

**AVALIAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE COMO BIOMARCADOR EM
EXPERIMENTOS DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO* COM MeHg E HgCl₂ EM
Hoplias malabaricus (BLOCK, 1794).**

JULIANA DOS SANTOS COLOMBI

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Veiga de Carvalho

Co-orientadora: Dr. Taíse Bomfim de Jesus

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ
JULHO - 2009

**AVALIAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE COMO BIOMARCADOR EM
EXPERIMENTOS DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO* COM MeHg E HgCl₂ EM
Hoplias malabaricus (BLOCK, 1794).**

JULIANA DOS SANTOS COLOMBI

Monografia apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para a obtenção do título de Bacharel
em Biociências e Biotecnologia, área de
concentração Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Veiga de Carvalho
Co-orientadora: Dra. Taíse Bomfim de Jesus

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UEN

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ
JULHO – 2009

AGRADECIMENTOS

À Deus

A minha co-orientadora Taíse, pela dedicação, orientação, paciência, amizade, e principalmente pela confiança. Esse trabalho também é fruto da sua dedicação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Veiga de Carvalho, que acreditou no meu potencial na realização desse projeto.

Aos meus pais (Tania e Jesus), e meu irmão (Pedro), que mesmo estando tão longe, me apoiaram, acreditaram no meu potencial e sempre mostraram que na vida tudo é possível.

Ao meu namorado (Leonardo), que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, me consolando, me ajudando. Obrigado pela sua compreensão e principalmente pela sua paciência.

As minhas companheiras de república (Clara e Viviane), que vivenciaram cada momento comigo, desde o início da faculdade e até o término desse trabalho.

As minhas grandes amigas (Bia e Su), minhas companheiras de festa, de fofoca e de divertimento. Pelo apoio, carinho e atenção. A amizade de vocês é muito importante para mim.

Ao Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, do Departamento de Biologia Celular- UFPR, pela atenção e disponibilidade.

Ao Centro de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

A galera do laboratório e técnicos do Laboratório de Ciências Ambientais, que em algum momento me ajudaram para que fosse possível a realização desse projeto.

A minha família, que sempre torceu por mim para a realização de cada etapa percorrida.

A Prof^a. Cristal e Prof^a. Marílvia, que aceitaram participar da minha banca e com isso me proporcionaram um dos momentos mais emocionantes.

INDICE

	Página
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Características químicas do Mercúrio.....	9
1.2 Características ambientais do Mercúrio.....	10
1.3 Peixes como bioindicadores para o monitoramento ambiental.....	13
1.4 Biomarcadores.....	16
1.4.1 Acetilcolinesterase (Ache).....	17
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1.Coleta das espécimes.....	21
3.2. Design Experimental.....	21
3.3. Atividade colinesterásica no músculo.....	22
3.4. Análise Química.....	23
3.5. Análises Estatísticas.....	25
4. RESULTADOS	
4.1 Variáveis biológicas.....	25
4.2 Análise química.....	26
4.3 Atividade colinesterásica.....	26
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Intervenção antrópica (WISCONSIN MERCURY SOUCERBOO, 1977 apud AZEVEDO, 2003.).....	12
FIGURA 2-Ciclo natural do mercúrio(SACHINAT,1986 apud AZEVEDO, 2003)...	13
FIGURA 3- Exemplar de <i>Hoplias malabaricus</i>	15
FIGURA 4- Clivagem das moléculas de acetilcolina (STRYER,2002).....	18
FIGURA 5- Relação de machos e fêmeas de cada tratamento utilizado.....	26
FIGURA 6- Concentração média de Hg total em músculo de traíra exposta por 96h via injeção intraperitoneal (p=0,005).....	27
FIGURA 7- Atividade colinesterásica (n mol.min ⁻¹ .mg ⁻¹) no músculo axial de <i>Hoplias malabaricus</i> após exposição, via injeção intraperitoneal, ao MeHg e HgCl ₂	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Número amostral de peixes utilizados no experimento e os diferentes tratamentos.....21

TABELA 2-Valores da média do peso e comprimento dos diferentes tratamentos.....25

TABELA 3- Média e desvio padrão das concentrações de mercúrio total nos músculos de traíras tratadas com MeHg, HgCl₂ e indivíduos controle.....27

RESUMO

A contaminação por mercúrio desperta grande preocupação ambiental, uma vez que esse metal é considerado um poluente de alto risco por sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação por entre os níveis da cadeia alimentar aquática. Sendo assim, os organismos predadores são os mais expostos aos efeitos tóxicos desse metal. No atual trabalho, a espécie *Hoplias malabaricus* (traíra), foi submetida à injeção intraperitoneal contendo a mesma concentração de mercúrio orgânico (MeHg) e mercúrio inorgânico (HgCl_2), que foi de $0,75\mu\text{g}/0,1\text{mL}$. Após o período de 96 horas, os animais foram anestesiados. Amostras de tecido muscular foram retiradas para a determinação da concentração de Hg e para a análise da atividade da acetilcolinesterase. O grupo exposto ao MeHg apresentou uma maior concentração total em relação ao grupo HgCl_2 e o grupo controle apresentando diferença significativa ($p < 0,005$). As variáveis biológicas, peso, comprimento e sexo não apresentaram diferenças significativas em relação à contaminação por mercúrio, tanto pela forma orgânica, como pela forma inorgânica. Nas análises bioquímicas foi observado, inibição da atividade colinesterásica no músculo dos peixes expostos ao MeHg. Através do presente trabalho, verificou-se que a acetilcolinesterase foi eficaz como biomarcador em peixes expostos, via injeção intraperitoneal, pela forma orgânica, apresentando sua atividade enzimática inibida quando exposta ao MeHg.

Palavras-chave: mercúrio, contaminação intraperitoneal, músculo, peixe, biomarcador, acetilcolinesterase

ABSTRACT

The contamination with mercury raises major environmental concern, since the metal is considered a pollutant at high risk for its ability to bioaccumulate and biomagnificate by between levels of the aquatic food chain, so the body predators are most exposed to the toxic effects of the metal. In the current study the species *Hoplias malabaricus* (traíra) were subjected to intraperitoneal injection containing the same concentration of organic mercury (MeHg) and inorganic mercury (HgCl_2) $0.75 \mu\text{g}/0,1\text{mL}$. After the contamination the fish were placed in individual aquariums remaining until the finish in the stipulated time of exposure in 96 hours. After were anesthetized and samples of muscle tissue were removed for chemical analysis and activity of acetylcholinesterase. The group exposed to MeHg, showed a higher total concentration in the group HgCl_2 and the control group, showing significant difference ($p < 0005$). The biological variables, weight, length and sex showed no significant differences in relation to contamination by mercury, both by organic form, as the inorganic form. With the biochemical analysis, we observed an inhibition of activity cholinesterase in the muscle of fish exposed to MeHg. Through this work, it was found that acetylcholinesterase was as effective biomarker in fish exposed via intraperitoneal injection, the organic and inorganic form, presenting its enzymatic activity inhibited when exposed to MeHg.

Key words: mercury, intraperitoneal contamination, muscle, fish, biomarker, acetylcholinesterase

APRESENTAÇÃO

Este trabalho fez parte de um projeto maior, que teve como objetivo testar experimentos *in vitro* em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) via injeção intraperitoneal. O tempo de exposição e as concentrações utilizadas são referentes ao trabalho de Cristiane dos Santos Vergílio com o título de monografia, “Efeito da contaminação aguda *in vitro* por Cloreto de Mercúrio em *Gymnotus carapo* (TUVIRA- LINNAEUS) e caracterização histológica”. Ao trabalho de Taíse Bomfim de Jesus, com o título de sua tese de Doutorado “Utilização de biomarcadores para avaliação de alterações químicas, bioquímicas, hematológicas e histológicas em traíra (*Hoplias malabaricus*) BLOCK, 1794, após exposição aguda ao Metilmercurio e ao Cloreto de Mercúrio”. E ao trabalho de Priscila Gontijo Aguiar de Almeida com o título de sua monografia Avaliação da concentração de Cloreto de Mercúrio no tecido muscular de traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794), após intoxicação aguda.

1-INTRODUÇÃO

1.1-Características químicas do mercúrio

O mercúrio (Hg), considerado um metal pesado, é o único encontrado na forma líquida em condições normais de temperatura e pressão, formando vapores incolores e inodoros, que normalmente são encontrados em dois estados de oxidação. Além disso, o mercúrio ocorre no meio ambiente associado a outros elementos químicos, formando compostos inorgânicos ou sais (MOREL *et al.*, 1998). Dentre as formas químicas encontradas, destaca-se o mercúrio elementar (Hg^0), que é volátil e solubilidade relativamente baixa em água, sendo passível de sofrer oxidação originando o íon mercurioso (Hg^{+1}) e o íon mercúrico (Hg^{+2}). Tanto o íon mercurioso como o mercúrico, formam diversos compostos químicos orgânicos e inorgânicos. As formas inorgânicas podem se ligar a outros radicais, como os halogênios (Br^- e Cl^-) e grupos metil (CH_3), proporcionando um aumento

de sua solubilidade. As propriedades físico-químicas dos compostos mercuriais inorgânicos estão intimamente relacionadas ao ânion ao qual se liga. Assim, o Cloreto de mercúrio – (HgCl_2) é bastante solúvel em solventes orgânicos e possui grande lipossolubilidade quando comparado com a forma inorgânica divalente (Hg^{+2}) o que facilita a sua permeabilidade pelas membranas biológicas.

O mercúrio em sua forma orgânica (Metilmercúrio - MeHg) é um composto químico bastante solúvel, sendo sua forma mais tóxica. Possui grande estabilidade química, tornando aliado à sua alta afinidade por lipídios (membranas biológicas), o que conduz a um trânsito preferencial e estável pela biota. Esta espécie de mercúrio possui uma ligação covalente com um átomo de carbono, sendo a forma de mercúrio que apresenta maior risco aos organismos devido a sua volatilidade e facilidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Sendo um poluente potencialmente perigoso para os sistemas biológicos devido a sua capacidade de realizar fortes ligações covalentes com grupamentos sulfidríla (SH^-) de proteínas. Tal ocorrência pode levar a alterações estruturais, a inibição de enzimas, como a acetilcolinesterase (AChE), a butirilcolinesterase (BChE) e metalotioneínas (MTs) (LACERDA *et al.*, 1997) e provocar efeitos biológicos adversos (hiperatividade, asfixia e até a morte), quando presentes em concentrações elevadas (DALLINGER & RAIMBOW, 2003).

1.2- Características ambientais do mercúrio

O mercúrio raramente é encontrado como elemento livre na natureza, mas encontra-se amplamente distribuído, porém em baixas concentrações, por toda a crosta terrestre (hidrosfera, litosfera, atmosfera e biosfera). (GOCHFELD, 2003; ANDERSON *et al.*, 2004).

As emissões naturais mais significativas de mercúrio são as de gaseificações da Crosta terrestre, evaporação de corpos aquáticos e as emissões de vulcões (WHO, 1991).

O aumento acentuado em seus níveis no ambiente decorre principalmente de ações antrópicas, notadamente aquelas relacionadas às atividades industriais

(eletrodeposição, mineração, metalurgia, tintas, corantes, etc.) e agrícolas (CAVALCANTE *et al.*, 1990).

Os depósitos de mercúrio podem ocorrer em qualquer tipo de rocha (ígneas, sedimentares ou metamórficas). Também podem ser encontrados na atmosfera vapores de mercúrio metálico ou compostos mercuriais orgânicos, sendo as principais fontes os meios terrestres, podendo ser depositadas a uma distância relativamente grande do local de origem. Isto significa que águas localizadas em áreas remotas e sem despejo direto desse metal podem ser também potencialmente contaminadas.

Os produtos organomercuriais podem atingir a atmosfera através das atividades metabólicas dos microorganismos, das plantas e dos animais. O ciclo se completa através da introdução do mercúrio no ambiente terrestre e aquático devido à deposição natural ou à precipitação atmosférica (BEZERRA, 1990).

O tempo de exposição do metilmercúrio nos peixes é relativamente alto, pois é metabolizado muito lentamente. A toxicidade do mercúrio aumenta com a temperatura, diminui com a dureza da água e é menos acentuada em sistemas estáticos, como lagos, do que em rios, com fluxo constante de água (BOENING, 2000).

A contaminação por mercúrio desperta grande preocupação ambiental, uma vez que esse metal é considerado um poluente de alto risco por sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação (aumento das concentrações ao longo dos níveis tróficos) por entre os níveis da cadeia alimentar aquática (LINDQVIST *et al.*, 1991), e também pelo seu longo tempo de residência no solo e no sedimento. Assim, o mercúrio apresenta elevada toxicidade para os homens e outros animais.

Há dois tipos de ciclos de transporte e distribuição do mercúrio no ambiente: um local (Figura 1) e um outro global (Figura 2). O ciclo de alcance global compreende a evaporação do mercúrio pela desgaseificação da crosta terrestre (incluindo áreas de terra e de água como rios e oceanos), a circulação atmosférica de seus vapores e sua precipitação com as chuvas, retomando as terras e às águas. Esse ciclo normalmente é envolvido, na maior parte, com as formas inorgânicas. Essas formas não se acumulam em cadeias alimentares,

exceto em fungos. A mudança da forma inorgânica para a metilada é o primeiro passo crucial no processo de bioacumulação aquática (ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 101, 1990).

O ciclo local é favorecido pelas fontes antropogênicas de emissão do mercúrio e depende da metilação do mercúrio inorgânico (OMS, 1978).

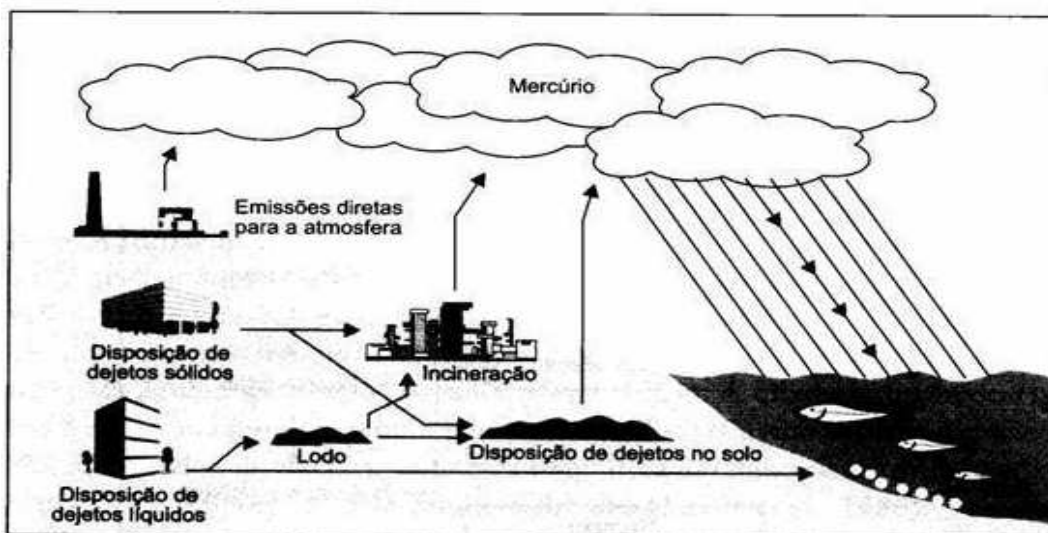


Figura 1. Intervenção antrópica. Mercúrio pode alcançar a atmosfera através de dejetos líquidos, sólidos ou por emissões diretas e através da precipitação da chuva volta ao ambiente aquático pela chuva. Fonte: WISCONSIN MERCURY SOURCEBOOK, 1977 apud AZEVEDO, 2003.

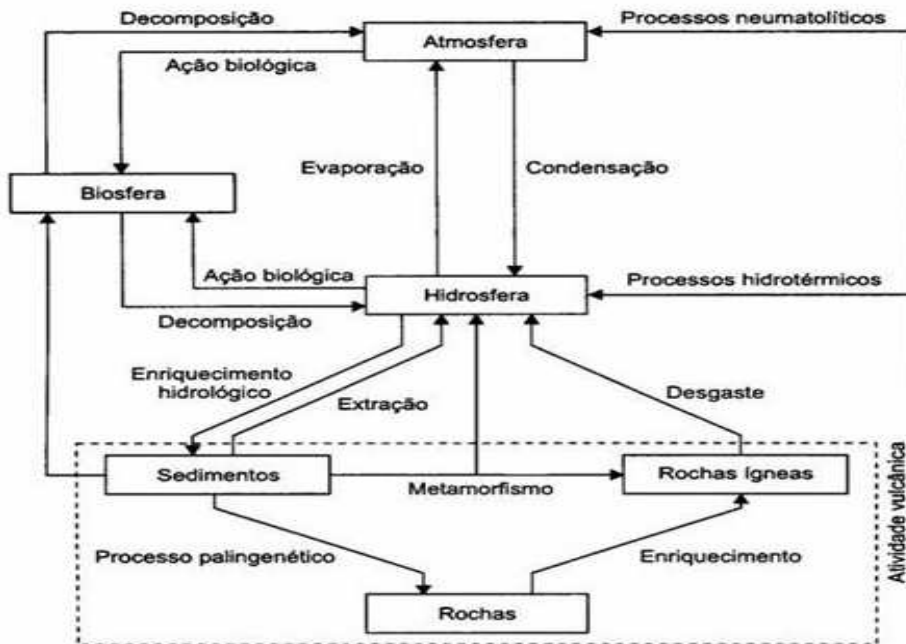


Figura 2. Ciclo natural do mercúrio. O Hg é liberado pela atividade vulcânica, alcançando a hidrosfera e biosfera, que através da evaporação e decomposição alcança a atmosfera. Fonte: SACHINATH ,1986 apud AZEVEDO, 2003.

O fenômeno da bioacumulação (capacidade do mercúrio de acumular no indivíduo) permite que essas concentrações sejam transferidas de um nível trófico a outro, sofrendo biomagnificação, podendo chegar nos peixes, por exemplo, a níveis, acima dos limites permissíveis para consumo humano. Pode-se dizer, então, que os organismos aquáticos são ótimos indicadores da presença de mercúrio, e que as concentrações desse metal podem aumentar à medida que o nível na cadeia trófica aumenta (herbívoro, iliófago, onívoro e carnívoro) (EISINK, 1990).

1.3- Peixes como Bioindicadores no Monitoramento Ambiental

Os efeitos que os metais podem causar aos organismos podem ser observados através do uso de bioindicadores, os quais são importantes no diagnóstico dos efeitos que estes elementos químicos podem causar aos sistemas biológicos (MELA, 2004).

Bioindicadores são organismos que reagem a alterações ambientais com a modificação de suas funções vitais normais e/ou da sua composição química, refletindo o atual quadro ambiental. Os peixes são intensamente utilizados como bioindicadores em avaliações de contaminação ambiental, pois pertencem a um nível trófico elevado. A absorção do mercúrio presente na água por organismos aquáticos é influenciada pela concentração desse elemento, pela taxa metabólica e pela eficiência de absorção (disponibilidade), determinada pelas características do ambiente aquático. Este último fator é o menos entendido e talvez seja a condição mais importante que governa a absorção do mercúrio pelos peixes em condições naturais (ALBUQUERQUE, 2007).

O metilmercúrio é facilmente absorvido por peixes e outros animais aquáticos, o que provoca a deposição dessa substância química nos tecidos desses animais, a qual se acumula ao longo do tempo, atingindo na cadeia biológica concentrações bem maiores do que as originalmente encontradas no ambiente (AZEVEDO *et al.*, 2003).

Tanto o mercúrio orgânico quanto o inorgânico são absorvidos diretamente da água como dos alimentos ou da ingestão dos sedimentos (DRISCOLL *et al.*, 1994; MALM *et al.*, 1995; 1998; SOUZA LIMA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; GOCHFELD, 2003), sendo que a ingestão de alimentos contaminados é uma das rotas mais importantes de acúmulo de mercúrio em peixes (GONDSTEIN *et al.*, 1996; NIENCHESKI *et al.*, 2001; KEHRIG *et al.*, 2002; GOCHFELD, 2003).

A concentração de mercúrio em tecidos pode aumentar com a idade, peso, produção microbiana, concentração e biodisponibilidade do mercúrio no ecossistema (ZHOU & WONG, 2000; ASCHNER, 2002).

A espécie alvo dessa pesquisa é a *Hoplias malabaricus* (Traíra) (Figura 3), família Erythrinidae. Apresenta como característica, um comprimento variável, podendo chegar a 50 cm de comprimento e peso de até 1,5 Kg (PLANQUETTE *et al.*; 1996). É um peixe carnívoro, predador, com dentes fortes. Sua cabeça é achatada, com a boca larga. As nadadeiras são reforçadas por raios flexíveis sendo a caudal arredondada. Tem constantemente uma grande quantidade de secreção de muco por todo o corpo, muco este que transuda através dos

numerosos poros que estão localizados por baixo das escamas, notando-se que os da linha lateral expelem maior quantidade dele.

Possui uma ampla distribuição geográfica para peixes de água doce, encontrada em quase todas as bacias desde a América Central até o rio Colorado (Argentina), apresentando diferentes áreas de endemismo. A traíra habita ambientes lênticos e apresenta comportamento territorialista, com hábitos preferencialmente noturnos. Permanece junto à vegetação durante o dia, saindo para caçar durante a noite, período no qual, se alimenta através de predação e emboscada.

Um dado interessante relacionado ao hábito predador da traíra se faz notar no movimento de outros peixes ao longo dos rios, pois esses não vão se movimentar apenas devido às correntes e à temperatura, mas sim à presença ou ausência do predador naquelas águas (GILLIAN, 2001).

A traíra ocupa níveis tróficos superiores na cadeia alimentar e vários trabalhos com essa espécie revelam uma intensa bioacumulação de metais pesados, e também mostram que este é um excelente bioindicador de poluição ambiental nesses ecossistemas, sendo uma espécie com resistência física privilegiada, podendo sobreviver inclusive em ambiente pouco oxigenado (MELA, 2004).



Figura 3. Exemplar de *Hoplias Malabaricus*

1.4- Biomarcadores

Os biomarcadores são indicadores biológicos capazes de indicar eventos que precedem os efeitos irreversíveis de contaminantes ao ambiente e/ou aos organismos, permitindo, por meio de análises relativamente simples, fornecerem uma indicação geral prévia de contaminação. São medidas de fluidos corporais, células e tecidos, ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, comportamentais ou energéticos a presença de poluentes ou a magnitude da resposta do animal exposto (LINDE, 2005).

Existem biomarcadores moleculares, celulares e ao nível de indivíduo. As duas características mais importantes dos biomarcadores são: a) permitem identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos; b) possibilitam a mensuração de efeitos sub-letais. Esta última característica permite pôr em prática ações remediadoras ou, melhor ainda, ações preventivas. Daí a importância e o interesse atual de incorporação da análise de biomarcadores em programas de avaliação da contaminação ambiental (JESUS & CARVALHO, 2008).

Podem ser classificados como de exposição, efeito ou suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição são alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a um poluente. Um exemplo de biomarcadores de exposição são os parâmetros bioquímicos que têm sido testados em peixes com relação a suas respostas a substâncias tóxicas (JESUS & CARVALHO, 2008).

Os biomarcadores de efeitos, em geral, não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a sua natureza, mas é característico da ocorrência de um estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cesse a atuação. São caracterizados pela indução de mecanismo de defesa celular, que se iniciam sempre como uma resposta adaptativa em nível molecular-bioquímico. Entretanto, se esse mecanismo falha ou se sua capacidade de resposta é ultrapassada, poderão ser desencadeadas alterações fisiológicas ou

histológicas, que podem ser irreversíveis, dependendo da capacidade do sistema ou órgão em responder ao estressor. Assim, o organismo pode ter sua capacidade afetada de reprodução ou crescimento. Alguns desses biomarcadores são órgão-específico como enzimas, que são lançadas na corrente sanguínea após lesão em tecidos, como várias hepato-amino-ácidos transaminases, indicativas de respostas adaptativas a estressores que são as envolvidas com a peroxidação lipídica ou estresse oxidativo (WINZER *et al.*, 2001).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de respostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (BARRET *et al.*, 1997), determinando condições como: indivíduo sadio, compensação do metabolismo, perturbação das funções, alterações morfológicas e morte. Estas condições aumentam a taxa de transição entre esses dois extremos (exposição e efeito). Os organismos, mesmo sendo da mesma espécie, não respondem igualmente à exposição a xenobióticos. Sexo, jejum, estresse pelo confinamento, tamanho e estágio de desenvolvimento são parâmetros de variação nas respostas a estressores, bem como o polimorfismo genético de uma população. Estes biomarcadores correspondem aos chamados biomarcadores de efeito latente (FOSSI & LEONZIO, 1993), significando que um organismo pode, em determinadas circunstâncias, ter limitada a habilidade de se adaptar ou sobreviver, o que pode ser determinado por mensuração de respostas fisiológicas que, analisadas em conjunto, expressam a diminuição da energia disponível para o crescimento (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

1.4.1- Acetilcolinesterase (AChE)

A Acetilcolinesterase é uma enzima que é responsável pela hidrólise da acetilcolina (um éster neurotransmissor) (Figura 4), tendo como produto o acetato e colina, com liberação de um próton (VIANA, 2005; ROMANI *et al.*, 2003). A hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor nicotínico da membrana pós-sináptica permitindo a abertura de canais de íons Na⁺, e a conseqüente despolarização da membrana, o que irá

proporcionar um potencial de ação, propagando o impulso (STENESH, 1998). Este processo evita a propagação contínua do impulso nervoso, que pode acarretar efeitos comportamentais como hiperatividade, asfixia e morte (ROEX, 2003).

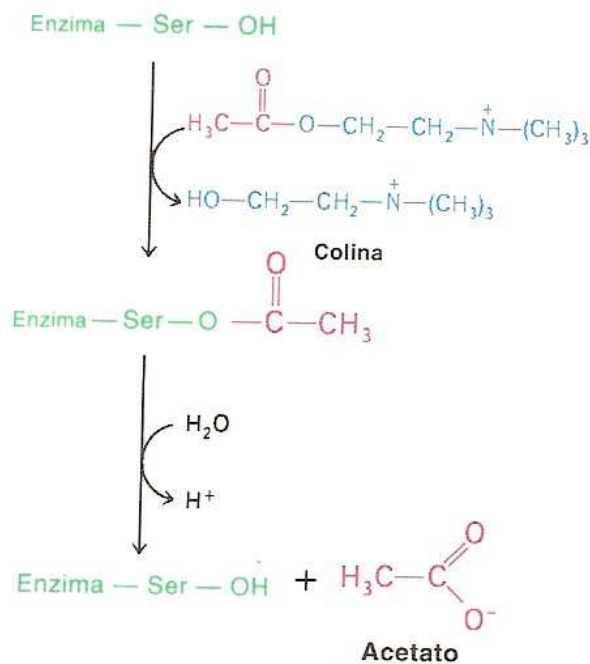


Figura 4. Clivagem das moléculas de acetilcolina (STRYER, 2002)

A Acetilcolina (ACh) é possivelmente a substância neurotransmissora mais bem conhecida nas sinapses químicas. A enzima acetilcolinesterase está sempre presente e é responsável pela hidrólise e portanto, remoção do neurotransmissor. À medida que diminui a quantidade de neurotransmissor, o potencial pós-sináptico diminui (SHIMIDT-NIELSEN, 1996).

A principal função da AChE é a hidrólise da acetilcolina (ACh), o mediador das sinapses colinérgicas no sistema nervoso, prevenindo contínuas passagens de impulsos, o que é vital para um normal funcionamento do sistema sensorial e

neuromuscular. Na transmissão sináptica colinérgica é essencial que a ACh seja degradada rapidamente antes da chegada de um novo impulso elétrico, sendo tal reação mediada pela AChE (STENESH, 1998).

A AChE é sensível a exposição a organofosforados e carbamatos, sendo a dosagem da sua atividade freqüentemente utilizada como biomarcador de efeito para a verificação dos efeitos primários da contaminação em diverso organismos, incluindo peixes, e na avaliação da qualidade das águas.(VIANA, 2005; STIEN *et al.*, 1998; SANCHO *et al.*, 2000; LIONETTO *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas tem sido relatada a inibição das colinesterases em várias espécies por outros contaminantes ambientais que não organofosforados e carbamatos (GUILHERMINO *et al.*, 2000). Quando a atividade de AChE é inibida de alguma forma, há bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, paralisando as funções vitais devido à sobreposição dos impulsos nervosos, causados pela permanência dos canais de Na⁺ abertos (STENESH, 1998). Assim sendo, o uso da AChE nos tecidos muscular e nervoso de peixes tem sido bastante utilizado para avaliar os efeitos da contaminação marinha, pois esta enzima tem ampla disponibilidade e grande quantidade nestes tecidos (STURM, 1999).

Em exposições especificamente relacionadas ao metilmercúrio, o principal órgão alvo é o sistema nervoso central em todas as espécies. O primeiro passo na formação do complexo acetilcolina-AChE parece ser o estabelecimento de uma ligação eletrostática entre a carga positiva do nitrogênio quaternário da colina do acetil e o sítio aniônico da AChE (GALLO & LAWRYK, 1991). Assim, se o sítio aniônico da enzima for ocupado pelo mercúrio, a acetilcolina não será capaz de ligar-se adequadamente à enzima e esta não será degradada.

O acúmulo deste neurotransmissor provoca hiperexcitação dos neurônios pós-sinápticos ou dos órgãos dependentes da ação sobre receptores nicotínicos e muscarínicos da acetilcolina, principalmente os músculos. Os efeitos tóxicos envolvem o sistema parassimpático, simpático, motor e nervoso central (GRIPPO & HEATH, 2003).

2- OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral:

Este estudo tem como objetivo geral, avaliar a eficácia da acetilcolinesterase como biomarcador bioquímico de contaminação por mercúrio em peixes.

2.2) Objetivos Específicos:

A) Determinar a capacidade de biocumulação de mercúrio no tecido muscular da traíra;

B) Analisar os tecidos da traíra quanto a biocumulação de mercúrio em diferentes formas (orgânica e inorgânica);

C) Determinar a resposta mediada pela acetilcolinesterase à exposição ao mercúrio total;

3- MATERIAS E MÉTODOS

3.1) Coleta das Espécimes

Espécimes de *Hoplias malabaricus* foram coletadas entre os meses de Janeiro a Abril de 2008, em açudes localizados no município de Itaocara, noroeste do Estado Rio de Janeiro (21°40'44"S e 42° 04' 53" W). Os açudes são localizados dentro de uma fazenda particular que tem a pecuária como atividade econômica sem registros de atividades de agricultura neste local.

A coleta das espécimes foram através de rede de arraste e após a coleta foram transportados dentro de um tanque de água de 20 litros, para o laboratório da Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF- onde foram acondicionados em tanques oxigenados por um período de aclimação de 7 (sete) dias. Os animais que apresentavam condições saudáveis (escamas brilhantes e ausência de fungos) foram utilizados no experimento.

3.2) Design Experimental

Após o período de aclimação dos peixes no laboratório, os peixes foram anestesiados com eugenol (1%). Os indivíduos foram divididos em três grupos tratados diferentemente obedecendo à forma química do mercúrio a ser ministrado (Tabela 1).

Tabela 1. Número amostral de peixes utilizados no experimento e os diferentes tratamentos.

	Número amostral
Controle	10
MeHg	12
HgCl ₂	6

Para a diluição dos reagentes de MeHg e HgCl₂ foi utilizada a solução de PBS (*Phosphate Buffer Solution*), para os indivíduos controle apenas a solução de PBS foi administrada. Em seguida, foram submetidos à injeção intraperitoneal contendo a mesma concentração de mercúrio orgânico (MeHg) ou mercúrio inorgânico (HgCl₂), que foi de 0,75µg/0,1mL. Essa concentração final foi utilizada, pois foram realizados testes anteriores a nível trófico em que se observou maior absorção ao tecido muscular com esse valor. O volume final injetado nos indivíduos, em todos os tratamentos, foi de 0,1 mL. Após o tratamento, os peixes foram colocados em aquários individuais permanecendo nestes até finalizar o tempo de exposição estipulado em 96 horas. Os maiores valores encontrados de acumulação de mercúrio foram no tempo de 96h, por isso a justificativa para a escolha do tempo de exposição utilizado.

Após completar 96h de exposição, os indivíduos foram anestesiados com o eugenol (1%) e dissecados para retirada do músculo, tecido utilizado nas análises químicas e bioquímicas. As amostras foram congeladas a -20°C para as posteriores análises.

3.3) Atividade Colinesterásica no músculo

Amostras de músculo axial com aproximadamente 0,05g foram obtidas através de incisão próxima à linha lateral, na altura da nadadeira dorsal. As análises foram realizadas no Departamento de Farmacologia, na UFPR. O fragmento foi colocado em eppendorf de 2 mL em banho de gelo e, em seguida, congelados à -20°C até a análise.

Para as análises, as amostras de músculo foram congeladas em banho de gelo moído e em seguida homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, conforme STURM *et al.* (1999). Os homogeneizados foram transferidos para eppendorf de 2 mL e centrifugados por 10 min a 4°C e a 10,0 ppm.

Os sobrenadantes foram utilizados para determinação da atividade colinesterásica, segundo o método de ELLMANN *et al.*, (1961), modificado para

microplaca por SILVA DE ASSIS (1998), cujo princípio é o desenvolvimento da reação colorida entre o reagente de cor DTNB e tiocolina.

Na microplaca de leitura em espectrofotômetro foi adicionado 200 μL de DTNB (5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato) a 0,75 mM, 50 μL de proteína diluída 1:5 e 50 μL de iodeto de acetilcolina a 9 mM sobre cada alíquota.

Todas as absorvâncias consideradas para cada amostra de músculo, inclusive na quantificação protéica, serão às médias de no mínimo quatro valores. Foi usado o espectrofotômetro TECAN SUNSHINE para as leituras. A média dos valores de absorvância foi utilizada para o cálculo da atividade específica e o resultado da atividade colinesterásica foi expresso em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Para quantificação protéica (proteína total) foi utilizado o método de BRADFORD (1976), adaptado por SILVA DE ASSIS (1998). Alíquotas (10 μL) de amostras diluída (1:5) em tampão fosfato (0,1M, pH 7,5) foram pipetados em uma micro placa. Em seguida, foram adicionados 250 μL de reagente de Bradford diluído (Bio Rad®). A absorvância das amostras foi verificada a 650 nm.

Os valores finais da quantificação colorimétrica foram obtidos em miligramas de proteína por mililitros de amostra, utilizando-se uma curva padrão pré-estabelecida com diferentes concentrações conhecidas de soro de albumina bovina (BSA).

3.4) Análise Química

Para determinação da concentração de mercúrio total, alíquotas de aproximadamente 1,0 g (peso úmido) foram retiradas amostras de músculos, para serem submetidas à extração ácida, segundo a metodologia descrita por BASTOS *et al.*, (1998). As análises foram desenvolvidas no laboratório de Ciências Ambientais (LCA).

O procedimento de extração química de mercúrio total em amostras de peixes descrita por BASTOS *et al.*, (1998) segue o protocolo abaixo. A exatidão da

metodologia usada foi checada e confirmada através do uso de material certificado de referência – DORM – 1 (tecido muscular de *Squalus acanthias*) – preparado pelo “Marine Analytical Chemistry Standards Programs”, Canadá. Maiores detalhes podem ser obtidos em Ferreira (2004).

O protocolo de extração química do mercúrio seguido nesse estudo foi descrito por Bastos *et al.* (1998), segue abaixo:

- 1) 1,00 g de tecido;
- 2) 1,0 mL de H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio) concentrado em banho de gelo;
- 3) 3,0 mL de H₂SO₄ : HNO₃ (ácidos sulfúrico e nítrico) (1:1) em etapas de 1 mL, em banho de gelo;
- 4) Digestão em bloco digestor a 60 °C (≅ 4h);
- 5) 5,0 mL de KMnO₄ (Permanganato de Potássio) 5%;
- 6) Digestão em bloco digestor a 60 °C (≅ 30 min);
- 7) Adição de NH₂OH.HCl (cloridrato de hidroxilamina) 12 %;
- 8) Filtração em filtro Whatman ;
- 9) Aferição para volume final de 20 mL;
- 10) Determinação em ICP-AES (Varian série Liberty II) com acessório gerador vapor frio (VGA 77). .

3.5) Análises Estatísticas

O programa utilizado foi o Graphpad versão 5.0. A análise de variância empregada foi ONE-WAY ANOVA (Repeated measures) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), com objetivo de verificar possíveis diferenças na concentração de Hg no tecido muscular entre os diferentes tratamentos utilizados e para avaliar a significância da atividade colinesterásica nos diferentes tratamentos.

Para descrever a dependência da variável concentração de Hg em relação a variável peso, comprimento e sexo foram realizados a regressão simples.

4) RESULTADOS

4.1- Variáveis Biológicas

Na tabela 2 são descritos os valores das médias dos parâmetros biológicos de cada tratamento, que abrange peso e comprimento das traíras coletadas. Vale ressaltar que as variáveis biológicas não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, não interferindo nesse caso nos dados, já que as médias foram muito próximas.

Tabela 2. Valores da média do peso e comprimento dos diferentes tratamentos após 96 h de exposição.

	Peso	Comprimento
Controle	132,63 ± 63,21	23,68 ± 3,57
MeHg	157,81 ± 56,66	23,84 ± 3,76
HgCl ₂	154,56 ± 61,70	25,80 ± 3,34

Foram identificados os sexos dos indivíduos utilizados neste experimento, porém em 4 indivíduos a identificação não foi possível no grupo controle. Entre os indivíduos que foi possível a identificação, houve predominância de machos em todos os tratamentos, como mostrado na Figura 5.

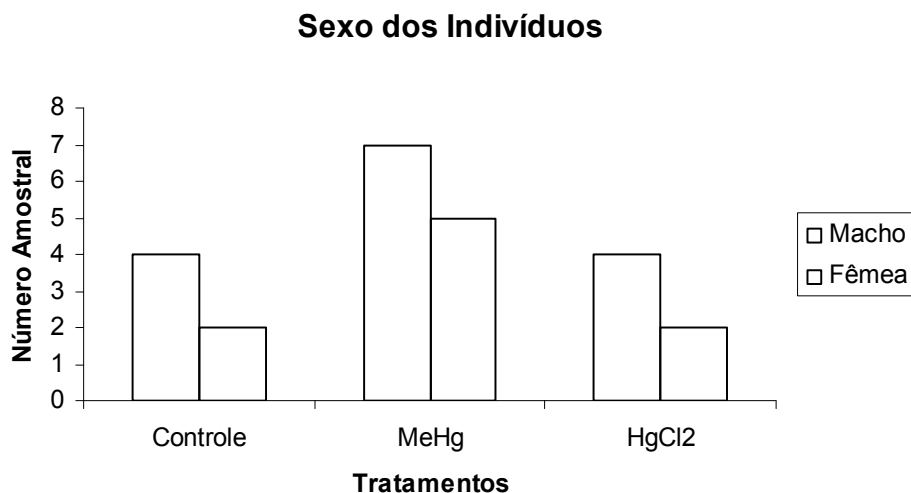


Figura 5. Relação de machos e fêmeas de cada tratamento utilizado

4.2. Análise química

Os resultados apresentados na tabela 3 demonstram que depois de 96h de exposição às diferentes formas de mercúrio, o tecido muscular apresentou a maior média de concentração de Hg no tecido muscular de indivíduos tratados com MeHg, quando comparados com o HgCl₂ e em indivíduos controle.

O resultado apresentado na tabela 3, mostra que o tecido muscular, depois de 96h de exposição ao xenobionte, apresentou uma maior tendência em concentrar no músculo a forma orgânica (MeHg) do mercúrio

Tabela 3. Média e desvio padrão das concentrações de mercúrio total nos músculo de traíras tratadas com MeHg, HgCl₂ e indivíduos controle.

	Controle	MeHg	HgCl ₂
Média	76,48	121,09	103,92
Desvio	17,68	60,59	19,01

Na Figura 6, observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de Hg nos músculos de indivíduos tratados com MeHg em relação aos indivíduos tratados com HgCl₂ e indivíduos controle. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre o HgCl₂ e o Controle.

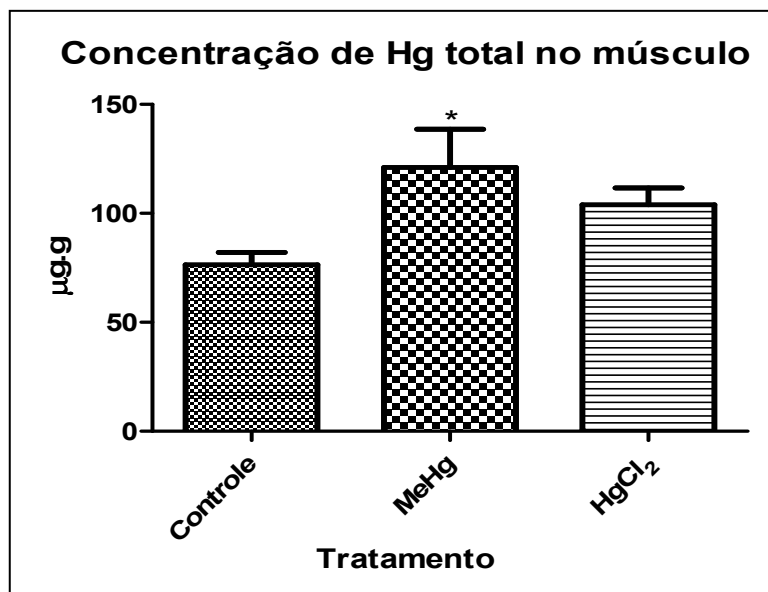


Figura 6. Concentração média de Hg total em músculo de traíra após 96h via injeção intraperitoneal ($p = 0,005$).

4.3) Atividade Colinesterásica

Os resultados estão expressos no gráfico da Figura 7, onde pode ser observada uma inibição significativa ($p < 0,0001$) da atividade colinesterásica nos indivíduos expostos ao MeHg em relação ao controle e ao $HgCl_2$.

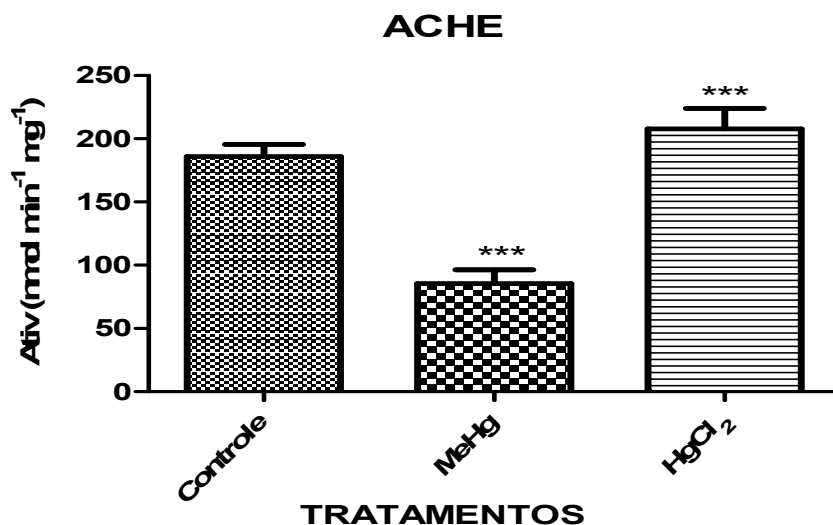


Figura 7. Atividade colinesterásica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) no músculo axial de *Hoplias malabaricus* após exposição, via injeção intraperitoneal, ao MeHg e $HgCl_2$.

Em indivíduos contaminados por $HgCl_2$ não houve diferença significativa ($p > 0,05$) da atividade colinesterásica, quando comparado com os indivíduos controle .

5) DISCUSSÃO

O aumento da quantidade de contaminantes ecossistema aquático necessita do entendimento do efeito biológico de xenobiontes na biota aquática. O reflexo do comprometimento ambiental de um ecossistema aquático pode ser evidenciado utilizando peixes como uma espécie potencial de estudo, devido a seu alto nível trófico e a sua grande importância na dieta alimentar do ser humano. Estas características contribuem para que peixes sejam espécie alvo para pesquisas de avaliação de impactos no ambiente e avaliação de risco, em que são utilizadas como marcadores biológicos, biomarcadores, que reflita o efeito do poluente nos organismos (ALBUQUERQUE, 2007).

O tecido muscular de peixes representa a principal via de contaminação para a população humana. Ele é considerado um bom monitor de exposição ao mercúrio, pois através do processo de bioacumulação há um aumento na concentração desse metal pesado (AZEVEDO, 2003). No Brasil, muitos autores têm utilizado o músculo para verificar o nível de mercúrio encontrado nesses animais, inclusive em *Hoplias malabaricus* (PFEIFFER *et al.*, 1989; BRABO *et al.*, 1999). Em estudos realizados por BRABO *et al.*, (1999), para verificar a concentração de metilmercúrio em peixes consumidos pela população indígena do Pará, observou-se que a traíra é a segunda espécie de peixe mais consumida, ficando também com o segundo lugar na concentração de metilmercúrio (0,322 µg.g-1).

Poucos estudos estão relacionados com o contaminante HgCl₂ . Alguns trabalhos mostraram que o músculo, quando contaminado com a forma inorgânica, apresentou as menores concentrações de mercúrio quando comparado com os outros tecidos. Isso é explicado já que o músculo atua como um sítio de estoque de mercúrio, não expressando uma contaminação recente. Isso se confirmou no estudo realizado por ALMEIDA (2006) e também por VIRGÍLIO (2007), que fizeram experimentos via injeção intraperitoneal em traíra e sarapoá, respectivamente, e foram encontradas em músculos as menores concentrações quando comparados com fígado e brânquias. Foi encontrada

concentração total de Hg para o grupo controle $271 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e para o grupo contaminado $502 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. Outro trabalho realizado por MELA (2004) utilizando traíras demonstrou que houve uma tendência de aumento na concentração de metilmercúrio nos tecidos analisados, músculo e fígado. Porém, traíras não apresentaram valores significativos em relação aos indivíduos do grupo controle. A justificativa poderia ser o tempo de exposição e dose, que podem não ter sido suficientes. No presente estudo, os resultados da concentração de mercúrio demonstraram que há uma tendência de aumento na concentração no tecido analisado (músculo) na forma orgânica. Os valores encontrados foram para MeHg $121,09 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, para HgCl_2 $103,92 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e controle $76,48 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, apresentando valores significativos ($p < 0,005$) em relação ao grupo contaminado por MeHg com o controle e HgCl_2 , diferentemente encontrado por MELA (2004). A possível justificativa seria a via de contaminação, no qual nesse trabalho foi utilizado injeção intraperitoneal e no de MELA (2004) trófica.

Em trabalhos realizados no campo como os de FERREIRA (2004) e SOUZA (2005), foram encontrados $526 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $246,21 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de concentração de Hg, respectivamente, em músculo de traíra na Lagoa do Campelo (ambiente considerado contaminado) em Campos dos Goytacazes. Os valores de concentração de mercúrio encontrados nos exemplares contaminados em ambos os testes podem ser considerados baixos. CASTILHOS *et al.*, (2005) também realizaram trabalho no campo, coletando amostras de duas espécies de peixes omnívoras (*Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus*), em duas áreas consideradas contaminadas (Rio Guandu e Rio Paraíba do Sul) e compararam a concentração total de mercúrio no músculo em ng/g. Foram encontrados valores dos níveis de mercúrio total estatisticamente diferentes, tanto para as duas espécies, quanto para as duas áreas estudadas.

Os valores das concentrações de mercúrio não podem ser comparados para condições de campo e laboratório, pois no campo o tempo de exposição ou o efeito sinérgico da mistura de contaminantes, podem influenciar a resposta ao estresse dos organismos.

Em muitos estudos, parâmetros como peso relacionado com a concentração de mercúrio são considerados importantes na análise da contaminação de Hg em peixes (CASTILHOS *et al.*, 2001; BRABO *et al.*, 1999; BARBOSA *et al.*, 2003; DÓREA *et al.*, 2003). No presente estudo, as variáveis biológicas, peso, comprimento e sexo, obtiveram médias muito próximas entre os indivíduos, refletindo a ausência de diferença significativa ($p > 0,005$) entre estas e as concentrações de Hg obtidas. A ausência de correlação obtida entre os parâmetros comprimento e sexo pode ser devido a uma pequena variação no peso e comprimento da amostra, uma vez que o presente estudo realizou testes em laboratórios, em que procurou selecionar animais de tamanhos aproximados, não abrangendo, portanto, diferentes classes de tamanho para possibilitar tais correlações.

De acordo com BRABO *et al.*, (2000), que realizaram o trabalho no campo, foi encontrada uma relação positiva entre a concentração de mercúrio e peso para os exemplares utilizados nos testes, porém não significativa, com um $R^2 = 0,4385$. Da mesma forma que resultados encontrados por FERREIRA (2004), onde somente a relação peso e comprimento foram considerados significativos. Porém, tanto o trabalho de BRABO *et al.*, (2000) e FERREIRA (2004) foi realizados no campo, diferentemente do atual trabalho.

O uso de biomarcadores bioquímicos é uma ótima ferramenta nos estudos de toxicologia ambiental. Através destes, é possível detectar os efeitos tóxicos de contaminantes nos níveis básicos de organização biológica, mesmo que tais xenobiontes estejam em uma baixa concentração no ambiente, devido a grande sensibilidade destes biomarcadores (STEGEMAN *et al.* 1992).

Em organismos aquáticos, existe uma relativa diversidade de propriedades bioquímicas e distribuição das colinesterases, bem como na sua sensibilidade a agentes anticolinesterásicos (HABIG *et al.*, 1998; BOCQUENÉ *et al.*, 1990; FLAMARION *et al.*, 2002). Em adição a estes agentes anticolinesterásicos, o mercúrio tem mostrado ser causa de inibição (GILL, *et al.*, 1990; GUILHERMINO *et al.*, 1996; CAJARAVILLE *et al.*, 2000), mas, apesar disso, o mecanismo envolvido na inibição colinesterásica por metais pesados é ainda pouco

conhecido. Em peixes, a enzima acetilcolinesterase, utilizada no atual trabalho, é mais predominante no cérebro e em tecidos musculares. Esta enzima é considerada um ótimo biomarcador quando está exposta a algum tipo de xenobionte, seja ele organofosforados ou metais pesados, confirmados por vários trabalhos.

Poucos estudos sobre a atividade de enzimas e as respostas celulares associadas têm sido realizados em peixes de água doce brasileiros, principalmente em relação ao efeito do contaminante cloreto de mercúrio. Os resultados obtidos na determinação da atividade enzimática demonstraram que a inibição da atividade colinesterásica em músculos de *H. malabaricus* foi ocasionada pela grande susceptibilidade desta espécie ao Metilmercúrio. O MeHg afetou a atividade colinesterásica durante a exposição intraperitoneal, diminuindo a ação catalítica desta enzima na traíra. A resposta para esta inibição é a de que o mercúrio possa ligar-se a grupos específicos desta proteína, alterando seu sítio ativo (VIARENGO, 1989; SIMKISS *et al.*, 1993). Estudo de ALBUQUERQUE (2007) mostrou que a enzima é bastante sensível a exposição a inseticidas OFs e carbamatos, sendo sua atividade inibida com a presença destes ou de seus metabólitos, o que permite que esta enzima seja utilizada como biomarcador de efeito para a verificação das seqüelas primárias da contaminação nos organismos aquáticos e na avaliação da qualidade das águas.

Considerando a atividade enzimática da acetilcolinesterase no atual trabalho, houve uma diferença significativa ($p < 0,005$) quando relacionado ao contaminante MeHg em relação ao controle e ao $HgCl_2$. Mesmo comparando trabalhos que não utilizaram injeção intraperitoneal, observa-se que a atividade enzimática foi inibida com algum xenobionte. No trabalho de LIAO *et al.*, (2006), utilizaram medaka (*Oryzias latipes*), que é um tipo de peixe japonês, e verificaram que houve inibição da acetilcolinestase em todos os tecidos (fígado, cérebro, músculo e brânquias) do medaka expostos ao MeHg.

No presente estudo, foi possível mostrar que não houve uma diferença significativa do $HgCl_2$ e controle. Isso se deve, possivelmente, por ser uma forma menos tóxica quando comparadas com a forma orgânica, já que a forma

inorgânica não é excretada pelos organismos e a forma orgânica tem capacidade de acumular-se nas cadeias tróficas. O tempo de exposição ou ainda o número amostral de peixes utilizados para o experimento com HgCl_2 foi pequeno, sendo também possíveis justificativas para não haver diferença significativa. Em estudos realizados por LINDE *et al.*, (2008) foram coletadas amostras de peixes invasivos (*Oreochromis niloticus*), no rio Paraíba do Sul, em diferentes pontos (Barra Mansa, Guandu, Paty do Alferes, Guapimirim). Esse rio sofre altos impactos de atividades agrícolas, despejos domésticos e industriais. As amostras de músculos dos peixes coletados foram utilizadas para a atividade da acetilcolinesterase, sendo que no ponto em Barra Mansa, a atividade da enzima foi menor, confirmando sua inibição e no ponto em Guandu, a atividade da enzima foi maior.

Baseados nos testes realizados nesse experimento pode-se observar que estudos *in vitro* em laboratórios, utilizando injeção intraperitoneal, apesar de não possuírem caráter realístico são importantes para testes toxicológicos pois permitem o entendimento do comportamento enzimático na presença de um contaminante, que neste caso é o mercúrio. Os resultados encontrados são importantes para futuros trabalhos que utilizarão biomarcadores para avaliar um ambiente que sofre com a presença dos contaminantes, o que complementar os dados obtidos nas análises químicas.

6 -CONCLUSÃO

O biomarcador bioquímico utilizado respondeu positivamente para a forma orgânica, já que mesmo em pouco tempo de exposição foi possível observar a atividade da enzima acetilcolinesterase sendo inibida.

As medidas das concentrações de Hg orgânico e inorgânico no músculo, confirmaram uma maior tendência do MeHg em acumular no tecido muscular, apresentando as maiores concentrações de Hg quando comparados com a forma inorgânica, que no mesmo tempo de exposição apresentou concentrações menores.

Através da realização destes testes em laboratório, mesmo sendo via injeção intraperitoneal, forma de caráter não realística, foi possível conhecer como as diferentes formas do mercúrio (orgânica e inorgânica) agem no tecido muscular, apresentando capacidades diferentes de acumularem no músculo.

As medidas da atividade colinesterásica em músculo axial de traíras expostas ao metilmercúrio no tempo de 96h confirmaram a neurotoxicidade deste metal em peixes; já que os valores apresentados com relação à inibição da atividade colinesterásica foram maiores, quando comparados com o HgCl_2 e ao controle, o que permitiu avaliar os efeitos da contaminação por metais e agentes anticolinesterásicos.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. 2007. Uso da acetilcolinesterase e metalotioneína em peixes na avaliação do efeito da contaminação da Baía de Guanabara, RJ. Dissertação de Mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP).

ALMEIDA, P. G. A. 2006. Avaliação da Concentração de Cloreto de Mercúrio no Tecido Muscular de Traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), após Intoxicação Aguda. Monografia. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

ANDERSON, H. A; HANRAHAN, L.P.; SMITH, A; DRAHEIM, L.; KANAREK, M. & OLSEN, J. 2004. The role of sport-fish consumption advisories in mercury risk communication: a 1998-1999 12-state survey of women age 18-45. *Environmental Research*, 95:315-324.

ASCHNER, M. 2002. Neurotoxic mechanisms of fish-borne methylmercury. *Environmental toxicology and pharmacology*, 12:101-104.

AZEVEDO, F. A. 2003. Toxicologia do Mercúrio. Editora Rima, São Carlos, 272p.

BARBOSA, A C.; SOUZA J.; DÓREA G. J.; JARDIM F. W., FADINI S. P. 2003. Mercury Biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45: 235-246

BASTOS, W. R.; MALM, O.; PFEIFFER, W. C.; CLEARY, D. 1998. Establishment and Analytical Quality Control of Laboratories for Hg Determination in Biological and Geological Samples in the Amazon, Brazil. *Ciência e Cultura*. Vol. 50 (4). 255-260 p.

BEZERRA, J. F. M. 1990. Estimativas de cargas de mercúrio liberadas para o meio ambiente por atividades industriais – caracterização de fontes. Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro.

BARRETT, J.C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D. & GOLDSTEIN, B.D. 1997. 12TH Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspective*, 105: 699-737

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F. & TRUQUET, P. 1990. Characterization and assay conditions for use of AchE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environment Research*, 30:75-89.

BOENING, D.W. 2000. Ecological effects, transport and fate of mercury: A general Review. *Chemosphere*, 40:1335-1351.

BRABO, E.S.; SANTOS, E.D; de JESUS I.M; MASCARENHAS, A.F.S.; FAIAL K.D.1999. Mercury contamination of fish and exposures of an indigenous community in Para State, Brazil. *Environ Research section 84*: 197-203 p.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. & VIARENGO, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, 247:295-311.

CASTILHOS, Z.C.; BIDONE, E. D.; HARTZ, S.M. 2001. Bioaccumulation of mercury by tucunaré (*Cichla ocellaris*) from Tapajós river region, Brazilian Amazon: A field dose – response approach. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 66: 631-637.

CAVALCANTE, P. R. S.; COSTA, M. L.; TAROUCO, J. E. F. 1990. Avaliação preliminar dos níveis de mercúrio da porção interna do golfo maranhense. Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro.

DALLINGER, R. & RAIMBOW, P.S. 2003. Ecotoxicology of metals in invertebrates. Chelsea ,Lewis publishers.

DÓREA, J.G.; BARBOSA, A.C.; SONZADE, J.; FADINI, P.; JARDIM, W. 2003. Piranhas (*Serrasalmus* spp.) as markers of mercury bioaccumulation in Amazonian ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 59. 57-63p.

DRISCOLL, C.T.; YAN, C.; SCHOFIELD, C.L.; MUNSON, R. & HOLSAPPLE, J. 1994. The mercury cycle and fish in the Adirondack Lakes. *Journal of fish biology*, 28:138-143.

EISINK, G. G. J. 1990. A presença de mercúrio nos ecossistemas aquáticos do estado de São Paulo. Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro.

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 101. 1990. Methylmercury. *World Health Organization Geneva*.

FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. & MORON, S.G. 1993. Comparative study of gill dimensions of three Erythrinid species in relation to their respiratory function. *Canadian journal of zoology*, 71:160-165.

FERREIRA, A. G. 2004. Efeitos Ecotoxicológicos Da Contaminação Ambiental Por Mercúrio Em *Hoplias malabaricus* (Traíra – BLOCH, 1794 – PISCES – ERYTHRIDAE) De Quatro Lagoas Do Norte Do Estado Do Rio De Janeiro. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 23-24p.

FOSSI, C. & LEONZIO, C. 1993. Nondestructive biomarkers in Vertebrates. Boca Raton. Floride, Lewis. 313p.

FLAMARION, P.; NOURY, P. & GARRIC, J. 2002. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in the club (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution*, 23:35-45.

GALLO, M.A & LAWRYK, N.J. 1991. Organic phosphorus pesticides. In: Handbook of pesticide toxicology (W.J. Hayes & E.R. Laws) vol. 2, eds(S. Diego: Academic Press), pp. 917-1123.

GILL, T.S.; TEWARI, H. & PANDE J. 1990. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury om tissue enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97:287-292.

GILLIAN, J. F.; FRASER, D. F. 2001. Movement in corridors: Enhancement by predation threat, disturbance, and habitat structure. *Ecology*. v. 82, p. 258 – 273.

GOCHFELD, M. 2003. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56:174-179.

GUILHERMINO, L.; LOPES, M.C.; CARVALHO, A.P. & SOARES, A.M.V.M. 1996. Inhibition of acetylcholinesterases activity as effect criterion in acute tests with Juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 32:727-738.

GRIPPO, M.A. & HEATH, A.G. 2003. The effect of mecury on the feeding behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*).*Ecotoxicology and environmental safety*, 55:187-198.

HABIG, C.; DIGIULIO, R.T. & ABOU-DONIA, M.B. 1998. Comparative propertics of channel catfish (*Ictaturus panctatus*) and blue crab (*Collerectes sapidus*) acetylcholinesterase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 91:293-300.

JESUS, T. B. & CARVALHO, C.E.V. 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para a avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia brasiliensis*, 12 (4): 680-63.

KEHRIG, HA, PINTO, FN, MOREIRA, I, MALM, O. 2003. Heavy metals and methylmercury in a tropical coastal estuary and a mangrove in Brazil. *Organic Geochemistry*, 34: 661–669.

LACERDA, L D., MENEZES, C. F. de. 1997. O mercúrio e a contaminação de reservatórios no Brasil. *Ciência Hoje*, v. 19, n.110, p. 43-39.

LIAO, C. Y., FU, J.J., SHI, J.B., ZHOU, Q. F., YUAN, C. G., JIANG, G. B.*. 2006. Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.

LINDE, AR, INÁCIO, AF, NOVO, LA, VIANA, TAP, AIBUQUERQUE, C. 2005. Utilização de Bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos. *Mundo & Vida*.

LINDQVIST, O.; JOHANSSON, K.; AASTRUP, M.; ANDERSON, A.; BRINGMARK, L.; HOVSENIUS, G.; HAKANSON, L.; IVERFELDT, A.; MEILI, M.; TIMM, B. 1991. Mercury in the Swedish Enviroment – Research on Cause, Consequences and Corrective Methods. *Water, Air and Soil Pollution*, 55: 1-261.

LOPEZ-CARILLO, L. & LOPEZ-CERVANTES,M. 1993. Effect of exposure to organophosphate pesticides on serum cholinesterase levels. *Arch. Environ. Health*, 48 (5):359-363.

LIONETTO, M.G.; *CARICATTO, R.; GIORDANO, M.E.; PASCARIELLO, M.F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin* 46 324–330.

MALM, O.; GUIMARAES, J. R. D. ; CASTRO, M. B. ; BASTOS, W. R. ; PFEIFFER, W. C. ; VIANA, J. P. ; SILVEIRA, E. G. 1997. Mercúrio na Amazônia: Evolução da contaminação ambiental e humana. *Ciência Hoje*, v. 22, n. 128, p. 16-23.

MELA, M. 2004. Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra). Tese de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

MOREL, F. M.; KRAEPIEL, A. M. L.; AMYOT, M. 1998. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* Vol. 29, 543-566 pp.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A. & LEITE, M.B. 2006. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. Pp. 413-431. *In*: P.A Zagatto & E. Bertoletti. (eds.). *Ecotoxicologia Aquática- Princípios e Aplicações*. São Paulo.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Mercúrio. (Critérios de salud ambiental, n,1) Genebra, OMS, 1978. 148 p.

PELLETIER, E. C. AUDET. 1994. Tissue Distribution and Histopathological Effects of Dietary Methylmercury in Benthic Grubby *Myoxocephalus aeneus* Received: 22 March 1994/Accepted: 31 October 1994 *Environmental Contamination and Toxicology*.

PLANQUETTE, P.; KEITH, P.; LE BAIL, P.Y. 1996. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 1). Collection du Patrimoine Naturel, IEGB-M.N.H.N., INRA, CSP, Min. Env., Paris. v.22, p. 166.

PFEIFER, W.C.; LACERDA, L.D.; MALM, O.; SOUZA, C.M.; SILVEIRA, E.G. & BASTOS, W.R. 1989. Mercury concentrations in inland waters of gold mining areas in Rondonia. *Science of the total environment*, 87:233-240.

RODRIGUES, A. P. 2003. Avaliação de Risco Ecológico em Ecossistemas Aquáticos Contaminados por Mercúrio. Estudo de caso: Ilha das Enxadas, Baía de Guanabara, RJ.

ROMANI, R, ANTOGNELLI, C, BALDRACCHINI, F, de SANTIS, A, ISANI, G, GIOVANNINI, E, ROSI, G., 2003. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions*; 145: 321-329.

ROEX, EWM, KEIJZERS, R, VAN GESTEL, CAM.,2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology* ; 64: 451-460

STIEN, X, PERCIC, P, GNASSIA-BARELL, M, ROMÈO, M, LAFAURE, M. 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*; 99: 339-345.

SANCHO, E, CERÓN, JJ, FERRANDO, MD. 2000 Cholinesterase Activity and Hematological Parameters as Biomarkers of Sublethal Molinate Exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* ; 46: 81-86.

SANTOS, E.C.O.; MAURA de JESUS, I.; BRADO, E.S.; LOUREIRO, E.B.; MASCARENHAS, A.F.S.; WEIRICH, J.; CÂMARA, V.C. & CLEARY, D. 2002. Mercury exposures in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. *Environmental Research Section*, 84:100-107.

SIMKISS, K., DANIELS, S. & SMITH, R.H. 1993. Effects of population density and cadmium toxicology on growth and survival of blowflies. *Environmental Pollution*, 81:41-45.

SOUZA, P. T. 2005. Avaliação da Distribuição de Mercúrio Total em Tecido Muscular da Ictiofauna da Lagoa de Cima e Campelo na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro. Tese de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 28-56 p.

SOUZA LIMA, A.P.; MULLER, R.C.S.; SARKIS, J.E.S.; ALVES, C.N.; BENTES, M.H.S.; BRADO, E. & SANTOS, E.O. 2000. Mercury contamination in fish from Santarém, Pará, Brazil. *Environmental Research Section*, 83:117-122,.

SUNDIN, L.I.; REIS, S.G.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. & MILSOM, W.K. 1999. Cardiovascular and respiratory reflexes: The tropical fish, Traíra (*Hoplias malabaricus*) O₂ Chemosponses. *Respiration Physiology*, 116:181-199.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FORLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M. & VAN VELD, P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: *Biomarkers Biochemical, Physiological, and histological markers of antropogenic stress* (HUGGETT, R.J.; KIMERLEY, R.A.; MEHRLE, P.M.Jr.; BERGMAN, H.L.). Eds. Lewis Publishers, 235-234.

STENESH, J. 1998. Biochemistry. New York: Plenum .In: Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR) (COSTA, J. R. M. A).

STURM, A.; DA SILVA A., H.C. & HANSEN, P.D. 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47:389-398.

STRYER L. 2002. Bioquímica 5° Edição (Eds.) Guanabara Koogan.

VERGILIO, C. S. 2007. Efeito da contaminação aguda in vitro por Cloreto de Mercúrio em contaminação aguda in vitro por cloreto de mercúrio em *Gymnotus carapo* (TUVIRA, LINNAEUS 1758) e caracterização histológica. Monografia. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

VIANA, TAP. 2005. Bioindicadores e mercúrio em tubarões costeiros pescados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. [Monografia de bacharelado] Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro.

VIARENGO, A. 1989. Heavy metal in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at cellular level. *Review of Aquatic Science*, 1:295-317.

WINZER, K.; WINSTON, G.W.; BECKER, W.; VAN NOORDEN, C.J.F. & KOCHER, A. 2001. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology*, 52: 143-155.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Inorganic mercury. Geneva. *Environment Criteria* 101. 140p, 1991.

ZHOW, H.Y. & WONG, M.H. 2000. Mercury accumulation in fresh water fish with emphasis on the dietary influence. *Water Research*, 17:4234-4248.

