêmeas, decrescendo o número de ovos (DREVNICK, SANDHEINRICH, 2003). As concentrações de metilmercúrio em ovos estão altamente relacionadas com a alimentação da fêmea, podendo variar juntamente com a variação dos itens alimentares (HAMMERSCHMIDT, SANDHEINRICH, 2005).

É importante ressaltar que em ambos os ensaios, os resultados mais claros em relação a toxicidade do mercúrio e seus possíveis efeitos em peixes foram demonstrados através dos cortes histológicos. Estes mostraram alterações severas em órgãos de importância vital para a qualidade de vida do animal. Essa ferramenta foi muito útil e trabalhos futuros devem ampliar estudos histológicos, inclusive de outros órgãos como rins e brânquias.

6 CONCLUSÕES

As concentrações de mercúrio no músculo no fígado e no rim foram maiores na Baía da Ribeira, mesmo após padronização dos dados por tamanho e peso. foram mais altas do que na Baía de Guanabara, indicando uma maior disponibilidade do mercúrio naquela área. Indicações relacionadas às concentrações de mercúrio em plasma sugerem que os peixes da Baía de Guanabara estão expostos a fontes de mercúrio inorgânico.

Foram identificadas áreas de maior biodisponibilidade do mercúrio para peixes. Na Baía de Guanabara, as duas estações com menor circulação e maior influência do continente, Gradim e Praia da Bica, apresentaram as maiores concentrações de Hg. Na Baía da Ribeira, a enseada do Bracuí, apresentou as maiores concentrações. O saco Piraquara de Fora apresentou concentrações tão altas quanto Bracuí, sendo necessária uma maior coleta de dados nessa estação.

As concentrações de mercúrio variaram de acordo com a estação do ano, sendo menores no verão, possivelmente devido ao aumento da biomassa no sistema, mudanças na carga de material em suspensão devido a eventos de chuva mais intensos, diminuindo a biodisponibilidade do mercúrio no sistema.

A composição elementar indicou que ambas as espécies são enriquecidas em nitrogênio. A composição isotópica sugere que as espécies são carnívoras, tendo as cocorcas uma alimentação mais restrita do que os bagres. A relação com o acúmulo de mercúrio foi mais clara quando relacionada ao $\delta^{15}\text{N}$, sugerindo a relação com nível trófico. Seria importante em trabalhos futuros acompanhar a evolução da composição isotópica através do tempo para observar possíveis influências de uma alimentação diferente nas estações do ano e o acúmulo de mercúrio.

Em relação a acumulação através do tempo, as cocorocas apresentaram praticamente o mesmo ritmo de acumulação em ambas as áreas, sendo que na Baía da Ribeira a acumulação está mais lenta do que em 2005. O mercúrio está mais disponível para ambos os bagres, no entanto, para o bagre *A. luniscutis*, a acumulação não parece ter ligação com o tamanho. E para o bagre *G. genidens* a acumulação mais rápida foi na Baía da Ribeira, sendo que em ambas as áreas o ritmo de acumulação aumentou em relação aos dados encontrados anteriormente.

Os percentuais de metilmercúrio encontrados para amostras de hemácias e músculo oriundas da Baía de Guanabara, demonstraram que há uma afinidade do metilmercúrio pelas hemácias. Já no músculo, o percentual encontrado para os bagres *Genidens genidens* está de acordo com a maior parte dos trabalhos anteriormente relatados (>80%), mas as cocorocas apresentaram média de 31% de metilmercúrio no músculo, diferença essa explicável por diferentes mecanismos no metabolismo dessas duas espécies.

O bagre *G. genidens* oriundo da Baía de Guanabara apresentou diferença significativa entre as concentrações de mercúrio total em plasma e a ingestão recente de alimentos, indicando que ele está exposto a fontes contendo mercúrio inorgânico.

Espécimes adultos apresentaram concentrações mais altas nos tecidos/órgãos analisados, indicando uma estreita relação entre a acumulação, a idade e a possibilidade de captura de itens alimentares maiores quando adultos. Para a cocoroca essa influência foi mais evidente pois houve diferença em relação às concentrações em hemácias, que relatam uma exposição

recente, mostrando que espécimes mais jovens estão expostos a uma dose menor de mercúrio, pois nesta fase elas se alimentam mais de zooplâncton do que de pequenos peixes.

As cocorocas apresentaram diferenças nas concentrações de músculo e fígado de acordo com o sexo, sendo mais altas em fêmeas, sugerindo que estas possam ter uma maior taxa de ingestão de alimento para compensar seu maior gasto energético por causa da produção de ovos.

Em relação aos efeitos, as cocorocas apresentaram uma maior ativação do processo de fabricação dos neutrófilos, talvez causada por pequenas inflamações. A depleção nos valores de hematimetria e de CHGM pode estar indicando uma deficiência no transporte de oxigênio dos animais coletados na Baía de Guanabara. Esses peixes também apresentaram uma possível inibição da AST, sugerindo falhas nos processos hepáticos, não correlacionados com as concentrações de Hg.

Nos bagres *G. genidens*, a hematimetria foi menor e o VGM foi maior na Baía de Guanabara, sugerindo um quadro de anemia não regenerativa. Os percentuais leucocitários não indicaram possíveis quadros clínicos de infecção ou inflamação. Os altos níveis de ureia na Baía de Guanabara podem estar indicando uma falha na excreção através das brânquias.

Uma correlação negativa entre a atividade da AChE no músculo e as concentrações de Hg nos rins dos bagres *Genidens genidens* foi encontrada, reforçando a possibilidade da inibição desta enzima devido a exposição ao mercúrio.

As frequências de núcleo bilobado em bagres *G. genidens* foram maiores na Baía de Guanabara do que na Baía da Ribeira, mostrando a maior exposição desses animais ao estresse. Em comparação com as frequências anteriormente encontradas para esta espécie, na Baía da Ribeira a frequência diminuiu drasticamente e na Baía de Guanabara, a frequência foi mantida.

De acordo com a avaliação qualitativa dos biomarcadores observados, a ocorrência de efeitos foi maior na Baía da Ribeira quando foram consideradas também as concentrações de Hg nos animais (biomarcador de exposição).

Retirando-as da análise, os efeitos são similares entre as áreas. Mesmo com exposição a baixas concentrações de Hg no meio, os peixes da Baía da Ribeira responderam de forma similar fisiologicamente aos peixes da Baía de Guanabara. Lembrando que outros estressores químicos, físicos e biológicos podem estar influenciando no cenário de efeitos observados em ambas as áreas.

No primeiro bioensaio foram observados como efeitos da exposição ao metilmercúrio, a diminuição do número de hemácias, uma possível ativação da acetilcolinesterase, aumento no volume dos hepatócitos, degeneração dos hepatócitos, hipertrofia e hiperplasia da camada folicular, aumento no número de folículos atrésicos, degeneração vitelínica, presença de material protéico disperso entre as células e infiltrados inflamatórios tanto no fígado quanto em gônadas.

No segundo bioensaio foi observado que os percentuais de metilmercúrio em hemácias e em plasma demonstraram sua maior afinidade pelas hemácias (100%) do que pelo plasma (28%). Os percentuais em músculo e em fígado foram abaixo dos 100%, demonstrando que ao entrar no organismo o metilmercúrio é biotransformado e em parte excretado. Não foram observadas diferenças nas concentrações de mercúrio de acordo com o sexo ou com o estágio gonadal.

O grupo teste apresentou aumento de hemoglobina, de volume globular médio e de concentração de hemoglobina média, sugerindo que as hemácias do grupo teste possuem maior volume, estando alteradas eletroliticamente, e com uma maior concentração de hemoglobina, talvez como reação a uma possível perda dos grupos de Fe livres nas hemácias por competição com o Hg. Possíveis efeitos genotóxicos são desencadeados devido a exposição ao metilmercúrio, visto que maiores frequências tanto de micronúcleo, quanto de núcleo bilobado foram encontradas para o grupo teste.

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo teste, correlações entre a atividade de acetilcolinesterase em músculo (AChEM) e a relação HgM / HgF, indicam uma possível inibição desta enzima. Da mesma forma, a possível inibição de

glutathione foi demonstrada através de uma correlação negativa entre a relação HgM / HgF e a glutathione total.

As condições dos tecidos tanto de fígado quanto de gônadas do grupo teste sugerem possíveis falhas de ambos os órgãos, alterando o metabolismo de substâncias e a reprodução desses animais, respectivamente.

Mais estudos são necessários para entender melhor a dinâmica do mercúrio no sistema, quais os possíveis processos que ocorrem durante as diferentes estações do ano e os diferentes setores da Baía da Ribeira e da Baía de Guanabara estariam atuando e reduzindo ou aumentando sua disponibilidade. Bem como a toxicocinética do mercúrio dentro do organismo do peixe e os efeitos que ocorrem em cada tecido devido a sua acumulação. Ficou bem demonstrado que cada espécie tem taxa de acumulação própria, sendo influenciada por sua posição trófica, em especial de como se dá a absorção do alimento. Os mecanismos de detoxicação ainda são pouco conhecidos e os efeitos estudados também variaram de acordo com a espécie.

Dentre os biomarcadores de efeito utilizados pode-se destacar os resultados encontrados para o estudo da histologia de fígado e gônada, por terem indicado com maior sensibilidade possíveis efeitos ao organismo devido a exposição ao metilmercúrio em bioensaios. Desta forma, trabalhos utilizando cortes histológicos não só de fígado e gônada, mas de outros órgãos como brânquias e rins, podem ser de grande valia como ferramentas de gestão ambiental em futuras avaliações de risco ecológico.

Dentre os biomarcadores não-invasivos, o hemograma e a bioquímica sérica apresentaram sensibilidade suficiente para serem utilizados como ferramenta em monitoramento ambiental, sem a necessidade do sacrifício de animais para o acompanhamento da melhoria da saúde do ecossistema.

7 REFERÊNCIAS

ABREU, I. M. **Avaliação geoquímica, biológica e ecotoxicológica dos sedimentos da Baía de Guanabara – RJ.** (Tese de doutorado.) Departamento de Geoquímica. 2009.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v.105, p.121-126, 1984.

AKAGI,H.; KINJO,Y.; BRANCHES,F.; MALM,O.; HARADA, M.; PFEIFFER, W.C.; KATO, H. Methylmercury pollution in Tapajos river basin, Amazon. **Environ. Sci.** v.3, p. 25-32, 1994.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v.77, p.373-382. 1981.

ALBUQUERQUE, C. de. **Uso da acetilcolinesterase em tilápias e acarás como bioindicador de exposição a pesticidas organofosforados em ecossistemas aquáticos.** (Monografia) de conclusão do curso de Ciências Biológicas, Universidade Veiga de Almeida, Rio de Janeiro, 2004.

ALMOSNY, N. R. P.; SANTOS, L. Laboratory support in wild animal medicine. In: FOWLER, M; CUBAS, Z (Eds). **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals.** Iowa State University Press, Iowa. p.500-505, 2001.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p.121-135, 1995.

ANDREATA, J. V.; MORAES, L. A. F. Relações tróficas entre as cinco espécies de peixes mais representativas nas margens da laguna de Jacarepaguá, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.11, n.4, p.789-800, 1994.

ANDREATA, José V.; MEURER, Bruno C.; BAPTISTA, Maurício G.S.; MANZANO, Felipe V.; TEIXEIRA, Dirceu E.; LONGO, Michele M.; FRERET, Natalie, V. Composição da assembléia de peixes da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.19, n.4, p. 1139-1146, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria 685**. 1998.

ARIZA, M.E.; HOLLIDAY, J.; WILLIAMS, M.V. Mutagenic effect of mercury (II) in eukaryotic cells. **In Vivo**, v.8, p.559-564, 1994.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological profile. US. Dept. of Health and Human Services, TP-93/05, Atlanta, Ga., 1994.

AULA I, BRAUNSCHWEILER H, MALIN I. The watershed flux of mercury examined with indicators in the Tucuruí reservoir in Pará, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 175, p. 97-107, 1995.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Rima; Intertox, 2003.

AZEVEDO, J. S.; FERNANDEZ, W. S.; FARIAS, L. A.; FAVARO, D. T. I.; BRAGA, E. S. Use of *Cathorops spixii* as bioindicator of pollution of trace metals in the Santos Bay, Brazil. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 577–586, 2009.

AZEVEDO, M. C. C.; ARAÚJO, F. G.; CRUZ-FILHO, A. G.; GOMES, I. D.; PESSANHA, A. L. M. Variação espacial e temporal de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) na Baía de Sepetiba, RJ. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n.3, p.443-454, 1999.

BAATRUP, E.; NIELSEN, M.G.; DANSCHER, G. Histochemical demonstration of two mercury pools in trout tissues: mercury in kidney and liver after mercuric chloride exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.12, p.267-282, 1986.

BAINY, A. C. D. **Estresse oxidativo induzido por xenobióticos em ratos (*Rattus rattus novergicus*) e peixes (*Oreochromis niloticus*)**. (Tese de Doutorado), Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 1995

BAPTISTA NETO, J. A.; GINGELE, F. X.; LEIPE, T.; BREHME, I. Spatial distribution of heavy metals in surficial sediments from Guanabara Bay: Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Geology**, v.49, p. 1051–1063, 2006.

BARROCAS, P.R.; WASSERMAN, J.C. O mercúrio na Baía da Guanabara: uma revisão histórica. **Geochim. Brasil.**, v.9, n.2, p. 115-127, 1995.

BARRON, M. G. Bioconcentration – Will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals?. **Environ. Sci. Technol.**, v.24, n. 11, p.1612-1618, 1990.

BERNTSSEN, M. H.G; HYLLAND, K.; JULSHAMN, K.; LUNDEBYE, A.-K.; WAAGBO, R. Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish feed. **Aquaculture Nutrition**, v.10, p.83-97, 2004.

BLOOM, N. Determination of picogram levels of methylmercury by aqueous phase ethylation followed by cryogenic gas chromatography with cold-vapour atomic fluorescence detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 208, p. 151-161, 1989.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth to Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p. 383-392, 2001.

BONE, Q.; MARSHALL, N. B.; BLAXTER, J. H. S. **Biology of Fishes**. Cheltenham: Stanley Thornes Publishers Ltd., 1999.

BRAGA, C. Z. **Utilização de imagem dos satélites Landsat-5 e NOAA-9 na**

identificação de parâmetros físico-químicos da água na baía de Guanabara. (Dissertação de Mestrado) Sensoriamento Remoto, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 1998.

BRITO, E. M. S. **Testes de comparação de eficiência de extrato de metilmercúrio em amostras ambientais.** (Dissertação de Mestrado.) Departamento de Geoquímica - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1998.

BRITO, E.F.; MOULTON, T.P.; SOUZA, M.L; BUNN, S.E. Stable isotope analysis indicates microalgae as the predominant food source of fauna in a coastal forest stream, Southeast Brazil. **Austral Ecology**, v. 31, p. 623-633, 2006.

BRUGGEMAN, W. A. Hydrophobic interactions in the aquatic environment. In: HUTZINGER, O. (Ed). **The handbook of environmental chemistry**, Germany: Springer-Verlag, v.2, p.205, 1982.

CAMPBELL, T.W. Hematology of Fish. In: THRALL, M. A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. p. 277-289, 2004.

CAMPOS, A. N. **Ensaio de adaptação e utilização de um 'índice de risco ecológico potencial' para controle da contaminação por metais pesados em ambiente costeiro tropical:** Baía de Guanabara, RJ – Brasil. (Dissertação de Mestrado) Geociências-Geoquímica ambiental, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2000.

CARDOSO, A. G. A; BOAVENTURA, G. R.; SILVA FILHO, E. V.; BROAD, J. Metal Distribution in Sediments from the Ribeira Bay, Rio de Janeiro-Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.6, p.767-774, 2001.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. **Methods Enzymol**, v.113, p.484-490, 1985.

CARRIER, G.; BOUCHARD, M.; BRUNET, R. C.; CAZA, M. A toxicokinetic model for predicting the tissue distribution and elimination of organic and

inorganic mercury following exposure to methyl mercury in animals and humans. II. Application and validation of the model in humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.171, p.50-60, 2001.

CARSON, Rachel. **Silent Spring**. Houghton Mifflin, 1962.

CARVALHO-FILHO, A. **Peixes**: Costa Brasileira. São Paulo: Melro, 1999. 320p.

CASTILHOS, Z. C. **Gestão em poluição ambiental**: análise da contribuição dos garimpos de ouro na contaminação por mercúrio da ictiofauna e das águas fluviais na região do rio Tapajós, estado do Pará, Brasil. (Tese de Doutorado) Geociências-Geoquímica ambiental, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1999.

CASTILHOS, Z.C.; ALMOSNY, N.; SOUTO, P.S.; DA SILVA, L.C.C.P.; LINDE, A.R.; BIDONE, E.D. Bioassessment of Ecological Risk of Amazonian Ichthyofauna to Mercury. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.72, n.4, p.671-679, 2004a.

CASTILHOS, Z.C.; BIDONE, E.D. Hg biomagnification in the ichthyofauna of the Tapajós River Region, Amazônia, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.64, p. 693-700, 2000.

CASTILHOS, Z.C.; PEREIRA, L.C.; ALMOSNY, N.; RODRIGUES-FILHO, S.; RODRIGUES, A.P.; VILLAS-BÔAS, R.; VEIGA, M.; BEINHOFF, C. Biochemical and hematological parameters in Amazonian fish from aquatic systems affected by gold mining. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MERCURY AS A GLOBAL POLLUTANT, 7. Ljubljana, Eslovênia, 2004. **Anais...** Ljubljana, Eslovênia, 2004b.

CASTRO, A. M.; CASTILHOS, Z.C.; LIMA, C.A. Avaliação de risco à saúde humana por exposição a HPAs encontrados em poeiras das ruas de Niterói. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13, Rio de Janeiro, 2005. **Anais...**, Centro de Tecnologia Mineral, 2005.

CASTRO, F. **Ração pesada**. Boletim da Agência de Notícias da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, 05 de maio de 2008. Disponível em:

<<[www.agencia.fapesp.br/boletim_print.php?data\[id_materia_boletim\]=8783](http://www.agencia.fapesp.br/boletim_print.php?data[id_materia_boletim]=8783)>>

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutat Res.**, v. 655, n. 1-2, p. 41-46, 2008.

CAVAS, T. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 352–358, 2008.

CEMBER, H.; GALLAGHER, P.; FAULKNER, A. Distribution of mercury among blood fractions and serum proteins. **American Industrial Hygiene Association Journal**, p.233-237, 1968.

CHAVES, P. T. C.; VENDEL, A. L. Aspectos da alimentação de *Genidens genidens* (Valenciennes) (Siluriformes, Ariidae) na Baía de Guaratuba, Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, n.3, p.669-675, 1996.

CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury and its compounds. In: WATRAS, C. J.; HUCKABEE, J. W. **Mercury pollution: Integration and Synthesis**. London: Lewis Publishers, 1994.

COELHO, J.P.; PEREIRA, M.E.; DUARTE, A.; PARDAL, M.A. Macroalgae response to a mercury contamination gradient in a temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 65, p. 492-500, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução 344, de 25 de março de 2004. Dispões sobre as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências, 2004.

CRUZ, C. B. M.; TEIXEIRA, A. J. A.; BARROS, R. S.; ARGENTO, M. S. F.; MAYR, L. M.; MENEZES, P. M. L. Carga Antrópica da Bacia Hidrográfica da Baía de Guanabara. In. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 9, Santos, São Paulo, 1998. **Anais...**, Santos, São Paulo, 1998.

CUNHA, J. B.; LIMA, J. S. AND FARIA, M. V. C. Brain acetylcholinesterase as an in vitro detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. **Water Research**, v.25, n.7, p.835-840, 1991.

DAS, K.; LEPOINT, G.; LOIZEAU, V.; DEBACKER, V.; DAUBY, P.; BOUQUEGNEAU, J.M. Tuna and dolphin associations in the North-east Atlantic: evidence of different ecological niches from stable isotope and heavy metal measurements. **Marine Pollution Bulletin**, v.40, n.2, p.102-109, 2000.

DOWNS, S.G; MacLEOD,C.L.; JARVIS, K.; BIRKETT, J.W.; LESTER, J.N. Comparison of mercury bioaccumulation in eel (*Anguilla anguilla*) and roach (*Rutilus rutilus*) from river systems in East Anglia, UK. I. Concentrations in fish tissue. **Environmental Technology**, v.20, p.1189-1200, 1999.

DREVNICK, P.E.; SANDHEINRICH, M.B. Effects of dietary methylmercury on reproductive endocrinology of fathead minnows. **Environmental Science & Technology**, v.37, n. 19, p. 4390-4396, 2003.

DREVNICK, P.E.; SANDHEINRICH, M.B.; ORIS, J.T. Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.49-54, 2006.

EATON, A. D.; GREENBERG, A. E.; CLESCERI, L. S. 10600: Fish. In: **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. Washington D. C.: APHA, 1998, p.1092-10107.

EBOH, L.; MEPBA, H. D.; EKPO, M. B. Heavy metal contaminants and processing effects on the composition, storage stability and fatty acid profiles of live common commercially available fish species in Oron Local Government, Nigeria. **Food Chem**, v. 97, p. 490–497, 2006.

EGLER, S. G.; CASTILHOS, Z. C.; YALLOUZ, A. V.; PEDROSO, L. R. M. **Instrução de trabalho para o Analisador de Mercúrio Portátil LUMEX, RA-915+ e acessórios RP-91 e RP-91 C, marca Zeeman. IT - Instrução de trabalho para o analisador de mercúrio total LUMEX.** Rio de Janeiro: CETEM, 2004.

ELMANN, G. L.; COURTNEY, K.; ANDRES, JR A.; FEATHERSTONE, R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol**, v.7, p.89-95, 1961.

ELUMALAI, M; ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. **Chemosphere**, v. 66, p. 1249–1255, 2007.

ESTEVES, F. de A. **Fundamentos de Limnologia.** Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FARIA, M. de M. **Caracterização mineralógica e geoquímica dos sedimentos porção NE da Baía de Guanabara e das áreas-fontes adjacentes.** (Dissertação de Mestrado.) Departamento de Geoquímica - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1997.

FARIAS, C. O.; HAMACHER, C.; WAGENER, A. L. R.; SCOFIELD, A. L. Origin and degradation of hydrocarbons in mangrove sediments (Rio de Janeiro, Brazil) contaminated by an oil spill. **Organic Geochemistry**, v. 39, n. 3, p. 289-307, 2008.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA E MEIO AMBIENTE. **Levantamento de metais pesados no Estado do Rio de Janeiro** (Relatório Preliminar). Sema/Feema, outubro, 1980.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA E MEIO AMBIENTE. **Levantamento de metais pesados na Baía de Guanabara** (Relatório Final). Sema/Feema, volume 1, 1982.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA E MEIO AMBIENTE. **Qualidade**

ambiental do ecossistema da bacia hidrográfica da Baía de Guanabara em 1990. Sema/Feema, 1991.

FERRAZ, E. S. de B.; OMETTO, J. P. H. B.; MARTINELLI, L. A.; MOREIRA, M. Z.; CAMARGO, P. B. de; VICTORIA, R. L.. **Desvendando Questões Ambientais com Isótopos Estáveis.** São Paulo: Oficina de Textos, 2009.

FIORI, C. S. **Integração de indicadores geoquímicos e biológicos na avaliação da contaminação de sedimentos por metais pesados em regiões costeiras do estado do Rio de Janeiro, Brasil.** (Tese de doutorado.) Departamento de Geoquímica. 2008.

FONSECA, M. B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; TIerno, M. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; LORO, V. L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 69, p. 416–420, 2008.

FOWLER, S.W.; HEYRAUD, M.; ROSA, J. Factors affecting methyl and inorganic mercury dynamics in mussels and shrimp. **Marine Biology**, v.46, p. 267-276, 1978.

FRANCIONI, E.; WAGENER, A. DE L.R.; SCOFIELD, A. DE L.; DEPLEDGE, M.H.; CAVALIER, B.; SETTE, C.B.; CARVALHOSA, L.; LOZINSKY, C.; MARIATH, R. Polycyclic aromatic hydrocarbon in inter-tidal mussel *Perna perna*: Space–time observations, source investigation and genotoxicity. **Science of the Total Environment**, v. 372, p. 515–531, 2007.

FRIEDMANN, A.S.; WATZIN, M.C.; BRINCK-JOHNSEN, T.; LEITER, J.C. Low levels of dietary methylmercury inhibit growth and gonadal development in juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*). **Aquatic Toxicology**, v.35, p.265-278, 1996.

GILL, T *et al.* Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.97C, n.2, p.287-

292, 1990.

GILL, T. S.; PANT, J. Mercury-induced blood anomalies in the freshwater teleost *Barbus conchonus* Ham. **Water, Air and Soil Pollut**, v.24, p.165-171, 1985.

GILMOUR, C. C.; HENRY, E. A. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. **Environ. Pollut.**, v. 71, n. 2/4, p. 131-170, 1991.

GONZALEZ, P. ; DOMINIQUE, Y.; MASSABUAU, J.C.; BOUDOU, A.; BOURDINEAUD, J.P. Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & technology**, v. 39, n. 11, p. 3972-3980, 2005.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n. 1, p.235-239, 2000.

GUIMARÃES, A.T.B.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**,v. 68, p. 57–62, 2007.

GUIMARÃES, J.R.D.; LACERDA, L.D.; TEIXEIRA, V.L. Concentração de metais pesados em algas bentônicas da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, com sugestão de espécies monitoras. **Revista Brasileira de Biologia**, v.42, n.3, p.553-557, 1982.

HÅKANSON, L. The quantitative impact of pH, bioproduction and Hg contamination on the Hg content of fish (pike). **Environmental Pollution**, v.1, p.285-304, 1980.

HAMMERSCHMITD, C. R.; SANDHEINRICH, M.B. Maternal diet during oogenesis is the major source of methylmercury in fish embryos. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 10, p.3580-3584, 2005.

HAMMERSCHMITD, C. R.; SANDHEINRICH, M.B.; WIENER, J. G.; RADA, R.

G. Effects of dietary MeHg on reproduction of fished minnows. **Environ. Sci. Technology**, v.36, p.877-883, 2002.

HEM, J. D. Chemical behavior of mercury in aqueous media. In: **Geological Survey Professional Paper 713**. Mercury in the environment. Washington: U.S. Government, 1970.

HUCKABEE, J. W.; ELWOOD, J. W.; HILDEBRAND, S. G. Accumulation of mercury in freshwater biota. In: NRIAGU, J. O. (Ed.). **The biochemistry of mercury in the environment**. Amsterdam: Elsevier North Holland, 1979, p. 277-302.

JÚNIOR, A. N. M.; CRAPEZ, M. A. C.; BARBOZA, C. D. N. Impact of the Icaraí Sewage Outfall in Guanabara Bay, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n. 4, p. 643-650, 2006.

KANNAN, K.; SMITH JR, R.G.; LEE, R.F.; WINDOM, H.L.; HEITMULLER, P.T.; MACAULEY, J.M; SUMMERS, J.K. Distribution of total mercury and methylmercury in water, sediment and fish from South Florida estuaries. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.34, p.109-118, 1998.

KEHRIG, H. A. **Estudo comparativo dos níveis de concentração de mercúrio total em corvinas (*Micropogonias furnieri*) de quatro estuários brasileiros**. (Dissertação de Mestrado)-PUC-RJ, 1992.

KEHRIG, H. A.; COSTA, M.; MOREIRA, I.; MALM, O. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 1018–1023, 2002.

KEHRIG, H. A.; SEIXAS, T. G.; PALERMO, E. A.; BAÊTA, A. P.; CASTELO-BRANCO, C. W.; MALM, O.; MOREIRA, I. The relationships between mercury and selenium in plankton and fish from a tropical food web. **Environ Sci Pollut Res**, v. 16, p. 10–24, 2009.

KEHRIG, H. A; MALM O.; MOREIRA, I. Mercury in a widely consumed fish *Micropogonias furnieri* (Demarest.1823) from four main Brazilian estuaries. **The Science of the Total Environment**, v.213, p.263-271, 1998.

KEHRIG, H. A; MOREIRA, I; MALM O; PFEIFFER, W. C. Especificação e acumulação de mercúrio pela biota da Baía de Guanabara – RJ. In: MORAES, R.; CRAPEZ, M.; PFEIFFER, W.; FARINA, M.; BAINY, A.; TEIXEIRA, V. **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**. Arte Ciência Villipress, 2001.

KJERFVE, B. **The study on recuperation of the Guanabara Bay ecosystem** – Draft Final Report. Janeiro de 1994. Japan International Cooperation Agency. Kokusai Kogyo Co. Ltd.

KLAASSEN, C. D. **Cassarett and Doull's toxicology – the basic science of poisons**. 5. ed. International edition, 1996.

LACERDA, L. D; PFEIFFER, W.C.; FISZMAN, M. Níveis naturais de metais pesados em sedimentos marinhos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis. **Ciência e Cultura**, v.34, n.7, p.921-924, 1982.

LACERDA, L. D; SOUZA, C.M.; PESTANA M.H. **Geoquímica de metais pesados em sedimentos não contaminados no estuário do Frade, Angra dos Reis**, 1984.

LACERDA, L.D.; MARINS, R.V.; PARAQUETTI, H.H.M.; MOUNIER, S.; BENAÏM, J.; FEVRIER, D. Mercury distribution and reactivity in waters of a sub-tropical coastal lagoon, Sepetiba Bay, SE Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.12, n.1, p.93-98, 2001.

LAKE, J. L.; RYBA, S. A.; SERBST, J. R.; BROWN, C. F.; GIBSON, L. A comparison of mercury in mink and fisher in Rhode Island. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MERCURY AS A GLOBAL POLLUTANT, 9, Guiyang-China, 2009. **Anais...**, Guiyang-China, 2009.

LANDIS, W. G.; YU, MING-HO. **Introduction to environmental toxicology -**

Impacts of chemical upon ecological systems. Lewis Publishers, 1995.

LASORSA, B.; ALLEN-GIL, S. The methylmercury to total mercury ratio in selected marine, freshwater and terrestrial organisms. **Water, Air and Soil Pollution**, v.80, p. 905-913, 1995.

LATIF, M.A.; BODALY, R.A.; JOHNSTON, T.A; FUDGE, R.J.P. Effects of environmental and maternally derived methylmercury on the embryonic and larval stages of walley (*Stizostedion vitreum*). **Environ. Pollut.**, v.111, p.139-148, 2001.

LAVADO, R.; UREÑA, R.; MARTIN-SKILTON, R.; TORREBLANCA, A.; DEL RAMO, J.; RALDÚA, D.; PORTE, C. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River Ramo. **Environ. Pollut.**, v. 139, p. 330-339, 2006.

LE MOS, C.T.; RÖDEL, P.M.; TERRA, N.R.; D'AVILA DE OLIVEIRA, N.C.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 66, p. 391–401, 2007.

LIMA, C. A.; CASTILHOS, Z. C. Abordagem dose-resposta para avaliação da contaminação ("DRAC") por mercúrio em peixes. Estudo de caso: mercúrio em corvinas (*Micropogonias furnieri*) da Baía de Guanabara -RJ. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL – CETEM, Rio de Janeiro, 2001.

LIMA, S. C. **Estudo sedimentológico, textural, mineralógico e geoquímico dos sedimentos superficiais e do material em suspensão na Baía da Ribeira – Angra dos Reis – RJ.** (Dissertação de Mestrado) Geociências-Geoquímica ambiental, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1985.

LINDE-ARIAS, A. R.; GALAN, S.; VALLES, P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. **Ecotox Environ Saf**, v.49, p.139-143, 2001.

LINDE-ARIAS, A. R.; INÁCIO, A. F.; ALBURQUERQUE, C. DE; FREIRE, M. M.; MOREIRA, J. C. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian river. **Science of the total environment**, v. 399, p. 186-192, 2008.

LOCKHART, W.L.; UTHE, J.F.; KENNEY, A.R.; MEHRLE, P. M. Methylmercury in northern pike (*Esox lucius*): distribution, elimination and biochemical characteristics of contaminated fish. **Journal Fisheries Research Board of Canada**, v. 29, n. 11, p. 1519-1523, 1972.

LOHNER, T. W.; REASH, R. J.; WILLET, V. E.; ROSE, L. A. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium-laden coal ash effluents. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 50, p. 203–216, 2001.

LOPEZ-CARILLO, L. & LOPEZ-CERVANTES, M. Effect of exposure to organophosphate pesticides on serum cholinesterase levels. **Arch. Environ. Health**, v.48, n.5, p.359-363, 1993.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: USP, 1999.

MACHADO, W.; CARVALHO, M.F.; SANTELLI, R.E.; MADDOCK, J.E.L. Reactive sulfides relationship with metals in sediments from a eutrophicated estuary in Southeast Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.49, p. 89-92, 2004.

MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARRELLA, W. **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: EDUC – PUC-SP, 2001, 285p.

MARCOVECCHIO, J. E.; ANDRADE, S.; FERRER, L. D.; ASTEASUAIN, R. O.; MARCO, S. G.; GAVIO, M. A.; SCARLATO, N.; FREIJE, R. H.; PUCCI, A. E. Mercury distribution in estuarine environments from Argentina: the detoxification and recovery of salt marshes after 15 years. **Wetlands Ecology and Management**, v. 9, p. 317–322, 2001.

MARINS, R.V.; LACERDA, L.D.; PARAQUETTI, H.H.M.; PAIVA, E.C.

Geochemistry of mercury in sediments of a sub-tropical coastal lagoon, Sepetiba Bay, Southeastern Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.61, p.57-64, 1998.

MASON, R. P.; REINFELDER, J. R.; MOREL, F. M. M. Bioaccumulation of Mercury and Methylmercury. **Wat. Air Soil Pollut.**, v. 80, p. 915-921, 1995.

MAYER, F. L.; VERSTEEG, D. J.; MCKEE, M. J.; FOLMAR, L. C.; GRANEY, R. L.; MCCUME, D. C.; RATTNER, B. A. Metabolic products as biomarkers. In: HUGGETT, R. J., KIMERLY, R. A., MEHRLE, P. M., JR. BERGMAN, H. L. (Eds.), **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Chelsea: Lewis Publishers, 1992.

McCALLISTER, S.L.; BAUER, J.E.; DUCKLOW, H.W.; CANUEL, E.A. Sources of estuarine dissolved and particulate organic matter: a multi-tracer approach. **Organic Geochemistry**, v.37, p.454-468, 2006.

MCKIM, J.M.; OLSON, G.F.; HOLCOMBE, G.W.; HUNT, E.P. Long-term effects of methylmercury chloride on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*): Toxicity, accumulation, distribution, and elimination. **J. Fish. Res. Board Can**, v.33, p.2726-2739, 1976.

MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.68, p.426-435, 2007.

MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio, revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v.23, n.4, p.487-495, 2000.

MONSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M. G.; PINHO, G. L. L.; CHAVES, I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and**

Physiology, v. 146, p. 221–234, 2007.

MORETTO, M. B.; LERMEN, C. L.; MORSCH, V. M.; BOHRER, D.; INEU, R. F.; DA SILVA, A. C.; BALZ, D.; SCHETINGER, M. R. C. Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from cerebral cortex of rats. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 17, n. 4, p. 255-260, 2004.

MÓSCA, N. P. **Concentração de mercúrio nas águas e sedimentos da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro – RJ – Brasil.** (Dissertação de Mestrado) Geociências-Geoquímica ambiental, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1980.

MUNIZ, K. P. M. S.; RODRIGUES, A. P. C.; RAMOS, A. DOS S.; CASTRO, A. M.; LIMA, C. A.; PEDROSO, L. R. M.; CASTILHOS, Z. C.; BIDONE, E. D.; VIANA, T. A. P.; DE ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F. ; NOVO, L. A.; FREIRE, M.; LINDE, A. R. Aplicação da acetilcolinesterase como biomarcador de exposição mercurial em áreas contaminadas do Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 7. Caxambu (MG), 2005. **Anais...**, Caxambu (MG), 2005.

MUNTHE, J.; BODALY, R. A.; BRANFIREUN, B. A.; DRISCOLL, C. T.; GILMOUR, C. C.; HARRIS, R.; HORVAT, M.; LUCOTTE, M.; MALM, O. Recovery of mercury-contaminated fisheries. **Ambio**, v. 36, n. 1, p. 33-44, 2007.

NELSON, G. J. **Fishes of the world.** 4. ed. New York: Wiley, 2006.

NEPOMUCENO, J.C. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. **Environmental and molecular Mutagenesis**, v.30, p. 293-297, 1997.

ODUM, E. P. **Ecologia.** Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 434p.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P. H.;

RANDI, M. A. F.; RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**, v. 101, p. 74–80, 2006.

OLIVEIRA, M. M., SILVA FILHO, M. V., BASTOS, V. L. F.C., FERNANDES, F. C., BASTOS, J. C. Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. **Marine Environmental Research**, v. 63, p. 303–312, 2007.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; INÁCIO, A. F.; MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; FERREIRA, M. F.; CUNHA, J. C.; MOREIRA, J. C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: An improvement to the occupational monitoring in developing countries. **Hum. Exp. Toxicol.**, v.19, n.3, p.173-177, 2000.

OLSON, K. R.; BERGMAN, H. L.; FROMM, P. O. Uptake of methyl mercury chloride and mercuric chloride by trout: A study of uptake pathways into the whole animal and uptake by erythrocytes in vitro. **J. Fish Research Board Canada**, v.30, p.1293-1299, 1973.

PARAQUETTI, H. H. M. **Distribuição e reatividade de mercúrio em águas do complexo costeiro do estado do Rio de Janeiro: Baía de Sepetiba**. (Dissertação de Mestrado). Geociências-Geoquímica ambiental, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2001.

PARAQUETTI, H.H.M.; AYRES, G.A.; ALMEIDA, M.D.; MOLISANI, M.M.; LACERDA, L.D. Mercury distribution, speciation and flux in the Sepetiba Bay tributaries, SE Brazil. **Water Research**, v.38, p.1439-1448, 2004.

PEREIRA, E.; BAPTISTA-NETO, J. A.; SMITH, B. J.; McALLISTER, J. J. The contribution of heavy metal pollution derived from highway runoff to Guanabara Bay sediments – Rio de Janeiro / Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 739-750, 2007.

PEREIRA, E.; BAPTISTA-NETO, J. A.; SMITH, B. J.; McALLISTER, J. J. The contribution of heavy metal pollution derived from highway runoff to Guanabara Bay sediments – Rio de Janeiro / Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.79, n.4, p. 739-750, 2007.

PEREIRA, R. C.; GOMES, A. S. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002, 382p.

PHILLIPS, G.R.; LENHART, T.E.; GREGORY, R.W. Relation between trophic position and mercury accumulation among fishes from the Tongue River Reservoir, Montana. **Environmental Research**, v.22, p.73-80. 1980.

PICKHARDT, P. C.; FOLT, C. L.; CHEN, C. Y.; KLAUE, B.; BLUM, J. D. Algal blooms reduce the uptake of toxic methylmercury in freshwater food webs. **Proceeding of National Academy of Science**, v. 99, p. 4419–4423, 2002.

PINTO, A. P. F. **Geoquímica do mercúrio em perfis sedimentares de manguezais da Baía de Guanabara – Rio de Janeiro – Brasil**. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Geoquímica. 1995.

PORTO, J. I. R., ARAUJO, C. S. O., FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v. 97, p. 287–292, 2005.

RAMOS, A. S.; CASTILHOS, Z. C.; RODRIGUES, A. P. C. Avaliação de risco ecológico e de parâmetros citogenéticos em diversas espécies de peixes da Baía da Ribeira, Angra dos Reis, RJ – Brasil. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13, Rio de Janeiro, 2005. **Anais...**, Centro de Tecnologia Mineral, Rio de Janeiro, 2005.

RAMOS, A. S.; CASTILHOS, Z. C.; RODRIGUES, A. P. C. Determinação de teores de mercúrio em corvinas jovens da Baía da Ribeira-Rj. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12, Rio de Janeiro, 2004. **Anais...**, Centro de Tecnologia Mineral, Rio de Janeiro, 2004.

REINFELDER, J.R.; FISHER, N.S.; LUOMA, S.N.; NICHOLS, J.W.; WANG,

W.X. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. **The Science of the Total Environment**, v.219, p.117-135, 1998.

RIBEYRE, F; BOUDOU, A. Bioaccumulation et repartition tissulaire du mercure – HgCl₂ et CH₃HgCl – CHES *Salmo gairdneri* apres contamination par voie directe. **Water, Air and Soil Pollution**, v.23, p.169-186, 1984.

RODGERS, D. W. You are what you eat and a little bit more: bioenergetics-based models of methylmercury accumulation in fish revisited. In: WATRAS, C. J. & HUCKABEE, J. W. **Mercury pollution: Integration and Synthesis**. London: Lewis Publishers, 1994.

RODRIGUES, A. P. C. **Avaliação de risco ecológico associado à contaminação mercurial em dois estuários do estado do Rio de Janeiro: Baía de Guanabara e Baía da Ribeira**. 97f. (Dissertação de mestrado). Departamento de Geoquímica - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

RODRIGUES, A. P. C.; CASTILHOS, Z. C. Avaliação de risco ecológico em ecossistemas aquáticos contaminados por mercúrio. Estudo de caso: Ilha das Enxadas, Baía de Guanabara, RJ. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11, Rio de Janeiro, 2003. **Anais...**, Centro de Tecnologia Mineral, Rio de Janeiro, 2003.

RODRIGUES, A. P. C.; RAMOS, A. DOS S.; MUNIZ, K. P. M. S.; CASTRO, A. M.; LIMA, C. A., PEDROSO, L. R. M.; CASTILHOS, Z. C.; BIDONE, E. D.; VIANA, T. A. P.; DE ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; NOVO, L. A.; LINDE, A. R. Aplicação do teste de micronúcleo para avaliação de áreas contaminadas do estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 7, Caxambu (MG), 2005. **Anais...**, Caxambu (MG), 2005.

RON V. D. O.; JONNY B.; NICO P.E.; VERMEULEN. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, n.2003, p.57-149, 2002.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A. N.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei in Eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 49, p. 139-143, 2001.

SANDHEINRICH, M.B.; MILLER, K.M. Effects of dietary methylmercury on reproductive behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.25, n.11, p.3053-3057, 2006.

SANTOS, Eduardo. **Zoologia brasileira – Nossos peixes marinhos**. Belo Horizonte: Villa Rica, 1982.

SAWYER, C. N.; McCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. **Chemistry for environmental engineering**. Nova York: McGraw-Hill Inc., 1994.

SCHÜTZ, A.; SKARPING, G.; SKERFVING, S. Mercury. Trace elements analysis in biological specimens. In: HERBER, R. F. M.; STOEPLER. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**. Elsevier, 1994, v.15, p.403-446.

SHRESTHA, K.P.; NOGUERA, R.; CHOPITE, J.; SOSA, P. Mercury content of some marine fish from the southern caribbean sea. **The Science of the total Environment**, v.73, p.181-187, 1988.

SILVA, L. C. C. P. da. **Avaliação da contaminação mercurial sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos plasmáticos de tucunarés (*Cichla spp.*) oriundos da região do Rio Tapajós, Pará, Brasil**. (Dissertação Mestrado) Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2004.

SOUTO, P. S. dos S. **Risco ecológico associado a contaminação mercurial em ecossistemas aquáticos da Amazônia: Região do rio Tapajós, estado do Pará, Brasil. Caracterização através de biomarcadores no gênero *Cichla* (tucunarés)**. (Tese de Doutorado). Geociências-Geoquímica ambiental, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

SWEET, L.; ZELIKOFF, J. Toxicology and immunotoxicology of mercury: a

comparative review in fish and humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.4, p.161-205, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 2004.

TUNNICLIFF, G.; WOOD, J.D. The inhibition of mouse brain neurotransmitter enzymes by mercury compounds and a comparison with the effects of hyperbaric oxygen. **Comp. gen. Pharmac.**, v.4, p.101-105, 1973.

ULLRICH, S.M.; TANTON, T.W.; ABDRAHITOVA, S.A. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.31, n.3, p.241-293, 2001.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidance for assessment contaminant data for use in fish advisories**. Washington DC, 2000, v.2.

VAZZOLER, A. E. A. de M. **Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes – Reprodução e Crescimento**. Programa Nacional de Zoologia, Brasília, CNPq, 1981.

VERTA, M.; MATILAINEN, T.; PORVARI, P.; NIEMI, M.; UUSI-RAUVA, A.; BLOOM, N. S. Methylmercury sources in Boreal Lake Ecosystems. In: WATRAS CJ & HUCKABEE JW. (Eds) **Mercury pollution: Integration and synthesis**. Boca Raton, Lewis Publishers, p. 137-152, 1994.

WASSERMAN, J. C.; FREITAS-PINTO, A. A. P.; AMOUROUX, D. Mercury concentrations in sediment profiles of a degraded tropical coastal environment. **Environmental Technology**, v.21, p.297-305, 2000.

WATRAS, C; J.; BLOOM, N.S. Mercury and methylmercury in individual zooplankton: implications for bioaccumulation. **Limnol. Oceanogr**, v.37, n.6, p.1313-1318, 1992.

WAYLAND, M. Concentrations of cadmium, mercury and selenium in blood,

liver and kidney of common eider ducks from the Canadian Arctic. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.71, p.255-267, 2001.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-333. 1981.

WHO Environmental Health Criteria (EHC 86). **Mercury - Environmental aspects**. Geneva, World Health Organization, 115p, 1989.

WHO. Environmental Health Criteria (EHC 101). **Methylmercury**. Geneva, 143p., 1990.

WIENER, J. G.; SPRY, D. J. Toxicological significance of mercury in freshwater fish. In: BEYER, W. N.; HEINZ, G. H.; REDMON-NORWOOD, A. W. **Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations**. Florida: Lewis Publishers; Boca Raton, 1996, p.297-339.

WIENER, J. G.; KRABBENHOFT, D. P.; HEINZ, G. H.; SCHEUHAMMER, A. M. Ecotoxicology of mercury. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON JR, G. A.; CAIRNS Jr, J. **Handbook of ecotoxicology**. 2^a ed. Florida: Boca Raton; Lewis Publishers, 2003, p.409-463.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; TESTA, C. P.; TRIBESS, T. B.; GEREMIAS, R.; PEDROSA, R. C.; HOSTIM-SILVA, M. Estresse oxidativo em bagres *Genidens genidens* (Ariidae) do litoral de Santa Catarina. In: MORAES, R.; CRAPEZ, M.; PFEIFFER, W.; FARINA, M.; BAINY, A.; TEIXEIRA, V. **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**. Arte Ciência Villipress, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)