

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

INÊS DA SILVA RABITTO

Avaliação da exposição crônica do Hg e DDTs em *Cichla monocus* (Cichlidae) e riscos para exposição humana na Amazônia

**CURITIBA
2010**

INES DA SIVA RABITTO

Avaliação da exposição crônica do Hg e DDTs em *Cichla monoculus* (Cichlidae) e riscos para exposição humana na Amazônia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro/UFPR

Co-orientador: Dr. Wanderley Rodrigues Bastos/UNIR

**CURITIBA
2010**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TESE POR MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, APENAS PARA FINS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS.

Catálogo na publicação

Rabitto, Ines da Silva

Avaliação da exposição crônica do Hg e DDT em *Cichla monoculus* (Cichlidae) e riscos para exposição humana na Amazônia/Inês da Silva Rabitto Orientador: Ciro Alberto Oliveira Ribeiro- Curitiba, 2010.

163p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Área de concentração: Toxicologia Celular) – Universidade Federal do Paraná

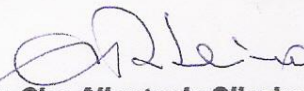
1. Peixes teleósteos 2. Bioacumulação 3. Mercúrio 4. DDT

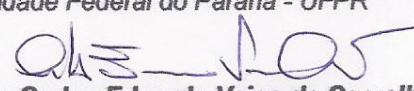
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

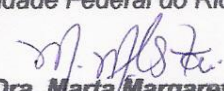
PARECER


A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Carlos Eduardo Veiga de Carvalho
Universidade Estadual Norte Fluminense - UENF


Prof. Dr. José Maria Monserrat
Universidade Federal do Rio Grande - FURG


Prof. Dra. Marta Margarete Cestari
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplentes,

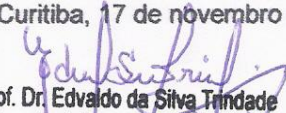
Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dra. Carolina Camargo de Oliveira
Universidade Federal do Paraná

Após argüir a doutoranda **Inês da Silva Rabitto**, em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "Avaliação da exposição crônica do Hg e DDT em *Cichla monoculus* e riscos para exposição humana na Amazônia", é de parecer favorável à Aprovação, da acadêmica, habilitando-a ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 17 de novembro de 2010


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

CENTRO POLITÉCNICO - CEP 81.531-990 - JARDIM DAS AMÉRICAS - Caixa Postal 19031-
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 - E-Mail: pgbiocel@ufpr.br - www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA -PR



AGRADECIMENTOS

A DEUS, POR ESTAR PRESENTE EM TUDO EM MINHA VIDA, POR COLOCAR NA MINHA VIDA PESSOAS COM AS QUAIS PUDE CONTAR E EM MOMENTOS DIFÍCEIS, QUE CONSEGUI SUPERAR. MOMENTOS ALEGRES, QUE PUDE COMPARTILHAR E PRICIPALMENTE POR ME SENTIR AMADA POR ELE E POR SUA MÃE, QUE ME COBRIU COM SEU MANTO DE PROTEÇÃO.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro professor do Departamento de Biologia Celular. UFPR, pelo profissionalismo, paciência infinita, carinho e dedicação ao meu trabalho e principalmente pelas inúmeras vezes que me ajudou quando eu mais precisava.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma também me ajudaram e apoiaram nesta TESE:

na secretaria da Pós-Graduação da Biologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas: Marlene B. de Camargo, obrigada...querida, você é a prova que nos menores frascos estão mesmo os melhores perfumes.

no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR:

Professora Dr^a. Célia Regina, especialmente Vera Regina e Rosangela a por sua dedicação e competência.

Sou também muito grata, na academia, a:

A todos os meus colegas, alunos dos demais laboratórios do departamento que não citarei nomes, pois tenho receio de esquecer alguém, e “todos” foram de igual importância.

Aos professores:

Ao professor M.Sc. Marco Randi, professora Dr^a Rute, Dr. Cecília B. Niederheitmann, Dr. Luiz Fernando Fávaro (Zão), Dra. Claudia O. Machado, Dra. Flavia Rios e a todos os professores deste departamento e aqueles que não me lembro o nome neste momento, mas que tive o prazer de compartilhar o ambiente de trabalho, obrigada pela atenção e disponibilidade.

Aos laboratórios colaboradores

Ao professor Dr. Cid Aimbiré Moraes dos Santos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde.

Departamento de Estatística, Setor de Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Professora Sonia (nossa Soninha) pessoa humana sem precedentes, obrigada pela colaboração e carinho que demonstrou por este trabalho.

Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados - LIPS – Prof. Dra. Célia Regina C. Franco, Prof Dr. Edvaldo da Silva Trindade, obrigada pelo incentivo e valorização do meu trabalho.

Laboratório de toxicologia Ambiental, departamento de farmacologia – Prof. Dra. Helena Cristina Silva de Assis, agradeço pela atenção e disponibilidade.

Ao professor Dr. Manoel Lima de Menezes Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista. Bauru – SP, obrigada pela atenção e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Wanderley Rodrigues Bastos, Ronaldo Almeida, Ígor Bruno Barbosa de Holanda, Roberta Carolina Ferreira Galvão, Beta (Elizabete Nascimento) Alexandra, Jane, Jú, Darlly, Greice, enfim todos do laboratório de Biogeoquímica Ambiental, Wolfgang C. Pfeiffer - Núcleos de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Rondônia, Rondônia, Porto Velho, Brasil, OBRIGADÃO pela acolhida.

E ainda...

Aos meus pescadores prediletos, Ronaldinho, Dario, Lemos, Prof. Gil, Tchê, Mendonça, Cardoso, Ígor, OBRIGADO!!!! pelas amostras, e por tudo, sem vocês teria sido muito, muito mais difícil. Aprendi muito, mas...ainda não sei pescar, conto com vocês numa próxima coleta.

Aos meus queridos amigos do laboratório, Samuel (você é demais). Loli (você é um barato) Daniel, Flavio, Dandie (valeu as ajudinhas), Rodrigo (você é 1000), Stefani, Mônica, Ana, Paola, enfim todos!!!! OBRIGADA

A minha querida amiga, Daniele Dietrich companheira de limpezas, de todas as reclamações, fofquinhas!!! boas. Obrigada pelas inúmeras vezes que abusei de sua bondade, por todas as festas, reuniões... formatura, enfim obrigadoo!!! pela sua alegria e bom humor, abraçoss!!!

Ao mais jovem professor do departamento Francisco, amigo querido, profissional impecável, sem você tudo seria mais difícil, com certeza.

A minha especial amiga Maritana, por TODAS as vezes que me ajudou, por estar junto em TODAS as horas que mais precisei, meu OBRIGADA sincero.

Aos meus amigos da equipe 8, setor C, DAS Equipes de Nossa Senhora (ENS), pelo incentivo e intercessões e orações.

A MINHA FAMÍLIA TODA, especialmente meu marido REGINALDO, minhas filhas CAROL E CAMILA, minha mamã querida (obrigada pelas orações), minha irmã pela força positiva, minha sobrinha querida BRUNA, (pela revisão técnica do texto, parabéns pela competência). A todos por agüentarem o estresse, viagens, ausências diante do notebook, enfim VALEU!!!

...Existe apenas um pecado, um só. E esse pecado é roubar.

Qualquer outro é simplesmente uma variação do roubo.

Quando você mata um homem, está roubando uma vida.

Está roubando da esposa o direito de ter um marido,

Roubando dos filhos um pai.

Quando mente, está roubando de alguém o direito de saber a verdade.

Quando trapaceia, está roubando o direito à justiça.

Entende?

...Não há nada mais infame do que roubar, Amir.

Um homem que se apropria do que não é seu, seja uma vida

Ou um pedaço de naan (pão) cuspo neste homem...

Khaled Hosseini

Trecho extraído do livro "O caçador de pipas"

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALFAC – Fixador a base de AL =álcool, F=formol, AC= ácido acético glacial
CAT – catalase
CS – condroitin sulfato
DDE - diclodifenildicloetano
DDT – diclorodifeniltricloroetano
DS – dermatan sulfato
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético (*Ethylenediaminetetracetic Acid*)
ERO(s) – espécie(s) reativa(s) de oxigênio
FOX - do inglês *Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*
G6PDH – glucose-6-fosfato desidrogenase
GPx – glutaciona peroxidase
GR – glutaciona redutase
GSH – glutaciona reduzida
GSSG – glutaciona dissulfeto (uma das formas da glutaciona oxidada)
GST – glutaciona S-transferase
Hg – mercúrio
HS – heparan sulfato
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HCH – hexaclorocicloexano
Hg total – medida do mercúrio sem considerar as formas químicas
HO[•] - radical hidroxila
LPO – peroxidação lipídica (do inglês *lipid peroxidation*)
MEC – matriz extracelular
MeHg – monometilmercúrio
ML – microscopia de luz
MET – microscopia eletrônica de transmissão
MEV – microscopia eletrônica de varredura
O₂^{•-} - radical ânion superóxido
PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*)
POC(s) – pesticida(s) organoclorado(s)
POPs – poluentes organopersistentes
ROOH – hidroperóxido(s) orgânico(s)
SOD – superóxido dismutase(s)
δ-ALAd – delta-aminolevulinato desidratase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Biodisponibilidade de contaminantes orgânicos e inorgânicos.....	3
1.2. Organoclorados	5
1.2.1 Propriedades Físico-Químicas do DDT	8
1.2.2. Toxicidade do DDT.....	10
1.2.3. Contaminação ambiental do DDT	11
1.3. Metais.....	13
1.3.1 Mercúrio.....	15
1.3.2 Toxicodinâmica do mercúrio.....	21
1.4. Caracterização da espécie estudada	23
2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1. INTRODUÇÃO	40
CAPÍTULO I	43
Risco de exposição ao mercúrio e ao DDT em populações consumidoras de peixes na Amazônia.....	43
OBJETIVOS	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
2.1. Área estudada e amostras de peixe	44
2.2. Determinação de mercúrio total em músculo	45
2.3. Análises de DDT e DDE: reagentes e padrões	46
2.4. Procedimentos analíticos	47
2.5. Instrumentação	47
2.6. Procedimentos histopatológicos.....	48
2.7. Atividade da colinesterase	49
2.8. Procedimentos estatísticos	49
3. RESULTADOS	50

3.1. Bioacumulação de mercúrio	50
3.2. Bioacumulação do DDT e DDE.....	52
3.3. Biomarcadores	55
3.3.1 Aspectos morfológicos	55
3.3.2. Atividade Colinesterásica	57
4. DISCUSSÃO	62
5. CONCLUSÕES	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
RESUMO.....	76
ABSTRACT	77
1. INTRODUÇÃO	78
CAPITULO II	80
Avaliação crítica do uso de biomarcadores de respostas antioxidantes como ferramenta no biomonitoramento de ambientes tropicais de água doce	80
OBJETIVOS	80
2. MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1 Atividade da Catalase (CAT)	81
2.2. Atividade da glutaciona peroxidase (GPx).....	82
2.3. Atividade superóxido dismutase (SOD).....	82
2.4. Atividade da Glutaciona S-transferase (GST).....	83
2.5. Atividade da glutaciona redutase (GR).....	83
2.6. Atividade da δ -aminolevulínico desidratase (δ -ALAD).....	84
2.7. Medida da glutaciona reduzida (GSH)	84
2.8. Quantificação da Peroxidação lipídica (LPO).....	85
2.9. Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	85
2.10. Quantificação de proteínas totais	86
2.11. Procedimentos estatísticos	86
3. RESULTADOS	87
4. DISCUSSÃO	93
5. CONCLUSÕES	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

RESUMO	106
ABSTRACT	107
1. INTRODUÇÃO	108
CAPÍTULO III	112
Avaliação morfológica da exposição crônica e natural ao mercúrio e DDTs em <i>C. monocolus</i> e novas perspectivas de biomarcadores	112
OBJETIVOS	112
3. MATERIAL E MÉTODOS	113
3.1. Análises Cito e Histopatológica de Tecidos Alvos	113
3.1.1 Microscopia de Luz de fígado, brânquias e rim anterior de <i>C. monocolus</i>	113
3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de fígado de <i>C. monocolus</i>	114
3.3. Caracterização dos componentes de matriz extracelular	115
3.4. Análises histopatológicas	116
3.4.1. Análises estatísticas.....	116
4. RESULTADOS	117
4.1. Histopatologia de rim anterior de <i>C. monocolus</i>	117
4.2. Histopatologia de Fígado de <i>C. monocolus</i>	118
4.3. Ultraestrutura de fígado de <i>C. monocolus</i>	119
4.4. Histopatologia de brânquias de <i>C. monocolus</i>	119
4.4. Distribuição de colágeno nas brânquias, fígado e rim anterior de <i>C. monocolus</i>	121
4.5. Caracterização dos componentes de matriz extracelular	122
4.6. Análise do índice de lesão do rim anterior.....	140
4.7. Análise do índice de lesão do Fígado	141
5. DISCUSSÃO	143
6. CONCLUSÕES	151
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	152
8. CONCLUSÕES GERAIS	156
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158
ANEXO	163

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os processos de geração (fontes ou origens), transporte e transformação, efeitos (respostas biológicas) e os destinos finais (acumulação em compartimentos de ecossistemas, órgãos e fluídos específicos da biota) de uma variedade extensa de compostos químicos, orgânicos e inorgânicos que são incorporados aos ecossistemas aquáticos e terrestres. Interdisciplinares e complexos por natureza, esses conhecimentos não são sempre fáceis de ser adquiridos, mesmo para os graduados em ciências ambientais, como a química, a biologia e a geologia (Zagatto e Bertolletti, 2006).

Os compostos, orgânicos ou inorgânicos, contaminantes ou não (nutrientes) sofrem muitas alterações na quantidade (concentração) e estão sempre sendo transportados na biosfera, isto é, processos de transporte a qual pode diminuir (diluição), aumentar (reconcentração) ou sofrer transferência da fase. No que se refere à qualidade durante o transporte, os compostos são molecularmente alterados em função de processos como a degradação e das múltiplas reações químicas de que os mesmos podem participar, aumentando, diminuindo ou mesmo inativando seu poder tóxico (Reeve, 1994).

Muitos efeitos podem ser provocados por interações sinérgicas, antagônicas, de potenciação e de adição de contaminantes orgânicos e inorgânicos sobre muitas comunidades da biota. Apesar disto, dada a complexidade das questões envolvidas, não se dispõe ainda de explicações claras sobre os efeitos causados por tais interações. A exposição da biota as misturas de contaminantes podem levar a interações toxicológicas resultantes da exposição a dois ou mais contaminantes,

acarretando uma resposta biológica quantitativa e qualitativamente diferente da esperada pela ação dos contaminantes sozinhos (Rand *et al.*, 1995).

Existem vários aspectos a serem considerados quando se avaliam efeitos induzidos por contaminantes químicos à biota (resposta biológica). Em sistemas naturais, os organismos geralmente são expostos não somente a um único contaminante, mas sim a uma mistura de diferentes substâncias (Rand *et al.*, 1995).

Podem ocorrer muitos tipos de efeitos proveniente destas interações: efeitos sinérgicos ocorrem, quando um efeito combinado de dois contaminantes é muito maior do que a soma dos efeitos dos contaminantes individuais aplicados sozinhos; efeitos de potenciação ocorrem quando um contaminante tem efeito tóxico somente quando é aplicado conjuntamente com outro contaminante; efeitos antagônicos ocorrem quando dois contaminantes, aplicados juntos, interferem um no outro ou um interfere com outro contaminante que co-existe no meio e efeitos aditivos seria observado quando o efeito combinado de dois contaminantes é igual à soma dos efeitos dos contaminantes aplicados sozinhos, são mais comumente observados quando dois contaminantes são aplicados juntos (Rand *et al.*, 1995; Zagatto e Bertoleti, 2006).

Mesmo com inúmeras pesquisas realizadas existe a necessidade de construir um banco de dados capaz de permitir a separação daquilo que se constitui a linha de base ou o *background* do funcionamento ecológico e da estruturação das comunidades bióticas, ou seja, das funções ecológicas e da estrutura das comunidades dos ecossistemas, de suas alterações naturais e das alterações ou mudanças decorrentes da presença de contaminantes (Moore e Ramamoorthy, 1984). Especialmente no Brasil, não somente os programas de monitoramento devem ser orientados para esse fim, mas também os projetos de pesquisa que

visem desvendar as intrincadas questões associadas ao entendimento das “causas e efeitos” na avaliação ambiental de nossos sistemas aquáticos.

1.1 Biodisponibilidade de contaminantes orgânicos e inorgânicos

Conhecimentos sobre as propriedades químicas e as interações físicoquímicas dos contaminantes orgânicos e inorgânicos são aplicados em biomonitoramento, e são necessários para prever, por exemplo, onde poderiam ocorrer maiores concentrações desses compostos. Estes conhecimentos, aliados aos dados ecotoxicológicos, tornam-se importantes para entender o significado das concentrações encontradas em diferentes compartimentos no que diz respeito ao risco ambiental (Reeve, 1994).

Praticamente 100 % do total de metais e outros contaminantes (materiais dissolvidos e particulados), potencialmente biodisponíveis em sedimentos totais estão associados às partículas, seja de natureza orgânica ou inorgânica que chegam ao ambiente aquático, invariavelmente se associam de alguma forma, através de processos de superfície, como a adsorção, complexação e reprecipitação, aos particulados suspensos preexistentes no ambiente e tendem a se decantar no fundo desses ambientes, passando assim a fazer parte dos sedimentos (Silvério e Mozetto, 1998).

A degradação de compostos contaminantes diz mais respeito a compostos orgânicos, quer de origem interna aos ecossistemas aquáticos, quer de origem externa, transportados ao sistema aquático. Portanto, os metais podem eventualmente serem liberados na coluna d'água desses ambientes no processo de

degradação de compostos orgânicos complexos, aos quais estejam complexados ou adsorvidos (Zagatto e Bertolotti, 2006).

A bioacumulação de compostos orgânicos em organismos vivos, será maior ou menor dependendo da sua lipofilicidade e baixas taxas de metabolização em algumas espécies leva a bioacumularem mais do que outros. Outras vezes, alguns compostos têm mais de uma etapa de metabolização, como é o caso do p,p'- DDT, onde a primeira etapa de metabolização é mais rápida, sendo seu produto, o p,p'- DDE, o composto comumente encontrado em amostras ambientais. Neste caso, a segunda etapa de metabolização é mais lenta e produz o p,p'-DDD, que é solúvel em água devido à incorporação de um grupo carboxila (Reeve, 1994; D'Amato, 2002).

Processos de biodegradação pelos quais compostos orgânicos são degradados biologicamente, podem ser catalisados através de reações em cadeia, por um grande número de organismos. A oxidação, redução, hidrólise, desalogenação, desalquilação, ruptura de anéis e condensação são alguns deles. Através destas reações, tais substâncias podem ser transformadas em outros compostos, às vezes com maior toxicidade, como o caso da bioconversão do DDT em DDD. No entanto, alguns processos como a condensação e união de moléculas do pesticida com outros compostos orgânicos pode resultar na efetiva desativação do pesticida (Zagatto e Bertolotti, 2006; WHO, 1993).

Os compostos orgânicos gerados antropicamente compreendem uma ampla diversidade de moléculas de diferente tamanho e, ainda, de diferentes grupos funcionais. Esta última propriedade é especialmente importante, pois a reatividade e a toxicidade dos compostos orgânicos estão diretamente relacionadas aos grupos funcionais. Dentre o grupo dos contaminantes orgânicos halogenados estão os

hidrocarbonetos halogenados, utilizados em sistema de refrigeração, solventes e pesticidas. Dentre eles, os solventes clorados diclorometano (CH_2Cl_2), tri e tetracloroetano (ClHC=CCl_2 e $\text{Cl}_2\text{C=CCl}_2$, respectivamente) e 1,1,1-tricloroetano ($\text{Cl}_3\text{C-CH}_3$) estão entre os dez contaminantes orgânicos mais encontrados nas águas subterrâneas (Schwarzenbach *et al.*, 1995; Rossberg *et al.* 2006). Outro grupo de contaminantes orgânicos halogenados são os compostos que apresentam anéis aromáticos, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) (D'Amato *et al.*, 2002).

A complexidade do hábito alimentar dos organismos, pode interferir na biodisponibilidade e bioacumulação dos contaminantes orgânicos e inorgânicos às diversas formas de vida, pois dependem de variáveis encontradas nos diversos compartimentos dos ecossistemas aquáticos, como os aspectos físico-químicos e biológicos, uma vez que estes podem ingerir contaminantes de suas próprias presas, associados aos particulados ou sedimentos. Os estudos toxicocinéticos auxiliam estes estudos, pois se concentram na transferência de espécies químicas de compartimentos externos (água, por exemplo) a fluídos e órgãos incluindo aqueles que constituem os tecidos alvos dependendo de cada tipo de poluente (Spacie *et al.*, 1995).

1.2. Organoclorados

Os inseticidas organoclorados são compostos hidrofóbicos, lipossolúveis e biologicamente estáveis, fatores que determinam sua bioacumulação no tecido adiposo. Também se biomagnificam ao longo das cadeias alimentares, e os fatores de concentração desde a água até os predadores que podem ultrapassar a ordem de 10^7 (Tanabe *et al.*, *apud* Mason, 1991; Brasil, 1997). O DDT é altamente

persistente, e mesmo com as restrições à produção e ao uso de inseticidas organoclorados, devido ao uso atual e anterior encontra-se em concentrações consideradas elevadas o suficiente para causar problemas em espécies sensíveis, dependendo do tempo de exposição (OMS, 1982).

Embora seu uso esteja proibido para determinados fins, ainda estão presentes no ambiente, podendo causar impacto significativo sobre populações, especialmente em aves aquáticas (o subproduto do DDT, o DDE, por exemplo, afeta o metabolismo de cálcio em aves, resultando na redução da espessura das cascas dos ovos, que se quebram mais facilmente), sendo indicado como a principal causa da redução populacional de diversas espécies, muitas delas seriam aves de topo de cadeia alimentar (Carson, 1962; MS, 2009).

A combinação de suas propriedades físico-químicas, tais como alta lipofilicidade (evidenciada pelo elevado coeficiente de partição octanol/água), e lenta eliminação (devido ao seu metabolismo limitado, decorrente de sua estabilidade química), resulta na sua persistência e bioacumulação. Apesar de alguns pesticidas como heptaclor e aldrin serem rapidamente metabolizados nos organismos, seus principais metabólitos – epóxido de heptaclor e dieldrin – são persistentes e tão tóxicos quanto os compostos parentais (Blus, 1995).

O DDT é o mais conhecido dentre os inseticidas do grupo dos organoclorados, sendo considerada uma das substâncias sintéticas mais utilizadas e estudadas no século XX (Menome *et al.*, 2000). As propriedades inseticidas do DDT foram descobertas em 1939 pelo entomologista suíço Paul Muller, o que lhe valeu posteriormente o Prêmio Nobel de Medicina devido ao uso do DDT no combate à malária (OMS, 1982). O DDT foi utilizado na Segunda Guerra Mundial para prevenção de tifo em soldados que o utilizavam na pele para o combate a piolhos.

Posteriormente foi usado na agropecuária, no Brasil e no mundo, dado seu baixo preço e elevada eficiência (Pardi *et al.*, 1993). Foi a descoberta do DDT que revolucionou os conceitos de luta contra malária. Sua eficácia contra formas adultas dos mosquitos e seu prolongado efeito residual fizeram com que no período de 1946-1970 todos os programas de controle se apoiassem quase que totalmente em seu emprego (Rey, 1991).

No Brasil, as primeiras restrições ao uso do DDT se deram em 1971, com a Portaria n° 356/71, (Brasil, 1971) que proibiu a fabricação e comercialização de DDT e do inseticida organoclorado BHC (hexaclorociclobenzeno) para o combate de ectoparasitos em animais domésticos no país (inseticida fitossanitário organoclorado persistente), obrigando os fabricantes a recolherem os produtos, mas isentou os produtos comerciais indicados como larvicidas e repelentes de uso tópico; e com a Portaria n° 357/71, que proibiu em todo o território nacional o uso de inseticida organoclorado em controle de pragas em pastagens (Brasil, 1971).

Em 1985, proibiu-se em todo o território nacional a comercialização, o uso e a distribuição de produtos organoclorados destinados à agropecuária. Mas os inseticidas organoclorados continuaram sendo permitidos em campanhas de saúde pública no combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias (malária e leishmaniose), bem como em uso emergencial na agricultura, a critério do Ministério da agricultura. Também se manteve a permissão do uso de iscas formicidas à base da aldrin e dodecacloro, e do uso de cupinicida à base de aldrin para reflorestamento (Brasil, 1985). Em 1995, foi publicado pela OMS um informe técnico declarando que o DDT pode continuar sendo utilizado no controle dos mosquitos vetores da malária e outras doenças transmitidas por artrópodes.

No Brasil em maio de 2009 o presidente Luiz Inácio Lula da Silva assinou a lei de número 11.936/09, que proíbe a fabricação, importação, exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e o uso de diclorofeniltricloroetano – DDT, no Brasil.

Tanto a Anvisa quanto a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde manifestaram-se favoráveis à aprovação do projeto de lei. O DDT é um agrotóxico altamente persistente no meio ambiente e na cadeia alimentar, além de possuir características carcinogênicas e de alteração endócrina. O DDT teve sua retirada do mercado em duas etapas: em 1985, teve sua autorização cancelada para uso agrícola; e em 1998, foi proibido para uso em campanhas de saúde pública. “A nova medida irá acabar com os produtos estocados de forma obsoleta e tornará definitiva a proibição deste perigoso agrotóxico para todo e qualquer uso no país”. De acordo com a lei assinada pelo presidente, todos os estoques de DDT deverão ser incinerados em um prazo de 30 dias. Além disso, o governo deve realizar, em dois anos, estudo de avaliação do impacto ambiental e sanitário causado pelo uso de DDT, para controle de seus efeitos (ANVISA, 2010).

1.2.1 Propriedades Físico-Químicas do DDT

O termo DDT refere-se ao produto 1,1'(2,2,2-tricloroetilideno)bis(4-clorobenzeno), ou 1,1,1-tricloro-2,2-bis-(*p*-clorofenil)etano (Merck & CO, 1996). O termo também é aplicado a produtos comerciais constituídos principalmente pelo isômero *p,p'* – DDT, com proporções menores de outros análogos. O inseticida DDT é constituído, em geral, pela seguinte formulação: *p,p'* – DDT (77,1%), *o,p'* – DDT (14,9%), *p,p'* DDD (0,3%), *o,p'* – DDD (0,1%) e impurezas (3,5%). Todos os isômeros são substâncias

sólidas, brancas, inodoras e insípidas, com a fórmula empírica $C_{14}H_9Cl_5$ (WHO, 1989; D'Amato *et al.*, 2002).

O ponto de fusão do *p,p'* – DDT é $109\text{ }^\circ\text{C}$, com pressão de vapor $2,53 \times 10^{-5}$ Pa ($1,9 \times 10^{-7}$ mmHg) a $20\text{ }^\circ\text{C}$. Apresenta hidrossolubilidade bastante baixa, na ordem de $1\mu\text{g/L}$, tendo porém elevada lipossolubilidade, com coeficiente da partição octanol/água (K_{ow}) igual a $9,6 \times 10^5$ (Morrinson, 1999).

Ao perder uma molécula de HCL, por degradação biológica ou ambiental, o *p,p'* – DDT forma o metabólito 2,2-bis-*p*-clorofenil-1,1-dicloroetileno, conhecido como DDE. Este composto é ainda mais resistente às degradações que o DDT. Outro metabólito importante formado é o DDD, 2,2-bis-*p*-clorofenil-1,1-dicloroetano. Há ainda outros: DDMU, DDMS, DDNU, DDOH e DDA (OMS, 1982). Este último metabólito é o único que não é lipossolúvel, sendo eliminado pela urina dos seres vivos. O DDE, por ser o mais persistente em organismos vivos, pode servir como indicador de exposição dos seres vivos ao DDT como, por exemplo, peixes de um rio contaminado (D'Amato *et al.*, 2010).

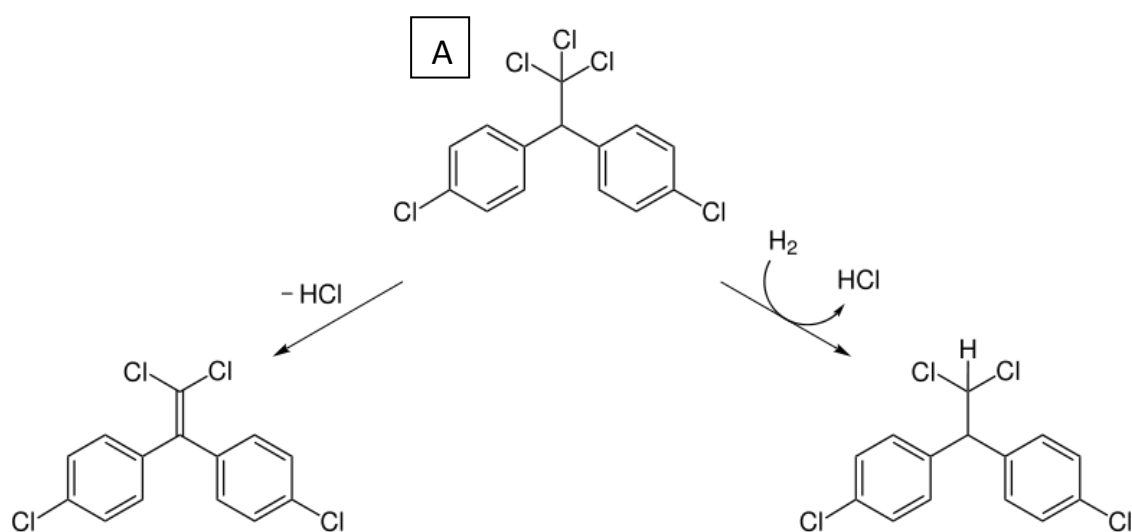


Figura 1 - Degradação do DDT (A), forma DDE por eliminação do HCl (esquerda) e DDD por redução do cloro (direita).

Fonte: Wikipédia, enciclopédia livre.

1.2.2. Toxicidade do DDT

Os organoclorados atuam sobre o sistema nervoso central, resultando em alterações de comportamento, distúrbios sensoriais, do equilíbrio, da atividade da musculatura involuntária e depressão dos centros vitais, particularmente da respiração. As manifestações crônicas consistem em neuropatias periféricas, incluindo paralisias, discrasias sanguíneas diversas que podem até ser consequência de aplasia medular, lesões hepáticas com alterações das enzimas transaminases e fosfatase alcalina, lesões renais e arritmias (Brasil, MS, 1997; D'Amato *et al.*, 2002).

Em estudos realizados em camundongos, foi verificada incidência aumentada de tumores hepáticos, após exposição a altas doses, por longo prazo, embora não tenha se verificado o mesmo para ratos, cães, hamsters ou macacos (Paumgarten, 1997). O DDT é um promotor de tumores, isto é, ele não causa efeitos genéticos que culminam com o surgimento das neoplasias, mas potencializa a divisão das células neoplásicas que já tenham surgido. Também foi demonstrado, a nível celular, inibição das comunicações intercelulares em forma de placa, denominadas junções “gap”, presentes na membrana das células normais. Estas junções não se encontram em células tumorais. Ao perdê-las, as células não são mais inibidas em sua divisão ao entrar em contato com outros tecidos, replicando-se então indefinidamente (De Robertis, 1993).

O DDT é também um potente indutor das enzimas hepáticas do citocromo P 450, que promovem a ativação de outras substâncias carcinogênicas, como a Aflatoxina B₁ e a ciclofosfamida. A presença de DDT potencializa, portanto, os efeitos destes carcinógenos (Paumgarten, 1997). Acreditava-se que o DDT e seus metabólitos não possuíam efeitos endócrinos, mas no final dos anos 80 os estudos

de Bryan *et al.* (1989) sugeriram que o DDT era um mimetizador de estrógenos, isto é, possuía propriedades farmacológicas semelhantes, e então se começou a verificar o efeito hormonal da exposição ao DDT e seus derivados.

Compostos organoclorados podem semelhantemente a hormônios, como o estrógeno, ligar-se a receptores específicos induzindo efeitos estrogênicos. Os hidrocarbonetos clorados, especialmente o *o,p'*-DDT exercem estes efeitos em répteis, aves e mamíferos. Provavelmente tenham um efeito complexo, ao interagir com diferentes receptores de hormônios esteróides, em diferentes níveis, com consequências bioquímicas e fisiológicas ainda desconhecidas (Lundholm, 1988, 1992). Hayes (1948, *apud* D'Amato, 2002), verificou em estudos com *Kassina senegalensis* que o DDT mimetiza corticosterona ou atua como agente estressante, causando um aumento da corticosterona endógena neste anfíbio.

1.2.3. Contaminação ambiental do DDT

Os organoclorados (DDT e metabólitos, BHC, aldrin, heptacloro e outros), estão presentes nas áreas mais remotas da terra. Podem ser transportadas por grandes distâncias através do mundo, retidos no organismo de animais migradores marinhos (Lee e Marsili, 1997) ou por correntes de ar e oceânicas e já foram detectados nos Andes chilenos, em altitudes elevadas (OMS, 1995). Estes poluentes se movem pela atmosfera, a partir de suas fontes em locais quentes do globo, se condensam ao atingirem as regiões mais frias, precipita sobre os solos, vegetações e cursos de água, fenômeno conhecido como destilação global (Wania *et al.*, 1998).

A distribuição do DDT e outras substâncias classificadas como poluentes orgânicos persistentes (POPs) ou contaminantes lipofílicos persistentes, sugerem

que estas substâncias são transportadas através da atmosfera por longas distâncias (Connell, 1999). Os pesticidas aplicados em lavouras, terrenos ou em processos de reflorestamento ligam-se aos sedimentos do solo e sofrem ação de lixiviação e contaminação de águas, volatilização e contaminação do ar ou são absorvidos por microorganismos, vegetais e animais (Rodrigues, 1997). Em geral, os lençóis freáticos apresentam riscos moderados de contaminação (WHO, 1989).

A contaminação da biota pelo DDT e seus metabólitos, ocorre rapidamente devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas. As taxas de acumulação variam entre as espécies, e de acordo com a concentração, condições ambientais e tempo de exposição. Os organismos acumulam estes compostos a partir do meio circundante e/ou pelos alimentos. No meio aquático, a absorção a partir do meio é mais rápida, enquanto que para os animais terrestres, a alimentação, seja carnívora, herbívora ou detritívora, é a via principal (WHO, 1989). O DDT é metabolizado pelos diferentes organismos por diferentes vias. Dos principais metabólitos, DDE é o mais persistente, embora nem todos os organismos o produzam a partir do DDT (WHO, 1989).

Alguns fatores são importantes para se entender os diferentes processos de absorção, metabolização e biotransformação e conseqüentemente a toxicidade destes compostos. Segundo Zagatto e Bertoletti (2006) podem ser divididos em internos e externos. Os internos estão relacionados ao sistema biológico. Assim, influem a espécie, idade, peso, sexo e fatores genéticos, que são fatores constitucionais e condicionais, como o estado nutricional, a temperatura corporal e o estado patológico. Os externos estão relacionados ao xenobiótico, via de introdução e condições ambientais.

A biota aquática é importante reservatório de DDT, metabólitos e outros organoclorados no ambiente, sendo que o processo de biomagnificação através da cadeia alimentar já foi bem documentado, apresentando maiores concentrações nos organismos de nível trófico mais elevado, como nos peixes carnívoros (WHO, 1989). No entanto, ainda existem peixes que não estão em níveis tróficos superiores, mas que poderão atingir altos níveis de contaminação, ao absorverem nutrientes que possuem grande carga de poluentes, por estes se associarem aos sedimentos de fundo (Matsushita, 1994; Bressa, 1997). Matsushita e Souza (1994) mencionam a importância da quantidade de tecido adiposo, a posição da cadeia trófica e o hábito alimentar como determinantes da quantidade de DDT no organismo.

Nas regiões tropicais, a radiação solar e as altas temperaturas podem influenciar favoravelmente na remoção dos organoclorados do ambiente através da alta volatilização e degradação. A alta produtividade biológica também pode contribuir baixando as concentrações no ambiente, por resultar em um efeito diluente, ao distribuir o xenobiótico pela grande quantidade de matéria orgânica presente. Ainda há a necessidade de mais estudos sobre o comportamento do DDT e outros organoclorados nos trópicos, a fim de compreender sua distribuição global (Kumblad *et al.*, 2001; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002, 2005).

1.3. Metais

Os metais podem estar presentes nos ecossistemas aquáticos de várias maneiras dependendo das formas físico-químicas encontradas. Podem estar na forma livre e dissolvida (metálico mono e polivalentes-hidratados); complexada, fraca ou fortemente, pela matéria orgânica dissolvida (geopolímero, ácidos húmicos e

fúlvicos); complexos solúveis, na fração de lipídios presentes na água, ou ainda, adsorvidos nas partículas coloidais e nos particulados orgânicos e inorgânicos suspensos na água, especialmente nas argilas, que são partículas finamente divididas e com alta reatividade e insolubilizada, usualmente como sulfetos e carbonatos (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Devido a estas características diversificadas, torna-se quase impossível a discriminação de espécies individuais pelas várias metodologias físico-químicas usualmente empregadas sendo possível apenas a identificação de grupos de espécies com propriedades físicas, químicas e biológicas similares, o que já constitui um ponto útil na identificação e quantificação dos efeitos deletérios dessas espécies químicas. Por isso, a grande importância dos conhecimentos da especiação ou partição dessas espécies para a avaliação ecotoxicológica em ecossistemas aquáticos (Batley, 1989). Sendo assim, a biodisponibilidade e a consequente toxicidade dos metais pode ser considerada de extrema complexidade.

Os metais geralmente são definidos por suas propriedades químicas, particularmente por sua afinidade com ligantes específicos. Esses íons metálicos têm alta afinidade por moléculas contendo átomos de nitrogênio e enxofre, ligando-se com relativa facilidade a proteínas celulares. Assim, sua toxicidade se deve principalmente à sua capacidade de intervir em relações enzimáticas (bloqueando, deslocando o íon essencial ou modificando a conformação ativa de biomoléculas como proteínas) e também à sua baixa mobilidade, em virtude das pequenas dimensões e das cargas duplas e triplas. Essa fraca mobilidade faz com que se acumulem, modificando profundamente o metabolismo do organismo (Connell e Miller, 1984).

Alguns metais podem se ligar covalentemente a átomos de carbono em um grupo orgânico, como o grupo metil ($-\text{CH}_3$), originando os chamados compostos organometálicos. Os compostos organometálicos neutros tendem a ser lipossolúvel, o que facilita seu movimento através das membranas biológicas, permitindo sua distribuição. O processo de metilação ocorre naturalmente e é responsável por grande parte da mobilidade ambiental de alguns metais. Entre os elementos para os quais são encontradas formas metiladas no ambiente destacam-se o mercúrio e o chumbo (Zagatto e Bertoletti, 2006).

O mercúrio, que será objeto neste estudo, assim como outros metais como o chumbo e o cádmio, não tem função biológica conhecida e seus efeitos sobre os elementos da biota normalmente são deletérios. Mesmo os metais que possuem função biológica e são considerados essenciais como, zinco, ferro, manganês, cobre, cobalto e molibidênio, quando em concentração mais elevadas podem causar toxicidade aos organismos (Esteves, 1988). Por esta razão este trabalho visa gerar informações sobre estas interações, contribuindo com a previsão de efeitos sobre as exposições crônicas no ambiente aquático. Estudos sobre a mobilidade de metais e outros compostos como DDT em reservatórios são escassos e necessitam de melhores esclarecimentos.

1.3.1 Mercúrio

No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, o crescimento constante da atividade econômica e industrial tem aumentado também o uso do mercúrio e de seus compostos e, por extensão, a contaminação do ambiente. Exemplo preocupante dessa situação é o emprego intenso do mercúrio metálico no

garimpo do ouro em vários estados brasileiros, especialmente na Amazônia legal. Nos anos 80, o garimpo de ouro na região norte do Brasil, pode ter liberado 3 mil toneladas de mercúrio para o ambiente, gerando graves problemas de contaminação (Olivero *et al.*, 1997).

Naturalmente proveniente da lixiviação das rochas contendo mercúrio ou da emissão de gases em áreas vulcânicas, as concentrações desse metal na atmosfera, hidrosfera, solo e biota têm aumentado muito em função das atividades antrópicas (Mason, 1991). Tais atividades englobam a produção de cloro e soda cáustica por eletrólise do cloreto de sódio, empregando células de mercúrio como catodo, mineração, produção de compostos organomercuriais com ação bactericida e fungicida utilizados na agricultura e na indústria de tintas; síntese de reagentes, formulações dentárias, soluções desinfetantes e esterilizantes contendo mercúrio (Paasivirta, 1991).

O rápido aumento da produção e do uso do mercúrio, deixou de representar um risco apenas para o trabalhador das minas de onde é obtido e das indústrias onde é empregado e passou a se constituir em um risco no lar, na escola, na cidade, no alimento e para vida animal e vegetal. Muito do mercúrio descartado no ambiente pela atividade antrópica certamente está incorporado aos ciclos geoquímicos e às cadeias tróficas, aumentando suas concentrações nos ecossistemas e passando a representar perigo para vegetais, animais e o próprio homem. Portanto, é necessário conhecimentos do nível de risco a que estamos expostos para, então, estarmos atentos a todas as atividades emissoras de mercúrio no ambiente (Câmara *et al.*, 1998).

O homem não é o único responsável pelas emissões de mercúrio na Amazônia. Em avaliações de características climáticas há 30.000 anos foi possível

associar o clima mais seco predominante na Amazônia neste período, a emissões mais importantes de mercúrio (Lacerda e Salomons, 1997). Estes autores, sugerem que a presença mais intensa de incêndios florestais estaria lançando o mercúrio presente nos solos, na biomassa vegetal e na atmosfera, aumentando assim as concentrações do metal em ambientes menos sujeitos à queima.

Segundo Roulet & Loucotte (1996; 1998), as concentrações bastante elevadas de mercúrio encontradas nos solos amazônicos formaria algum tipo de complexo com o ferro. A natureza destes complexos é ainda uma incógnita, já que a relação entre estes dois metais foi detectada a partir de coeficientes de correlação feitos em perfis de solo. Segundo estes autores esta associação seria amplamente verificável em toda a Amazônia e assim o mercúrio teria uma origem natural e não antropogênica como se imaginava. Nestes mesmos estudos, foram realizados balanços das emissões oriundas da retirada de ouro na Amazônia e os autores chegaram à conclusão de que seriam necessárias dez vezes mais garimpo para justificar as quantidades observadas, concluindo assim, que cerca 90% do mercúrio presente nos solos seriam naturais (Roulet e Loucotte, 1998).

Desta forma e independente da origem, uma considerável parcela do mercúrio acaba atingindo os sistemas aquáticos. Parte dela retorna à atmosfera, sendo importante fonte de mercúrio atmosférico (WHO, 1976). Líquido à temperatura ambiente, o mercúrio pode ocorrer em três estados de oxidação: mercúrio elementar (Hg^0), íon mercurioso (Hg_2^{2+}) e íon mercúrico (Hg^{2+}). Mesmo em níveis baixíssimos normalmente encontrados nos ecossistemas aquáticos torna-se problemático quando é convertido, via metilação bacteriana, em suas formas orgânicas: uma solúvel (monometilmercúrio) e outra solúvel e volátil, podendo retornar à atmosfera (dimetilmercúrio). Essas reações podem ser estimuladas sob condições ácidas ou

pelo aumento do substrato orgânico em reservatórios recentemente inundados (WHO, 1976).

O mercúrio torna-se bastante lipossolúvel, quando metilado, sendo absorvido por uma variedade de organismos aquáticos, pois, apesar do predomínio da forma inorgânica divalente na água, as formas metiladas prevalecem nos tecidos da biota aquática e alguns trabalhos mostraram que cerca de 90% do mercúrio retido em peixes está sob a forma de metilmercúrio, gerando altos valores de fatores de bioacumulação (FBC). Além disso, esse elemento pode se biomagnificar ao longo da cadeia alimentar, e devido à persistência biológica e baixa excreção pelos organismos (Wren *et al.*, 1995).

A alquilação, isto é, transformação do metil ou do dimetilmercúrio com interconversões correspondentes, é de fundamental importância para a avaliação da contaminação por mercúrio. Nas camadas superiores do sedimento, o mercúrio é metilado por bactérias oxiredutoras a metilmercúrio e depois a dimetilmercúrio o que eleva sua capacidade para atravessar membranas biológicas. Nas camadas inferiores do sedimento o mercúrio é inativo, principalmente sob a forma de sulfeto. Já o metilmercúrio irá se integrar nas cadeias tróficas ou, se as condições de pH forem apropriadas, dará origem ao dimetilmercúrio, o qual por ser insolúvel e volátil que passará à atmosfera podendo ser recolhido pelas águas da chuva. Pela ação das chuvas ácidas, o dimetilmercúrio pode se transformar no metilmercúrio, retornando ao meio aquático e, assim, completando o ciclo (Tena, 1981; Zagatto e Bertoletti, 2006).

Próximo à interface ar-água a concentração de Hg^0 é alta, já a concentração total de mercúrio inorgânico e metilmercúrio é maior próximo ao sedimento (Morel *et al.*, 1998). A presença simultânea de Hg^0 e Hg^{2+} em água aeróbica e anaeróbica leva

a questão da possível geração do íon mercurioso, que só é estável em água sob a forma do dímero Hg_2^{2+} . O Hg^{2+} pode se complexar com a hidroxila, dependendo do pH e da concentração de cloreto. Também há a possibilidade de o mercúrio, na superfície da água, se complexar com as formas de enxofre (S^- e HS^-) e, numa proporção desconhecida, se ligar a ácidos húmicos. Por meio dessa ligação com carbono orgânico dissolvido, o mercúrio pode ser mobilizado e transportado (Morel *et al.*, 1998). Esta interconversão, metilação/desmetilação, pode estabelecer um sistema ecologicamente dinâmico de reações competitivas que produzirá uma concentração equilibrada entre vários metais e metalóides e suas formas metiladas no ambiente. Contudo, a introdução de quantidades adicionais pelas atividades antropogênicas pode romper este equilíbrio (Queiroz, 1995).

Segundo Azevedo (2003) os níveis de mercúrio na biota aquática variam entre as espécies de uma mesma localidade e para uma mesma espécie em diferentes localidades. A absorção do mercúrio presente na água por organismos aquáticos é influenciada pela concentração deste elemento, pela taxa metabólica e pela eficiência de absorção (disponibilidade), determinada pelas características do ambiente aquático. A biodisponibilidade é o fator menos entendido e talvez a condição mais importante que governa a absorção do mercúrio pelos peixes em condições naturais.

Os peixes absorvem o Hg com facilidade e o acumulam em seus tecidos, principalmente na forma de metilmercúrio. Poucas são as evidências de que peixes metilem ou desmetilem o mercúrio. A eliminação do metilmercúrio dos organismos aquáticos e de peixes é lenta, podendo levar meses ou anos. A perda de Hg inorgânico é mais rápida, mas a maior parte é retida como metilmercúrio (WHO,

1989), o qual, em concentrações de 0,1-0,5 mg/kg potencialmente, pode levar a morte em peixes (UNEP, 2002).

As concentrações de metilmercúrio encontradas nos peixes demonstram que o processo de desmetilação natural não consegue degradar o CH_3Hg^+ na mesma velocidade que ele é produzido nos sedimentos, na coluna d'água ou no intestino dos peixes e assimilado por estes (D'itri, 1990, *apud* Queiroz, 1995). O tamanho e a idade do peixe também têm marcada influência: os peixes maiores, em geral, apresentam uma maior concentração do metilmercúrio que os menores da mesma espécie, em um mesmo ambiente. O mercúrio se acumula nos peixes tanto pelo alimento contaminado (cadeia trófica), quanto pela água contaminada através das brânquias (Baldi, 1997).

A temperatura pode influenciar na toxicidade do mercúrio, sendo que esta influencia é menos acentuada em sistemas estáticos, como lagos, do que em rios que apresentam fluxos constantes de água (Boening, 2000). Muitos fatores no ambiente aquático influenciam a metilação do mercúrio e, conseqüentemente, sua biomagnificação. A bioacumulação e a biomagnificação representam processos extremamente complexos e envolvem a biogeoquímica e as interações ecológicas. Como resultado, o grau de biomagnificação de mercúrio no peixe é difícil de ser prognosticado, embora a acumulação/magnificação possa ser facilmente observada. Deste modo, o mercúrio é transferido e concentrado através de vários níveis da cadeia alimentar. A cadeia alimentar aquática tende a ter mais níveis tróficos do que as terrestres e, conseqüentemente, a biomagnificação aquática alcança níveis elevados (UNEP, 2002).

O metil e etilmercúrio são os compostos de mercúrio que têm provocado o maior número de intoxicações em diferentes populações, em virtude do consumo de

pescados e mariscos contaminados por metilmercúrio ou ainda de pão preparado com sementes tratadas com fungicidas mercuriais. A literatura descreve vários episódios de intoxicações coletivas (Ramade, 1977; Mailman, 1980; Dix, 1981; Ottaway, 1982; Goyer, 1986).

O metilmercúrio tem uma meia vida no organismo humano de cerca de 70 dias (Goyer, 1986) e, em peixes é de 1000 dias (NRCC, 1979). O mercúrio é eliminado do organismo humano pelos rins, fígado (via bile), mucosa intestinal, glândulas sudoríparas e salivares, pele e leite (Swift, 1997).

1.3.2 Toxicodinâmica do mercúrio

Como já descrito, o mercúrio existe sob vários estados físicos e combinações químicas, propriedades que trazem problemas especiais para os que se ocupam da avaliação dos possíveis riscos para a saúde pública. Todas as formas físicas e químicas deste elemento apresentam toxicidade, não sendo conhecida nenhuma função fisiológica do mercúrio (Oehme, 1978).

As substâncias manifestam sua toxicidade depois de ser absorvida e distribuída pelo organismo. A toxicodinâmica busca compreender, sob a luz bioquímica e molecular, os mecanismos das ações tóxicas de um xenobionte, ou seja, esta substância exercerá sua ação tóxica num alvo celular determinado, deflagrando uma cadeia de efeitos que resultará na quebra da homeostase do organismo (Azevedo, 2003).

O mercúrio e seus compostos, dependendo da concentração atingida no tecido animal, podem desnaturar proteínas, inativar enzimas e alterar a atividade celular (Koropatnick e Zalups, 1997). Podem ainda, modificar as membranas

celulares com prejuízo de suas funções, causando a morte celular e a destruição de tecidos com os quais venham a entrar em contato. Evidências apontam que os danos do mercúrio estejam associados com a membrana da célula, mais especificamente com danos às suas proteínas (Ottaway, 1982) ou talvez, os fosfolípidos (Barfield e Bevan, 1985; Filipak Neto, 2008), o que é baseado nos efeitos observados nos rins (Kozma *et al.*, 1996) e cérebro, órgãos nos quais é essencial a função das membranas. Além disto, o fato de muitas bactérias e fungos morrerem em contato com o mercúrio, essa atividade bactericida não específica tem sido relacionada a danos à membrana celular (Daniels *et al.*, 1996; Ottaway, 1982). Por outro lado, há sinais de que o sítio-alvo seja representado por organelas subcelulares (Sharma, 1987). O mercúrio pode se unir a uma variedade de compartimentos citoplasmáticos e de sistemas enzimáticos, incluindo microssomos, lisossomos e mitocôndrias, causando desde lesões inespecíficas até a morte celular (Goyer, 1986).

O mercúrio (assim como o arsênio, chumbo, manganês e o tálio) liga-se aos grupos sulfidrila, SH (ou tiol, ou mercaptana – de *mercurium captans*) de proteínas e de substâncias de baixo peso molecular (como coenzima A, cisteína, glutatona, lipoato e tioglicolato), com as quais tem forte afinidade (Hughes, 1957; Vallee & Ulmer, 1972). Essa interação entre o mercúrio e o enxofre se estabelece facilmente por meio de ligação covalente, o que explica quase todas as propriedades biológicas do metal (Klaasen, 1986). Nas sulfidrilas, o mercúrio bivalente substitui o átomo de hidrogênio, formando captídeos do tipo X-Hg-S-R, Hg (SR)₂ e R'S-Hg-SR, em que X é um agrupamento eletronegativo e R e R' são proteínas.

Segundo Rothstein (1970, *apud* Halbach, 1985), as diferenças na toxicidade dos compostos de mercúrio podem resultar das taxas modificadas de formação de

mercaptídeos como resultado de interações entre os grupos funcionais dos compostos mercuriais e o ambiente molecular dos grupos sulfidrilas das proteínas. Portanto o mercúrio e os compostos mercuriais, mesmo em baixas concentrações, são capazes de inativar as enzimas sulfidriladas, interferindo no metabolismo e nas funções celulares, como, por exemplo, ao bloquear o transporte de glicose e ao alterar a permeabilidade da membrana (Hayes, 1983, Reyes-Vivas *et al.*, 1996). Além de se combinar com o grupo tiólico, o mercúrio também pode fazê-lo com outros grupamentos químicos de importância fisiológica, na seguinte ordem decrescente de afinidade: sulfidríla (SH) > amida (CONH₂) > amina (NH₂) > carboxila (COOH) > fosfato (PO₄) (Hayes, 1983), e essas interações resultam em alterações da atividade enzimática e da estrutura de proteínas e de membranas (Norset, 1967 *apud* Azevedo, 2003).

1.4. Caracterização da espécie estudada

O peixe *Cichla monoculus* (Tucunaré) pertence à família Cichlidae, podendo ser encontrado com outros nomes populares dependendo da região do país (Tucunaré-açú, Tucunaré-paca, Tucunaré-repimínia, Tucunaré-pitanga, Tucunaré-vermelho).

Esta espécie distribui-se geograficamente nas Bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins, mas foi introduzido nos reservatórios da bacia do Prata, em algumas áreas do Pantanal, no rio São Francisco e nos açudes do Nordeste. São peixes de escamas apresentando um corpo alongado e um pouco comprimido. Existem pelo menos 14 espécies de tucunarés na Amazônia, sendo cinco descritas: *Cichla ocellaris*, *C. temensis*, *C. monoculus*, *C. orinocensis* e *C. intermedia*. O

tamanho (exemplares adultos podem medir 30 cm ou mais de 1m de comprimento total), o colorido (pode ser amarelado, esverdeado, avermelhado, azulado ou quase preto), e a forma e número de manchas (podem ser grandes, pretas e verticais ou pintas brancas distribuídas regularmente pelo corpo e nadadeiras) variam bastante de espécie para espécie. Todos os tucunarés apresentam uma mancha redonda (ocelo) no pedúnculo caudal. Não são espécies migratórias, vivem em lagos/lagoas (entram na mata inundada durante a cheia) e na boca e beira dos rios. Formam casais e se reproduzem em ambientes lênticos, onde constroem ninhos e cuidam da prole. Têm hábitos diurnos. Alimentam-se principalmente de peixes e camarões. São as únicas espécies de peixes da Amazônia que perseguem a presa, ou seja, após iniciar o ataque, não desistem até conseguir capturá-las, o que os torna um dos peixes usados na pesca esportiva no Brasil. São importantes comercialmente (Nascimento, 2001; Santos *et al.*, 2001).



Figura 2 : Exemplar *Cichla monoculus* (Spix & Agassiz, 1831), Cichlidae (Tucunaré).
Fonte:(Cimon_u0.jpg, por IBAMA)

- A problemática das Hidrelétricas

A conversão de um sistema de água corrente (lótico) para um de água parada (léntico), inevitavelmente, envolve a perda de muitas espécies de peixes e outros organismos, e aumentos relativos na abundância de outros. Isto é, especialmente verdade quando, como no caso de um reservatório como o Samuel (Figura 3) água ao fundo do reservatório torna-se anóxica durante uma boa parte do ano (Philip, 2005). A montante do reservatório de Samuel a interrupção da migração anual de peixe (“piracema”), como esperado, alterará a composição de espécies que habitam o rio. Antes de fechar a barragem, foram colecionadas 86 espécies de peixe na área (Rosa *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2001).

Outros fatores estiveram envolvidos na criação do reservatório de Samuel (Figura 3) e são comuns na construção da maioria dos reservatórios: a) estresse nas árvores que se encontram nas margens do reservatório (visível em imagens de satélite LANDSAT), onde as falsas cores reproduzidas nas imagens da área ao redor do reservatório indicam uma faixa de vegetação que não é nem a floresta saudável (longe do reservatório) nem as árvores mortas no reservatório propriamente dito; b) emissões de gases de efeito estufa representam uma preocupação importante com a construção de represas hidrelétricas em áreas de floresta tropical; c) decomposição de biomassa acima da água e o metano (CH₄) que é produzido quando decomposição acontece sob condições anóxicas no fundo do reservatório; d) o aspecto social devido ao reassentamento das populações; e) formação de criadouros para vetores de doenças, tais como o mosquitos anofelinos

que transmitem a malária (Ellis *et al.*, 1988); f) salvamento da fauna, enquanto o reservatório está enchendo, dentro outros (Brasil, Eletronorte, 2003).

Um dos principais impactos de represas hidrelétricas na Amazônia é a liberação de mercúrio (Hg) do solo na sua forma tóxica (metilmercúrio). Embora a garimpagem do ouro não seja um problema na bacia hidrográfica de Samuel, pois, o rio Jamari não foi afetado diretamente pela mineração. As condições anóxicas no fundo do reservatório fornecem o ambiente propício para metilação de mercúrio que aumenta em concentração por, aproximadamente, um fator de dez vezes com cada elo na cadeia alimentar, desde plâncton até peixes e, por último, nas pessoas que comem os peixes (Philip, 2005).

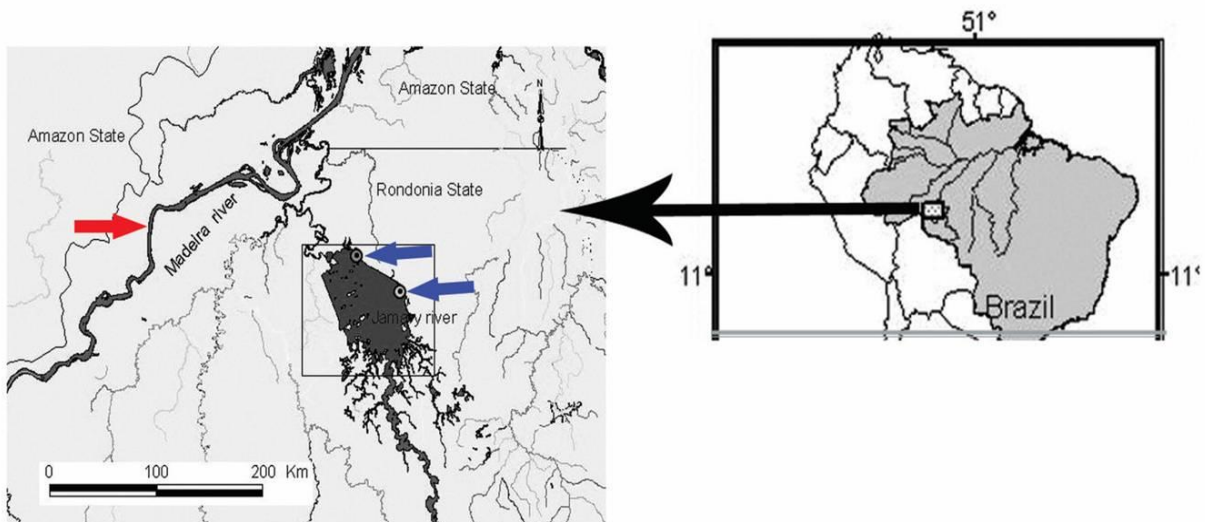


Figura 3 – Mapa da bacia do Jamari. Flecha vermelha, rio Madeira, impactado pela mineração. As flechas azuis, rio Jamari, pontos de coleta (08°44'59"S e 63°26'05"W; 08°51'47"S e 63°17'35"W). fonte: Nascimento, 2006, adaptado.

A concentração de mercúrio parece seguir um padrão de aumentar durante vários anos, depois seguido por uma diminuição, mas diferenças entre reservatórios e o número limitado de medidas disponíveis impedem conclusões definitivas. Em Samuel, as únicas medidas disponíveis foram feitas em 1991 (dois anos depois de encher o reservatório), e indicaram uma concentração de mercúrio total de 0,33 mg/kg de peso fresco de peixe em tucunaré (*Cichla ocellaris* e *C. temensis*) (Malm *et al.*, 1995).

Comparações entre estudos e reservatórios são complicadas pelo fato de não haver disponíveis dados de concentração de mercúrio em uma série de tempo que permita uma comparação entre espécies de peixes (como o tucunaré, por exemplo) comuns aos diversos reservatórios contruídos na Amazônia. Uma elevação, seguida de queda na contaminação por mercúrio, semelhante à de Balbina, teria acontecido em Samuel, mas uma série temporal de dados para Samuel não existe. Outros reservatórios também demonstraram a mesma tendência (Weisser, 2001; Feng *et al.*, 2009). Dado que não se confirmam com o nosso trabalho no reservatório de Samuel. Outro aspecto seria a falta de dados sobre o DDT dentro de reservatórios.

Na Amazônia brasileira, 79 barragens estão planejadas para serem construídas, o que inundaria, de forma direta, aproximadamente 3% da floresta amazônica brasileira (Philip, 2005; Brasil, Eletrobrás, 1987, 2003; Fearnside 1995). Decisões sobre projetos hidrelétricos futuros desencadeiam uma seqüência de eventos, com impactos que ultrapassam as fronteiras imediatas das barragens e dos reservatórios. A construção de barragens hidrelétricas é uma das atividades mais controversas que afetam o caminho de desenvolvimento nos países tropicais e estas obras são grande causa de problemas ambientais e sociais (Philip, 2005).

A energia hidrelétrica gerada em reservatórios representa para países como a China, por exemplo, uma alternativa sustentável, uma vez que a demanda de eletricidade deste país, devido ao crescimento rápido na indústria, é atendida pela queima de carvão (Brown *et al.*, 2008). Portanto, apesar dos impactos que os reservatórios possam causar não se pode esquecer que os reservatórios são criados também por diversos fatores que podem beneficiar as populações, uma vez que são importantes fontes de energia, contribuem no controle da produção de alimentos, irrigações, produção de pescados e até mesmo a recreação humana (St. Louis *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2009).

Neste trabalho procuramos contribuir com dados que possam ajudar a compreender a dinâmica do mercúrio e do DDT dentro do reservatório, bem como determinar aspectos relativos à integridade dos órgãos escolhidos para análises. E ainda, determinar se estes indivíduos estariam em risco de sobrevivência e se representam um perigo para as populações que se alimentam de peixes na região.

- Justificativa

A toxicidade do DDT e mercúrio em ecossistema aquático tem sido amplamente estudada e divulgada. Tais estudos concentram seus esforços nos efeitos em organismos expostos resultante de doses e concentrações administradas sob diversas condições experimentais. No entanto, estes dados se referem mais a estudos laboratoriais onde ocorrem testes de doses e concentrações que muitas vezes não apresentam dados realísticos com a situação em áreas afetadas (Mela *et al.*, 2007). Mais recentemente nosso laboratório tem gerado dados referentes a efeitos associados à exposição trófica e em doses bastante realísticas tanto *in vivo* como *in vitro* com o intuito de avaliar melhor o efeito destes poluentes no funcionamento celular (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Filipak Neto *et al.*; 2008; Bussularo *et al.*, 2010). Por outro lado, as investigações da toxicidade do mercúrio e do DDT sobre a vida aquática e seus danos em níveis mais complexos de organização biológica (populações, comunidades e ecossistema) ainda não são bem compreendidos, principalmente em ambientes tropicais. A utilização de técnicas de análises químicas, bioquímicas e morfológicas nas espécies de peixe da Amazônia, *Cichla monoculus* (Tucunaré), possibilitará uma avaliação mais minuciosa dos efeitos do DDT e do mercúrio presentes nos tecidos após exposição crônica em ambiente natural, dentro do reservatório de Samuel, no rio Jamari, um tributário do Rio Madeira. Por outro lado, os estudos em laboratório de vários biomarcadores no fígado, brânquias e rim anterior destas espécies, além de gerar dados inéditos nos permitirá compreender melhor os mecanismos de toxicidade envolvidos. São poucos os dados relatando os efeitos destes poluentes após estudos *in situ* (exposição crônica) para espécies da ictiofauna brasileira, o que nos “obriga” de certa forma a

utilizar espécies exóticas, deixando de conhecer o real significado dos efeitos para as espécies nativas brasileiras.

2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, F. A.; NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. A. M. Mécúrio. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**, cap. 11. São Paulo, Ed. Atheneu, 2003.

BALDI, F. Microbial transformation of mercury species and their importance in the biogeochemical cycle of mercury. **Met. Ions Biol. Syst.**, v. 34, p. 213-257, 1997.

BARFIELD, K. D.; BEVAN, D. R. Fusione f phospholipidic vesicles induced by Zn²⁺, Cd²⁺ and Hg²⁺. **Bioch. Biophys. Res. Communic.**, v. 128, n. 1, p. 389-395, 1985.

BATLEY, G.E. (ed.). **Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems**. CRC Pres, Inc. Boca Raton, FI, USA, 1989.

BLUS, L. J. **Organochlorine Pesticides. In. Handbook of Ecotoxicology**. Eds: HOFFMANN, D.J.; RATTNER, B. A.; BURTON JR, G.A.; CAIRNS Jr, J. pp. 275-300, 1995.

BOENING, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, p. 1335-1351, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 356, **Diário of. União**, Brasília, 15 out., seq. 1, p. 8318, 1971.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 329, **Diário of. União**, Brasília, 3 set., seq. 1, p. 12941, 1985.

BRAZIL, ELETROBRÁS. Plano 2010: **Relatório Geral. Plano Brazil's Samuel Dam 15 Nacional de Energia Elétrica 1987/2010** (Dezembro de 1987). Centrais Elétricas do Brasil (ELETROBRÁS), Brasília, DF, Brazil, 269 p., 1987.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância Sanitária. Departamento Técnico Normativo. Divisão do Meio Ambiente e Ecologia Humana. Organização de Saúde: **Manual de Vigilância da Saúde de Populações** Exportas a Agrotóxicos, Brasília, 1997.

BRAZIL, ELETRONORTE. **Usina Hidrelétrica de Samuel**. <http://www.eln.gov.br/meiosaml.htm>. Centrais Elétricas do Norte do Brasil S.A. (ELETRONORTE), Brasília, DF, Brazil, 2003.

BRAYAN, T.E.; GILDERSLEEVE, R.P.; WIARD, R.P.; **Teratology**. 396, 525, 1989.

BRESSA, G.; SISTI, E.; CIMA, F. PCBs and organochlorinated pesticides in eel (*AnpizZa anguilla* L.) from the PO Delta. **Mar. Chem.**, 58, 261, 1997.

BROWN P.H; MAGEE, D.; XU, Y. Socioeconomic vulnerability in China's hydropower development. **China Econ. Ver.**, 19, 614-627, 2008.

BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. **Toxicol. in Vitro**, 24, 1491–1497, 2010.

CÂMARA, V. M.; SILVA, ^a P.; CANCIO, J. A. Notas para a constituição de um programa de vigilância ambiental dos riscos e efeitos da exposição do mercúrio metálico em áreas de produção de ouro. **IESUS**, VII, n. 2, p. 35-44, 1998.

CARSON, R. **Silent Spring**, Houghton Mifflin Company: New York, 1962

CONNELL, D. W.; MILLER, G.J.; MORTIMER, M.R.; SHAW, G.R.; ANDERSON, S. M.; *Crit. Rev. Environ. Sci. Tecnol.*, 29, 47, 1999.

CONNELL, D. W. & MILLER, G. J. **Chemistry and Ecotoxicology of Pollution**, John Willey & Sons. 444p, 1984.

DANIELS, M. J.; CHAUMONT, F.; MIRKOV, T. E.; CHRISPEELS, M. J. Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. **Plant Cell.**, v.8, n.4,p. 587-599, 1996.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT (Diclo Difenil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental – Uma Revisão. **Quim. Nova**, v..25, n.6, 995-1002, 2002.

De ROBERTIS, E.D.P.; De ROBERTIS, E.M.F. **Bases da Biologia Celular e Molecular**, 2^o ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1993.

DIX, H. M. **Environmental Pollution** (*atmosphere, land. Water and noise*). Chichester, New York, Brisbane, Toronto: John Wiley e Sons, p. 173-175.1981.

ELLIS, W. S.; ALLARD, W. A.; MCINTYRE, L. Rondônia's settlers invade Brazil's imperiled rain forest. **National Geographic**, December 1988:722–799, 1988.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. FINEP, 575p., 1988.

FEARNSIDE, P. M. Deforestation and international economic development projects in Brazilian Amazonia. **Conserv. Biol.**, 1:214 –221,1987a.

FENG, X.; JIANG, H.; QIU, G.; YAN H.; LI, G.; LI, Z. Geochemical processes of mercury in Wujiangdu and Dongfeng reservoirs,Guizhou, China. **Environ. Pollut.**, 157, 2970–2984, 2009.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; NAKAO, L.S.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytesfrom *Hoplias malabaricus*. **Toxicol. in Vitro**, 22, 1705–1713, 2008.

GOYER R. A. Toxic effects of metals. In: KIAASEN, C. D.; AMDUR M. O.; DOULL, J. (Eds.). **Casarett and Doull's toxicology** – the basic science of posions. 3. ed. New York : Macmillan Publication. Co., p. 605-609., 1986.

HALBACH, S. The octanol/water distribution of mercury compounds. **Arch. Toxicol.**, v. 57, n. 2, p. 139-141, 1985.

HALL, B.D.; MANOLOPOULOS, H.; HURLEY, J.P.; SCHAUER, J.J.; ST. LOUIS, V.L.; KENSKI, D.; GRAYDON, J.; BABIARZ, C.L.; CLECKNER, L.B.; KEELER, G.J. Methyl and total mercury in precipitation in the Great Lakes region. **Atmos. Environ.**, 39, 7557-7569, 2005.

HAYES, J. A. Metal toxicity. In: MOMBURGUER, F.; HAYES, J. A.; PELIKAN, E. W. (Eds.). **A guide to general toxicology**. New York: Karger. p. 232-233, 1983.

HUGHES, W. L. A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. **Annals New York Academy Sciences**, v. 65, p. 454-460, 1957.

KLAASEN, C. D. Los metales pesados y sus antagonistas. In.: GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; RALL, T W.; MURAD, F. **Las Bases Farmacológicas de La Terapêutica**. 7. ed. (trad.) Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, p. 1525-1528, 1986.

KOROPATNICK, J.; ZAPUPS, R. K. Effect of non-toxic mercury, zinc or cadmium pretreatment on the capacity of human monocytes to undergo lipopolysaccharide-induced activation. **Br J. Pharmacol.** , v.120, n. 5, p. 797-806,1997.

KOZMA, L.; LENKEY, A.; VARGA, E.; GOMBA, S. Induction of rennin release from isolated glomeruli by inorganic mercury(II). **Toxicol. Lett.**, v. 85, n. 1, p. 49-54, 1996.

KUMBLAD, L.; OLSSONM, A.; KOUTNY, V.; BERG, H. Distribution of DDT residues in fish from the Songkhla Lake, Thailand. **Environ. Pollut.**, 112,193-200, 2001.

LACERDA, L.D. & SALOMONS, W. Mercury from Gold and Silver Mining: A Chemical time bomb. Springer verlag, Berlim. **Ciência Hoje**, 23-35,1997.

LEE, J.S.; TANABE, S.; TAKEMOTO, N.; KUBODERA, T. Organochlorine Residues in Deep-Sea Organisms from Suruga Bay, Japan. **Mar. Pollut. Bull.**, 34,4, 250-258, 1997.

LUNDHOLM, C.E. The effects of DDE, PCB and chlordane on the binding of progesterone to its cytoplasmic receptor in the eggshell gland mucosa of birds and the endometrium of mammalian uterus. **Comp. Biochem. Physiol.**, Part C: Comparative Pharmacology, Volume 89, Issue 2, p.361-368, 1988.

LUNDHOLM, C.E. Progesterone stimulates prostaglandin synthesis in eggshell gland mucosa of estrogen-prime chickens **Comp. Biochem. Physiol.** Part B: Comparative Biochemistry, v.103, Issue1, p.217-220,1992.

MALM, O.; CASTRO, M. B.; BASTOS, W. R; BRANCHES, F. J. P.; GUIMARÃES, J. R.D.; ZUFFO, C. E. AND PFEIFFER, W. C. An assessment of mercury pollution in different goldmining areas, Amazon Brazil. **Sci. Total Environ.**, 175:127-140, 1995.

MAILMAN, R.B. Heavy metals In: GUTHRIE, F.E.; PERRY, J. J. (Eds.). **Introduction to environmental toxicology**. New York: Oxford, Elsevier, North Holland, Inc., p. 37-39.1980.

MASON, C. F.1991. **Biology of freshwater pollution**. 2nd Ed. John Willey and Sons, 351p.

MATSUSHITA, M.; DE SOUZA, N.E.; **Arquivos de biologia e tecnologia**, 37, 637, 1994.

MASON, C. F. **Biology of freshwater pollution**. 2nd Edition. John Willey and Sons, 351 p. 1991.

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*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 68, 426-435, 2007.

MENOME, M. L.; De MORENO, J.E.A.; MORENO, V.J.; LANFRANCHI, A.L.; METCALFE, L.; METCALFE, C.D. **Arch Environ. Contam. Toxicol**, 18, 202, 2000.

MOREL, François M. M.; KRAEPIEL; ANNE, M. L. **The chemical cycle and bioaccumulation of mercury**. Disponível em: <http://www.civil.nwu.edu/ehe/Courses/D68/543.pdf>.

MOORE, J.W. & RAMAMOORTHY, S. **Heavy metals in natural waters**. Springer-Verlag, New York, USA. p.268, 1984.

MORRINSON, R. D.; NEWELL, A. E. **Journal of Soil Contaminants**, 8, 63, 1999.

NASCIMENTO, F.L.; CATELLA, A.C. MORAES, A. S. Distribuição espacial do tucunaré, *Cichla* sp (Pisces, Cichlidae), peixeamazônico introduzido no Pantanal, Brasil. Corumbá: EmbrapaPantanal, 17p. (Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa, 24), 2001.

NASCIMENTO, E. L. Concentração de Mercúrio no plâncton e Fatores ecológicos do Reservatório da U.H.E - Samuel-Amazônia Ocidental (Rondôni/Brasil). Porto Velho: 119 p, 2006.

NRCC. OTTWA. **Effects of mercury in the canadian environment**. Ottawa, Canadá. Publication n. 16739, 1979.

OEHME, F. W. Mechanisms of heavy metal inorganic toxicities. In: OEHEME, F. W. (Ed.). **Toxicity of heavy metals in the enviroment**. New York: s. n. t., Part 1, p. 69-85, 1978.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; L. BELGER; PELLETIER E.; AND ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Res.**, 90, 217-225, 2002.

OLIVERO, J.; NAVAS, V.; PEREZ, A.; SOLANO, B.; ACOSTA, I.; ARGUELLO, E.; SALAS, R. Mercury levels in muscle of some fish species from the Dique Channel, Colombia. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 58, n. 6, p. 865-870, 1997.

OMS (Organisation Mondiale De La Santé); **Critères d'Hygiene de l'Environmental**: DDT et ses Derives. Grande Bretagne, vol 9, 1982.

OMS (Organizacion Mundial de la Salud): **Serie de Infomes Técnicos.Lucha Antivectorial** - Aplicada al Paludismo y a Otras Enfermedades Transmitidas por Mosquitos, 1995.

OTTAWAY, J. H. **Bioquímica da poluição** (trad.) São Paulo: - Ed. Pedagógica Universitária, EDUSP; p. 23-26, 1982.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S.; **Ciência, Higiene e tecnologia da carne**. EDUFF-UFG: Goiânia, 1993.

PAASIVIRTA, J.. **Chemical Ecotoxicology**. Lewis Publishers. 210 p., 1991

PAUMGARTTEN, F. J. R; **Proceedings of the International Workshop on Organic Micropollutants in the Environmental**, Rio de Janeiro: Brasil, 1997.

PHILLIPS, D. J. H & RAINBOW, P. S. **Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants**. Elsevier Applied science. 371,1993.

PHILIP, M. F. Brazil's Samuel Dam: Lessons for Hydroelectric Development Policy and the Environment in Amazonia. **Environ Manage.**, v. 35, No. 1, p. 1-19, 2005.

QUEIROZ, I. R. **Determinação do metilmercúrio em peixes de região de garimpo**. 109f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

RAMADE, F. **Écotoxicologie**. Paris: Masson, Chapitre III. B – **Mercur**. p.97-108, 1977.

RAND, G.M.; WELLS, P.G. & MCCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G.M. (ed). **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment, Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC, USA. p. 3-67, 1995.

REEVE, R. N. **Environmental Analysis**. Johon Wiley & Sons. p.263, 1994.

REY, L.; **Parasitologia**, 2^o ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991.

REYES-VIVAS, H.; LOPEZ-MORENO, F.; CHAVEZ, E. Protective effect of diethyldithiocarbamate on mercury-induced toxicity in kidney mitochondria. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 113, n. 3, p. 349-352, 1996.

RODRIGUES, G. S. *Elementos para uma política agroambiental em el Como sur*. **Programa cooperativo para el desarrollo Tecnológico Agropecuario del Como**

Sur. PROCISUR – *Subprograma Recursos Naturales y Sostenibilidad Agrícola*; Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Montevideo: Uruguai, 1997.

ROSA, L. P.; SANTOS, M.A.; TUNDISI, J.G. & SIKAR, B.M. Measurements of greenhouse gas emissions in Samuel, Tucuruí and Balbina Dams. p. 41-55 in L. P. Rosa, & M. A. dos Santos (eds.), **Hydropower Plants and Greenhouse Gas Emissions**. Coordenação dos Programas de Pós-Graduação em Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ), Rio de Janeiro, RJ. 111 p. 1997.

Rosberg M. et al. "Chlorinated Hydrocarbons" in Ullmann's **Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; RHEAULT, I.; TRAN, S.; FARELLA, N.; CANUEL, R.; MERGLER, D. & AMORIN, M.. **Mercury in Amazonian soils: accumulation and release**. IV international conference on the geochemistry of the Earth's surface. pp. 453-457, 1996.

ROULET, M. & LUCOTTE, C. The geochemistry of mercury in central Amazonia soils developed on the After formation of the lower tapajós river valley, Para state, Brazil. **Sci. Total Environ.** 223: 1-24, 1998.

SANTOS, H.S.B., MALM, O. & KEHRIG, H.A. **Mercury contamination in *Cichla temensis* (tucunaré) from Tucuruí Reservoir, Brazilian Amazon**. p. 136 in 6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant (ICMGP). Oct. 15-19, Minamata, Japan. ICMGP, Minamata, Japão, 392 p. 2001.

SHARMA, D. C. Biochemical basis of the toxicity of mercury. **Med. Hypoth.**, v. 23, p. 259-263, 1987.

SILVÉRIO, P.F. & MOZETO A.A. 1998. **Partição de metais pesados em sedimentos de ambientes lacustres de diferentes níveis tróficos do Estado de São Paulo**. XXXVIII Congresso Brasileiro de Química da ABQ, São Luís, MA, Brasil. 21-24/09/1998.

SPACIE, A.; MCCARTY, L.S. & RAND, G.M. Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems. In. Rand, G.M. (ed.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. 2ed. Taylor & Francis Washington, DC, USA., p.493-521.

ST. LOUIS, V.L.; RUDD, J.W.M.; KELLY, C.A., BODALY, R.A.; PATERSON, M.J.; BEATY, K.G.; HESSLEIN, R.H.; HEYES, A.; MAJEWSKI, A.R. The rise and fall of mercury methylation in an experimental reservoir. **Environ. Sci. Technol.**, 38, 1348-1358, 2004.

SWIFT, J.A. **Morphology and histochemistry of human hair**. *EXS.*, v.78, p. 149-175, 1997.

TENA, G. Los problemas gerados por el mercurio en España. *In: Simpósio sobre ambiente y salud: Mercurio y ecología*, 5. Boletín de la academia nacional de medicina de Buenos Aires. Buenos Aires, nov, 1981.

UNEP CHEMICALS. **Impacts of mercury on the environment**. In: _____. *Global mercury assessment*. Switzerland: UNEP, 2002. Chap. 5. Disponível em: <http://www.chem.unep.ch/mercury/WGmeeting/revreport-CH5.pdf>. Acesso em 3 ago. 2002.

VALLEE, B. L.; ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Ann Ver. Biochem.**, v. 41, p. 91-128, 1972.

WANIA, F.; AXELMAN, J.; BROMA, D. A review of processes involved in the exchange of persistent organic pollutants across the air-sea interface. **Environ. Pollut.**, 102, 3-23, 1998.

WEISSER, S. C. **Investigation of the history of mercury contamination in the Balbina Reservoir, Amazon, Brazil. Masters**. thesis in environmental toxicology, Universität Konstanz, Konstanz, Germany, 66 p., 2001.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Conference on intoxication due to alkylmercury-treated seed**. (Baghdad, Iraq, 9-13, september). Genève: 1976.138p, 1974.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mercury – environmental aspects**. Geneva. Environmental Health Criteria 86. 115p, 1989.

WHO (*World Health Organization*). Environmental Health Criteria: **DDT and its Derivatives Environmental aspects**, Finland, v. 83, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva; 1993.

WREN, C. D.; HARRIS, S. & HARTTRUP. **Ecotoxicology of mercury and Cadmium**. In: Handbook of Ecotoxicology. Eds: HOFFMANN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON jr, G. A.; CAIRNS Jr, J. p 392-423, 1995.

ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações** – São Carlos: RIMa. 478 p., 2006.

ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.N.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic. Biol. Med.** 26, 202–226, 1999.

RESUMO

Com objetivo de investigar o risco em potencial da exposição de populações de peixes e humana ao mercúrio e aos DDTs no Reservatório de Samuel, não afetado diretamente por atividades de mineração de ouro, foi analisada a concentração destes xenobióticos no músculo axial de *Cichla monoculus* em dois períodos do ano em dois pontos (ponto 1, 08°44'59"S e 63°26'05"W e ponto 2 08°51'47"S e 63°17'35"W). Vinte e nove indivíduos adultos foram coletados em fevereiro/2007 (estação chuvosa) e trinta em agosto/2007 (estação seca). Os espécimes foram sacrificados por secção espinal, sexados e obtido o peso corporal e o comprimento total. As amostras para quantificação de mercúrio total, DDT e DDE e para análise da atividade da colinesterase no músculo axial e cérebro foram congeladas a -20 °C. Para os estudos histopatológicos as brânquias e o fígado foram fixados em Alfac por 16 h para microscopia de luz e brânquias em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0.1M por 2 horas para microscopia eletrônica de transmissão (MEV). Valores de 48,2% e 33% dos indivíduos, respectivamente, das estações seca e chuvosa, apresentaram concentrações de mercúrio superior ao máximo estabelecido como seguro para consumo humano (0,5 µg g⁻¹) pela Organização Mundial de Saúde. Uma correlação positiva entre o peso corporal e a concentração de Hg foi observada somente em indivíduos provenientes da estação chuvosa, mas nenhuma correlação foi observada para o DDT e DDE de ambas as estações. Diferentemente do observado para o mercúrio, os níveis de DDTs apresentaram uma diferença significativa entre ambos os períodos estudados, mas nenhuma correlação foi observada entre o mercúrio, DDTs e sexo. Os níveis de DDTs no músculo de *C. monoculus* estão dentro do limite máximo estabelecido pela FAO-Alimentarius CODEX Swedish Food Regulation, para consumo humano. Os achados histopatológicos e neurotóxicos mostraram que esta população de peixes está afetada pela exposição crônica ao mercúrio, significando risco também para as populações que se alimentam de peixes. Finalmente, os resultados mostraram que *C. monoculus* é um importante veículo para a exposição humana ao mercúrio e DDTs no Reservatório de Samuel e que é necessário um biomonitoramento contínuo dos níveis de ambos os poluentes, a fim de gerenciar informações sobre o risco de exposição a populações de peixes e humanas

Palavras-chave: Mercúrio. DDT. Teleósteos. *Cichla monoculus*. Bioacumulação. Amazônia.

ABSTRACT

In order to investigate the potential risk of mercury and DDTs exposure to fish-eating human populations in Samuel Reservoir, not affected directly by gold-mining activities, the axial muscle of *Cichla monoculus* was analyzed (08°44'59"S e 63°26'05"W) and (08°51'47"S e 63°17'35"W). Twenty-nine and thirty adults individuals were collected respectively on February (rainy season) and August (dry season) 2007. The specimens were sacrificed by spinal section before sex identification, body weight and total length determination. For total mercury, DDT and DDE quantifications and cholinesterase activity samples of the axial muscle were frozen at -20°C, and for histopathological studies gill and liver were fixed in ALFAC solution for 16 h for optical studies and gill fixed in glutaraldehyde 3% and buffer cacodilate solution 0,1M for two h for scanning electron microscopy (SEM). A value of 48.2% and 33% of the individuals, respectively from rainy and dry seasons, presented mercury concentrations higher than the maximum established for safe human consumption (0.5 µg g⁻¹) by World Health Organization. A positive correlation between body weight and Hg concentration was observed only in individuals from the rainy season, but no correlation was observed to DDT and DDE from both seasons. Differently from that observed to mercury, DDTs levels presented a significant difference between both studied seasons, but no correlation was observed for both mercury and DDTs and sex. The levels of DDTs in muscle of *C. monoculus* are under the maximum established by FAO Alimentarius CODEX and Swedish Food Regulation for human consumption. The histopathological and neurotoxic findings showed that the wild population of fish is affected by chronic exposure to mercury, meaning risk also to fish-eating populations. Finally, the results showed that *C. monoculus* is an important vehicle for human exposure to mercury and DDTs in Samuel Reservoir and that it is necessary a continuous biomonitoring of the levels of both pollutants in order to manage the risk of exposure to human populations.

Keywords: Mercury. DDT. Teleosts. *Cichla monoculus*. Bioaccumulation. Amazon

1. INTRODUÇÃO

Em geral, os poluentes são tóxicos para os seres humanos e alimentos contaminados têm sido associados com efeitos nocivos para a saúde. Desta forma, os peixes são importantes veículos de exposição para a população humana, especialmente em populações onde estes são consumidos diariamente como parte da dieta. Recentemente muitos estudos têm sido focados na estimativa quantitativa dos riscos e benefícios do consumo de peixe para a saúde humana (Gladyshev *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010), como também relatado por Foran *et al.*(2005) para o metilmercúrio em salmão selvagem e de cativeiro. Isto estabelece um paradigma importante, uma vez que o consumo de peixe traz muitos benefícios para a saúde humana devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos essenciais poliinsaturados da família ω -3 (EFA) (Gladyshev *et al.*, 2009), que atua na prevenção de doenças cardiovasculares e desordens neurais (Silvers e Scott, 2002).

As consequências tóxicas da ingestão de MeHg para a população humana são bem conhecidas desde os anos 1950 (Amin-Zaki *et al.*, 1979; Harada, 1995). Entre os efeitos, os riscos de desenvolvimento de retardo mental, paralisia cerebral, cegueira e surdez têm sido relatadas, principalmente em crianças (Chevrier *et al.*, 2009). De acordo com Akagi *et al.* (1993) e Cordier *et al.* (2002), Pfeiffer e Lacerda (1988), a exposição ao MeHg a populações humanas na Amazônia está relacionada com o consumo de peixes de água doce. Além disso, Sheneider *et al.* (2009) descreveu que o mercúrio é um poluente importante no sistema de rios da Amazônia e peixes são considerados a principal fonte de proteína e de mercúrio (Hg) para as populações ribeirinhas. De acordo com Belger e Forsberg (2006), os elevados níveis de contaminação de mercúrio em peixes e no cabelo humano confirmam o alto risco

potencial para a saúde das populações humanas locais que se alimentam de peixes como principal fonte de proteína.

Desde 1980 as atividades de mineração de ouro têm sido descrita como a mais importante fonte de contaminação por mercúrio em águas da Amazônia (Kehrig *et al.*, 2008). Apesar disso, vários estudos têm argumentado que os altos valores dos níveis de Hg podem estar relacionados também a outras atividades humanas, incluindo a queima de biomassa (Meech *et al.*, 1997) e maior erosão do solo resultante do desmatamento (Lechler *et al.*, 2000). No ambiente, as formas químicas do mercúrio são intercambiáveis, mas a mais tóxica é a metilada, que é facilmente bioacumulada por organismos aquáticos, através da exposição trófica (Ramesh, 2007). Apesar de uma diminuição dos níveis de Hg, devido à diminuição da alta atividade de garimpo ao longo do tempo na Amazônia brasileira, a contaminação dos solos e sedimentos ainda persiste. Em consequência disso, mesmo longe de áreas impactadas por atividades de mineração de ouro, foram relatadas altas concentrações de mercúrio em peixes e em cabelo humano, (Bastos *et al.*, 2007; Dórea e Barbosa, 2007).

Os pesticidas organoclorados da classe dos DDTs foram um dos primeiros produtos químicos sintéticos a ser produzido em larga escala e teve uma rápida e ampla dispersão no ambiente (Filipak Neto *et al.*, 2008). DDT e seus metabólitos (DDE e DDD) são altamente persistentes e tendem a se acumular nos tecidos gordurosos de animais, incluindo peixes (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2008). Este composto foi banido em 59 países incluindo o Brasil (D'Amato *et al.*, 2007), mas na Amazônia ainda tem o uso permitido e controlado para combater o mosquito vetor da malária. DDT e seus metabólitos são descritos como desreguladores endócrinos por Leños-Castañeda *et al.* (2007), causando, entre

outros distúrbios biológicos, prejuízo à capacidade reprodutiva masculina devido ao desequilíbrio dos hormônios sexuais (Binelli e Provini, 2003). Estima-se que mais de 90% do DDT armazenado na população humana é derivada de alimentos, especialmente de gorduras de origem animal, tais como peixes (Chung *et al.*, 2008).

O biomonitoramento é a utilização regular e sistemática de organismos vivos para avaliar as mudanças no ambiente, tais como a qualidade da água (Van der Oost, 2003) e os biomarcadores são respostas biológicas aos poluentes que podem ser medidos sendo muito úteis em aplicações de biomonitoramento (Walker *et al.*, 1996).

A espécie de peixes considerada no presente estudo, *Cichla monoculus* é um predador de importância comercial devido à sua alta preferência na dieta humana da população na região amazônica (Kullander e Ferreira, 2006). Desta forma, o presente trabalho relata a bioacumulação de mercúrio e DDT em músculo de *C. monoculus* provenientes do Reservatório de Samuel - RO. Discutimos também a avaliação dos riscos para a população humana relacionados à bioacumulação de mercúrio em músculo e ainda descrevemos e relacionando com danos histopatológicos observados nas brânquias e no fígado bem com a atividade da colinesterase no cérebro e músculo.

CAPÍTULO I

Risco de exposição ao mercúrio e ao DDT em populações consumidoras de peixes na Amazônia

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a bioacumulação e possíveis riscos de exposição humana e da biota ao mercúrio e DDTs (Diclorodifeniltricloroetanos) em *Cichla monoculus* (Tucunaré) expostos cronicamente no Reservatório de Samuel - RO.

Objetivos específicos

- Quantificar a presença de Hg total e DDTs (DDT e DDE) no músculo de *Cichla monoculus* (Tucunaré), através de análises químicas;
- Analisar através de técnicas histológicas no fígado e brânquias danos e alterações e relacioná-las com a presença do Hg total e DDTs (Diclorodifeniltricloroetanos) em *Cichla monoculus* (Tucunaré);
- Analisar através da determinação da atividade colinesterásica no músculo axial e no cérebro alterações neurotóxicas e relacioná-las com a presença do Hg total e DDTs (Diclorodifeniltricloroetnos) em *Cichla monoculus* (Tucunaré).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área estudada e amostras de peixe

O Reservatório de Samuel é uma usina hidrelétrica construída há 28 anos, apresentando uma área de aproximadamente 634 km² e uma profundidade máxima de 15-20 metros (Nascimento, 2006). Dois locais dentro do reservatório de Samuel ponto 1 (08°44'59"S e 63°26'05" W, ponto 2, 08°51'47"S e 63 °17'35" W,) foram considerados em presente estudo (Figura 1). Vinte e nove e trinta espécimes de *Cichla monoculus* foram coletados em 2008, respectivamente, em fevereiro (estação chuvosa) e agosto (estação seca), num total de cinquenta e nove indivíduos adultos, entre machos e fêmeas. Os indivíduos foram transportados vivos para o laboratório, em caixas de isopor, logo em seguida à captura (aproximadamente 30 minutos), identificados de acordo com Santos *et al.* (1991), anestesiados com benzocaína (2% em água) e sacrificados por secção espinal, realizada a identificação do sexo e do peso corporal (g) e comprimento total (cm) (Tabela 1). As amostras de músculo (aproximadamente 15 g cada) foram armazenadas em sacos de polietileno a -20 °C até a análise química do mercúrio no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da Universidade de Rondônia (Brasil) e DDT na Universidade do Estado de São Paulo. Os imaturos não foram considerados para a comparação entre machos e fêmeas.

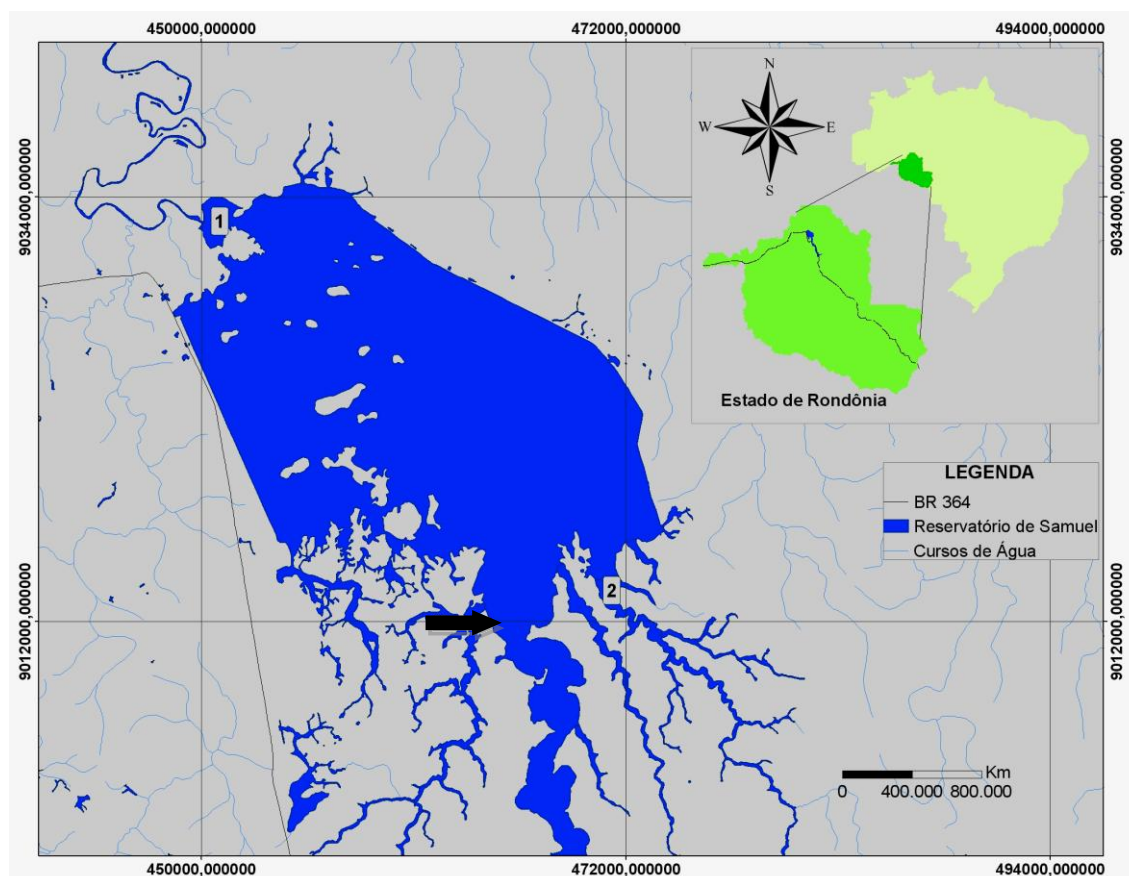


Figura 1. Mapa do Reservatório de Samuel. Os números 1 e 2 representam os pontos estudados, respectivamente $08^{\circ}44'59''S$ e $63^{\circ}26'05''W$; $08^{\circ}51'47''S$ e $63^{\circ}17'35''W$. O rio Jamari (flecha preta) não impactado diretamente por atividades de mineração, é o principal tributário do rio Madeira. Mapa adaptado da tese de mestrado de Nascimento, 2006.

2.2. Determinação de mercúrio total em músculo

A bioacumulação do mercúrio total foi quantificada por espectrofotometria de absorção atômica acoplado com geração de vapor a frio FIMs-400 (Flow Injection Mercury System, Perkin Elmer, Ueberlingen, Alemanha). Para cada 0,4 g de amostra de músculo (peso úmido) foi adicionado 5 ml de uma mistura de ácido (H_2SO_4 : HNO_3 , 1:1), para a digestão dos tecidos, em um bloco de digestão, por 60 min (Tecnal-Mod.007A, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Após o processo de digestão, foi adicionado na digestão em bloco, 4,0 ml da solução de $KMnO_4$ (5%) por 30 min.

Após esfriar a temperatura ambiente (25 °C), 12 gotas de solução de cloreto de hidroxilamina 12% foram adicionadas e as amostras foram transferidas para balões volumétricos de 12 ml de água ultrapura. Toda vidraria foi lavada com HNO₃ 10% e lavados com água ultra pura (Milli-Q Plus, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). A qualidade analítica foi verificada pelos valores médios de triplicatas, desvio-padrão (M±SD), por meio de análise de brancos e com um limite de detecção de 0,01 µg⁻¹. Análises de controle e precisão foram asseguradas pela utilização de padrões internos preparados no Laboratório de Biogeoquímica da Universidade de Rondônia (AFPX 5130) contra amostras de referência certificadas (cação-Músculo-2 DORM National Research Council of Canada, Ottawa) e utilizadas em exercícios de intercalibração entre laboratórios brasileiros (Tabela 2). Detalhes da digestão de amostras e de análise são descritos em Bastos *et al.* (1998, 2006). Os resultados foram expressos como µg Hg g⁻¹ peso úmido.

2.3. Análises de DDT e DDE: reagentes e padrões

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de alto grau de pureza analítica disponíveis comercialmente. Foram utilizados Acetonitrila (JR Baker ®), n-hexano (Proquimios ®) e ácido fórmico (PA) (Merck ®). O florisil (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), foi ativado a 300 °C por 24 h antes da utilização. Foram utilizados como padrão diclorodifeniltricloroetano (p, p'-DDT) e diclorodifenildicloroetano (p, p'-DDE) de AccuStandard® (New Haven, E.U.A.).

2.4. Procedimentos analíticos

A extração da gordura foi realizada no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da UFPR e a extração dos DDTs e a análise química foram realizadas na Universidade Estadual Paulista – UNESP de Bauru.

Para extração da gordura foram utilizados os procedimentos segundo a AOAC (1997). Amostras de músculo axial de *C. monoculus* (5 g) foram homogeneizadas com H₂O ultra pura (5 ml) e misturado com 0,5 ml de ácido fórmico, 5 ml de sulfato de sódio a 30% e 30 ml de acetonitrila e para extração da gordura foi adicionado uma mistura de n-hexano:acetonitrila (20:30v/v). As amostras foram agitadas por 10 min, filtrada em papel filtro, transferida para balão de agitação, adicionado acetonitrila e hexano, agitada duas vezes por 30 segundos e filtrada com sulfato de sódio anidro. O extrato foi evaporado a uma temperatura inferior a 70 °C, sendo adicionado 10 ml de hexano/ diclorometano (1:1). Para extração dos DDTs as amostras foram transferidas para uma coluna de Florisil (3 g).

2.5. Instrumentação

A análise foi realizada por cromatografia gasosa (GC) no cromatógrafo a gás Clarus 600 (Perkin Elmer Inc.) equipado com um detector de captura de elétrons. A cromatografia gasosa foi realizada em uma coluna capilar Elite de 30 m, 0,25 mm de diâmetro e 0,25, espessura de filme, com nitrogênio como gás de transporte (1 ml min⁻¹). A temperatura do injetor foi de 250 °C e o detector ECD 300 °C. A temperatura do forno do CG foi de 250 °C por 6 min. Os resultados foram expressos em ng DDTs g⁻¹ peso úmido.

2.6. Procedimentos histopatológicos

Para efeito de correlação entre as lesões e alterações histopatológicas e a bioacumulação de Hg, os grupos de animais coletados em ambos os sítios amostrais e estações do ano foram divididos de acordo com a concentração de Hg total no músculo em: Grupo A ($0,1 - 0,35 \mu\text{g g}^{-1}$), Grupo B ($0,36 - 0,60 \mu\text{g g}^{-1}$) e Grupo C ($0,61 - 1,6 \mu\text{g g}^{-1}$).

As amostras de brânquias e de fígado foram preservadas em solução fixadora Alfac (etanol 70%, formaldeído 4% e ácido acético glacial 5%) por 16 h, desidratadas em série crescente de etanol e incluídas em resina *Paraplast Plus*® (Sigma). Para observação foram realizados cortes com espessura de 5 μm e corados com hematoxilina e eosina (H.E.).

Os resultados foram expressos com predomínio de lesões histopatológicas, e os índices de alteração do fígado foram determinados de acordo com Bernet *et al.* (1999). Resumidamente, este índice é baseado na soma dos rankings de pontuação e os fatores de importância para cada alteração considerada no tecido. O ranking de pontuação foi baseado na porcentagem de lesões, e o fator de importância foi determinado para cada lesão, dependendo dos efeitos considerados mínima (1), moderados (2) e severos e irreversíveis (3). Utilizou-se a fórmula : $IL = \sum pr \sum alt (a \times w)$, onde : pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância (Bernet *et al.*, 1999).

Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras de brânquias foram fixadas em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2-7,4) para um mínimo de 24 horas, lavados no mesmo tampão e desidratadas em série de etanol (Merck ®) e CO₂ líquido, montados em suporte e metalizadas com ouro antes de

serem analisados em microscópio JEOL JSM-6360LV no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

2.7. Atividade da colinesterase

O cérebro e músculo foram coletados, a fim de investigar a atividade da colinesterase. A atividade da ChE foi medida espectrofotometricamente em 405 nm de acordo com Ellman *et al.* (1961), com pequenas modificações, para uso em microplaca de 96 poços por Silva de Assis (1998).

2.8. Procedimentos estatísticos

A concentração de mercúrio total entre as estações estudadas foram comparados por análise de covariância (ANCOVA), considerando o peso como covariável. Quando a covariável peso não foi significativa, utilizou-se a análise de variância (ANOVA). A correlação de Pearson foi utilizada para comparar a associação entre as variáveis, do parâmetro peso, e da concentração de Hg no músculo esquelético. Testes Paramétricos e não-paramétricos foram utilizados, e a concentração de Hg dentro e entre as estações seca e chuvosa foram analisadas através do teste Wilcoxon. Os valores foram apresentados como média \pm desvio-padrão, do peso úmido do músculo. Foi verificada a distribuição normal para cada análise. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software R, sendo considerado o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Bioacumulação de mercúrio

A bioacumulação de Hg no músculo de *C. monoculus* coletados nas estações seca e chuvosa variou entre 0,157-1,53 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ peso úmido, onde 48% dos indivíduos do período chuvoso e 33% dos indivíduos da estação seca apresentaram níveis de mercúrio maior que o estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o consumo humano (0,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$) (Figura 2). A média de bioacumulação de Hg observada nos peixes da estação chuvosa foi de 0,575 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ peso úmido, enquanto que a estação seca foi de 0,448 $\mu\text{Hg g}^{-1}$ peso úmido (Tabela 3).

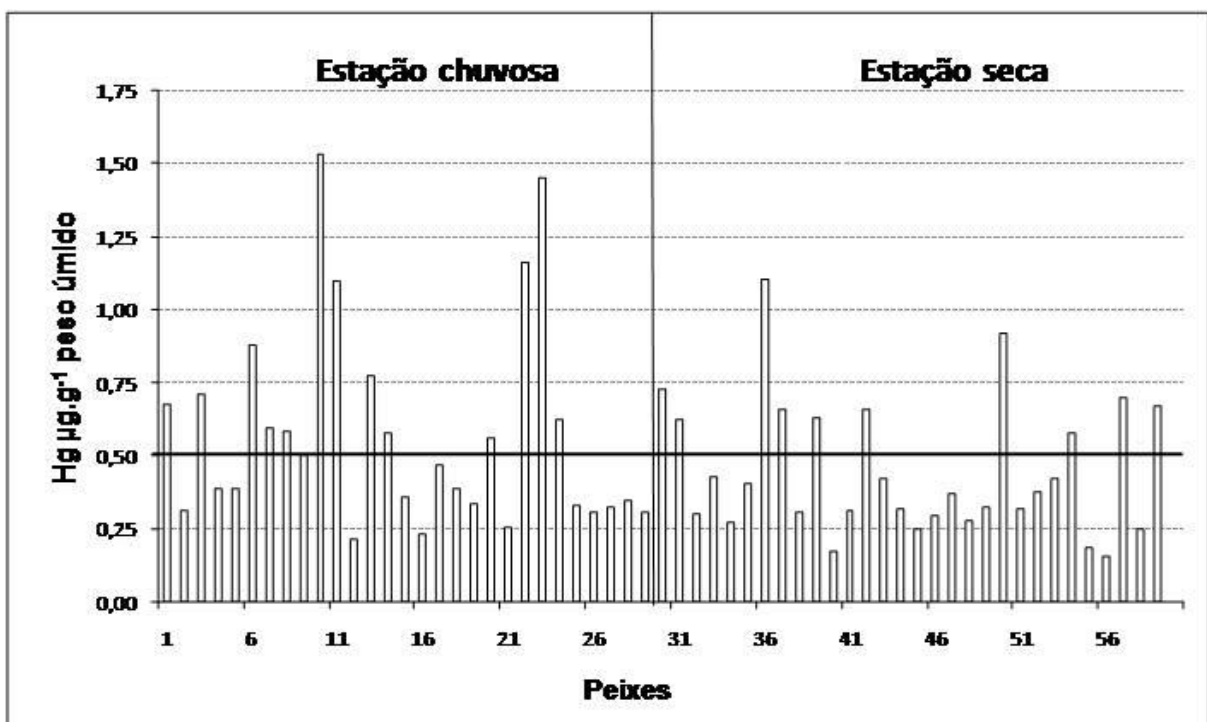


Figura 2. Bioacumulação de mercúrio total no músculo de *C. monoculus*, estação chuvosa (1-29) e estação de seca (30-59). A linha horizontal indica a concentração de máxima de Hg (0,5 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$) consideradas seguras para consumo humano de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO).

A análise de correlação entre os parâmetros biométricos de peso e os níveis de Hg no músculo indicou uma correlação positiva significativa ($p < 0,01$, $r = 0,40$) (Figura 3). O comprimento total e bioacumulação de Hg não apresentaram correlação significativa quando comparadas as duas estações. No entanto, uma análise separada mostrou uma correlação positiva durante a estação chuvosa ($p < 0,01$, $r = 0,57$), mas não durante a estação seca ($p = 0,24$, $r = 0,21$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a bioacumulação de mercúrio em *C. monoculus* em ambas as estações. A bioacumulação de mercúrio total no músculo não apresentou qualquer correlação com o sexo, considerando as duas estações estudadas isoladamente ou em conjunto.

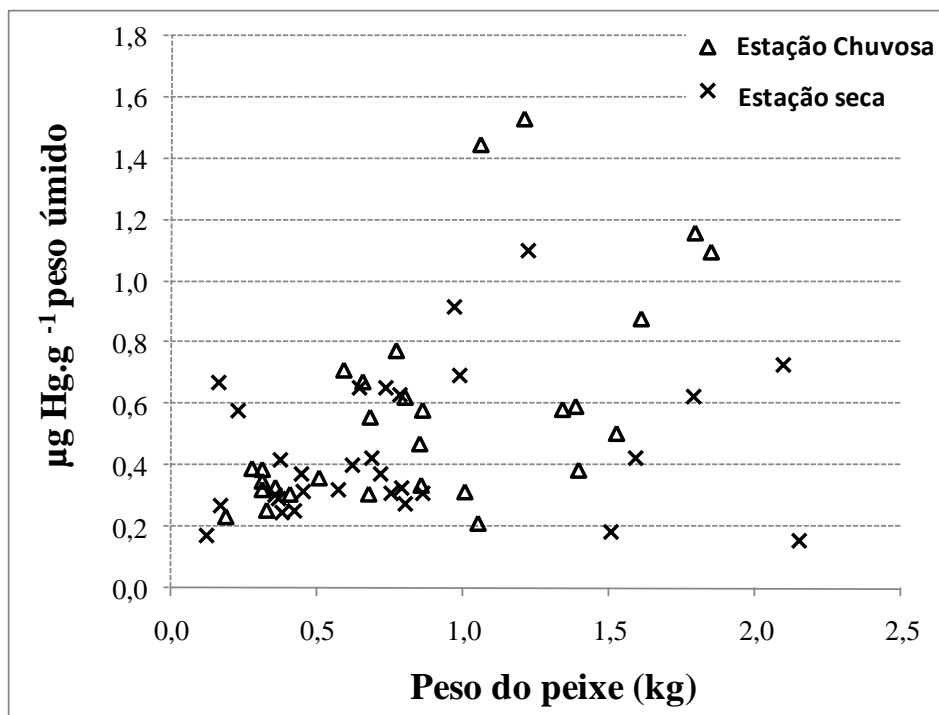


Figura 3 - Correlação positiva entre a bioacumulação de mercúrio total no músculo ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$) e peso (kg) ($r = 0,40$).

Tabela 1 – Parâmetros biológicos de *C. monoculus* coletados na estação chuvosa e estação seca.

	Estação chuvosa			Estação seca		
	n	peso (kg)	Comprimento (cm)	n	peso(kg)	comprimento(cm)
Macho	6	0.981±0.541	39.1±7.2	17	0.924±0.636	36.7±8.6
Fêmea	21	0.879±0.444	38.0±5.9	13	0.616±0.294	33.8±5.5
Imaturo	2	0.292±0.017	28.8±0.8	-	-	-
Total	29	0.860± 0.487	38.0± 6.5	30	0.791± 0.539	35.0±7.6

n (número de indivíduos)

Tabela 2 – Resultados do controle de qualidade da análise de mercúrio (Hg)

Padrão	Hg total estabelecido	Hg Total obtido	Diferença (obtido-estabelecido)
Laboratório Externo DORM 2*	4.64±0.26 µg.g ⁻¹	4.68±0.15 µg.g ⁻¹	-9%
Laboratório Interno AFPX5130**	14.42±1.96 µg.g ⁻¹	15.41±0.6µg.g ⁻¹	-7%

*AFPX5130 refere-se ao peso úmido. **DORM 2 refere-se ao peso seco. Media ±SD.

3.2. Bioacumulação do DDT e DDE

A bioacumulação do DDT total (Σ DDTs, ou seja, DDT + DDE) no músculo de *C. monoculus* variou de 0,54-15,34 ng DDTs.g⁻¹ peso úmido, com os níveis máximos atingindo 12,62 ng DDE g⁻¹ e 8,42 ng DDT g⁻¹, ambos na estação seca. Na estação chuvosa, os resultados foram diferentes, os níveis máximos de DDE e DDT atingiram 8,34 ng g⁻¹ e 5,83 ng g⁻¹, respectivamente (Tabela 3). O metabólito DDE foi

mais persistente do que o DDT composto parental, o que representa 82,8% (estação chuvosa) e 74,8% (estação seca) do DDTs total. O DDE e o DDT foram, respectivamente, detectados em 100% e 86,2% dos indivíduos do período chuvoso e em 96,7% e 80% dos peixes da estação seca (Tabela 3).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os níveis do DDE para ambas as estações consideradas, mas os níveis de DDT indicaram uma diferença significativa ($p = 0,03$) para a sazonalidade. A análise de correlação entre os parâmetros biométricos de peso e níveis de DDE no músculo indicou uma correlação negativa significativa ($p < 0,001$, $r = -0,40$), especialmente durante a estação chuvosa ($p < 0,014$, $r = 0,45$). O comprimento total, sexo, níveis de DDT e DDE não apresentaram correlação significativa.

Tabela 3. Bioacumulação do mercúrio total ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ peso úmido) e DDT e DDE (ng g^{-1} peso úmido) no músculo de *C. monoculus* do reservatório de Samuel durante as estações chuvosa e seca.

		Estação chuvosa	Variação min-max	Estação seca	Variação min-max
Mercúrio	Macho	0.513±0.328	0.157 - 1.16	0.420±0.179	0.157 - 0.728
	Fêmea	0.613±0.379	0.254 - 1.09	0.507±0.261	0.273 - 1.10
	Imaturo	0.379±0.020	0.349 - 0.39	-----	-----
	Média	0.575±0.343	0.212 - 1.53	0.448±0.225	0.157 - 1.10
DDT	Macho	1.58 ± 2.24	0.12 - 5.47	1.36 ± 0.85	0.02 - 2.72
	Fêmea	1.09 ± 1.53	0.17 - 5.83	2.98 ± 2.88	0.15 - 8.46
	Imaturo	0.24 ± 0.20	0.04 - 0.43	-----	-----
	Média	0.93 ± 1.64	0.04 - 5.83	1.77 ± 2.03	0.02 - 8.42
DDE	Macho	4.52 ± 2.40	2.21 - 8.34	4.67 ± 3.76	0.20 - 12.61
	Fêmea	4.38 ± 1.97	0.27 - 7.69	5.98 ± 2.88	0.36 - 9.68
	Imaturo	5.22 ± 0.08	5.14 - 5.29	-----	-----
	Média	4.46 ± 2.97	0.27 - 8.34	5.25 ± 3.45	0.20 - 12.62
∑ DDTs	Média	5.40 ± 2.92	0.63 - 13.81	7.03 ± 4.10	0.54 - 15.34

Média ± Desvio padrão. Estação chuvosa (n=29), macho (n=06), fêmea (n=21) e imaturo (n=2). Estação seca (n=30), macho (n=17), fêmea (n=13).

Tabela 04. Ocorrência (%) de achados histopatológicos no fígado e brânquias de *Cichla monoculus* provenientes do reservatório de Samuel expostos cronicamente ao mercúrio. Os grupos foram divididos em A=0,1-0,35; grupo B=0,36-0,60 e grupo C=0,61-1,6 em $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ peso úmido).

Mudanças Histopatológicas	Grupo A (0,1-0,35)	Grupo B (0,36-0,60)	Grupo C (0,61-1,6)
Fígado			
Necroses	50	71	100
Resposta Inflamatória	50	43	43
Vacuolização citoplasmática	50	43	71
Centro de melanomacrófago	33	71	100
Melanomacrófagos livres	50	100	100
Mudanças no índice de Bernet	7.7	11.1	12.6*
Brânquias			
Hiperplasia do endotélio	50	57	85
Hipertrofia do endotélio	50	43	85
Aneurisma	16	nd	nd
Fusão lamelar	50	43	85

Grupo A n=24, grupo B n=17, grupo C n=18. nd = não houve ocorrência. Índice de Bernet (IB) significativo (* p= 0,001). O IB em brânquias não foi significativo.

3.3. Biomarcadores

3.3.1 Aspectos morfológicos

Amostras de fígado e brânquias foram utilizadas para avaliar as alterações histopatológicas em *C. monoculus* provenientes do Reservatório de Samuel. A Tabela 4 mostra as alterações e danos resumindo a ocorrência (%) no fígado e brânquias de acordo com o nível de bioacumulação de mercúrio no músculo. Através do índice de Bernet é observado que o índice de lesão acompanha a bioacumulação de Hg total no músculo.

As Brânquias apresentam lamelas primárias e secundárias, como descrito para teleósteos. As lamelas secundárias são lateralmente dispostas em ambos os

lados da lamela primária e representam a superfície de troca gasosa (Figura 4A e 4B). Além disso, entre as lamelas secundárias estão as células de cloreto, com um papel importante na osmorregulação dos peixes e microdigações na superfície das células epiteliais das lamelas primárias de função pouco esclarecida (Figura 4b1). A incidência de células hipertrofiadas no epitélio das lamelas secundárias foram visíveis e comum na maioria dos indivíduos (Figura 4b2), ao passo que as lesões mais importantes encontradas nas brânquias de *C. monoculus* foram a hiperplasia com conseqüente fusão de lamelas secundárias (Figura 4C-H).

Nos poucos estudos disponíveis sobre a bioacumulação de mercúrio em músculo e fígado de peixes expostos ao mercúrio, naturalmente, a concentração deste metal no fígado foi sempre maior do que o observado em músculo. No presente trabalho a bioacumulação de mercúrio e DDT foi determinado apenas no músculo. O fígado de *C. monoculus* apresenta uma organização semelhante à descrita para a maioria dos teleósteos, apresentando um tecido bastante homogêneo, com sinusóides hepáticos e tecido pancreático difuso (Figura 5A e 5B). Em geral, as alterações mais importantes encontradas no fígado foram a ocorrência de resposta inflamatória, áreas de necrose, vacuolização citoplasmática e inclusões citoplasmáticas (Figura 6C e 6D). Além disso, a ocorrência de melanomacrófagos livre e centros de melanomacrófagos foram observados e quantificados (Figura 7A).

Comparativamente, os indivíduos do Grupo C apresentaram maior incidência de necrose (Figura 7B) bem como melanomacrófagos livres e centros de melanomacrófagos (Figura 7A) (Tabela 4) que os outros grupos, mas a resposta inflamatória não se alterou entre os grupos (Tabela 4). Apesar da vacuolização citoplasmática e a ocorrência de inclusões citoplasmáticas não apresentarem diferenças entre os grupos, quando observados pelo Índice de Bernet , se

considerarmos os indivíduos, estes dois tipos de alteração quando ocorrem, constituem resultados mais expressivos à medida que a concentração de Hg total no músculo vai aumentando (Figuras. 5 e figura 7).

3.3.2. Atividade Colinesterásica

Apesar de uma tendência de redução da atividade da colinesterase medida em cérebro de *C. monocolus*, não foram encontrados efeitos significativos entre os grupos. Por outro lado, um aumento inesperado significativo na atividade da colinesterase ocorreu no músculo de indivíduos do grupo com maior concentração de mercúrio (Figura 8).

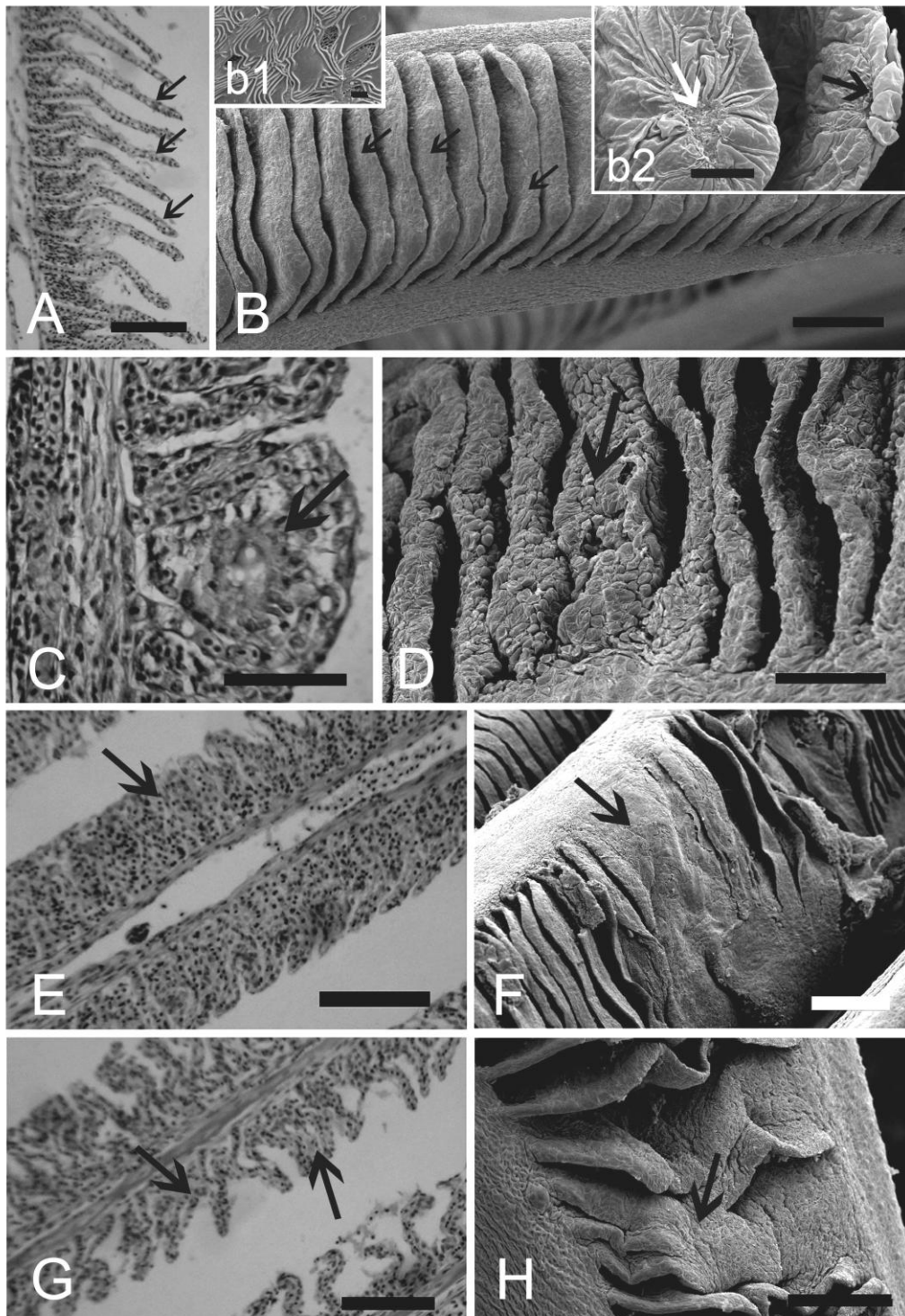


Figura 4 - Danos morfológicos em brânquias de *C. monoculus* cronicamente expostos ao mercúrio. **A.** aspecto normal da brânquia. As setas indicam as lamelas secundárias. Barra = 100 μ m. **B.** Vista externa de lamelas secundárias (setas). Observar em **b1** as microdigações na superfície das células epiteliais e em **b2** a extremidade da lamela secundária. A seta preta mostra o desprendimento de uma célula da lamela secundária e a seta branca mostra a cicatrização após o desprendimento da célula. Barra = 100,10 e 2 μ m, respectivamente. Em **C** e **D.** Observar o tecido hiperplásico (setas). Barra = 50 μ m. **E** e **F.** As setas indicam a fusão de lamelas secundárias. Barra = 100 μ m. **G** e **H.** Observar desarranjo e fusão parcial das lamelas secundárias (setas). Barra = 100 μ m. Para microscopia de luz foi utilizado o corante hematoxilina e eosina.

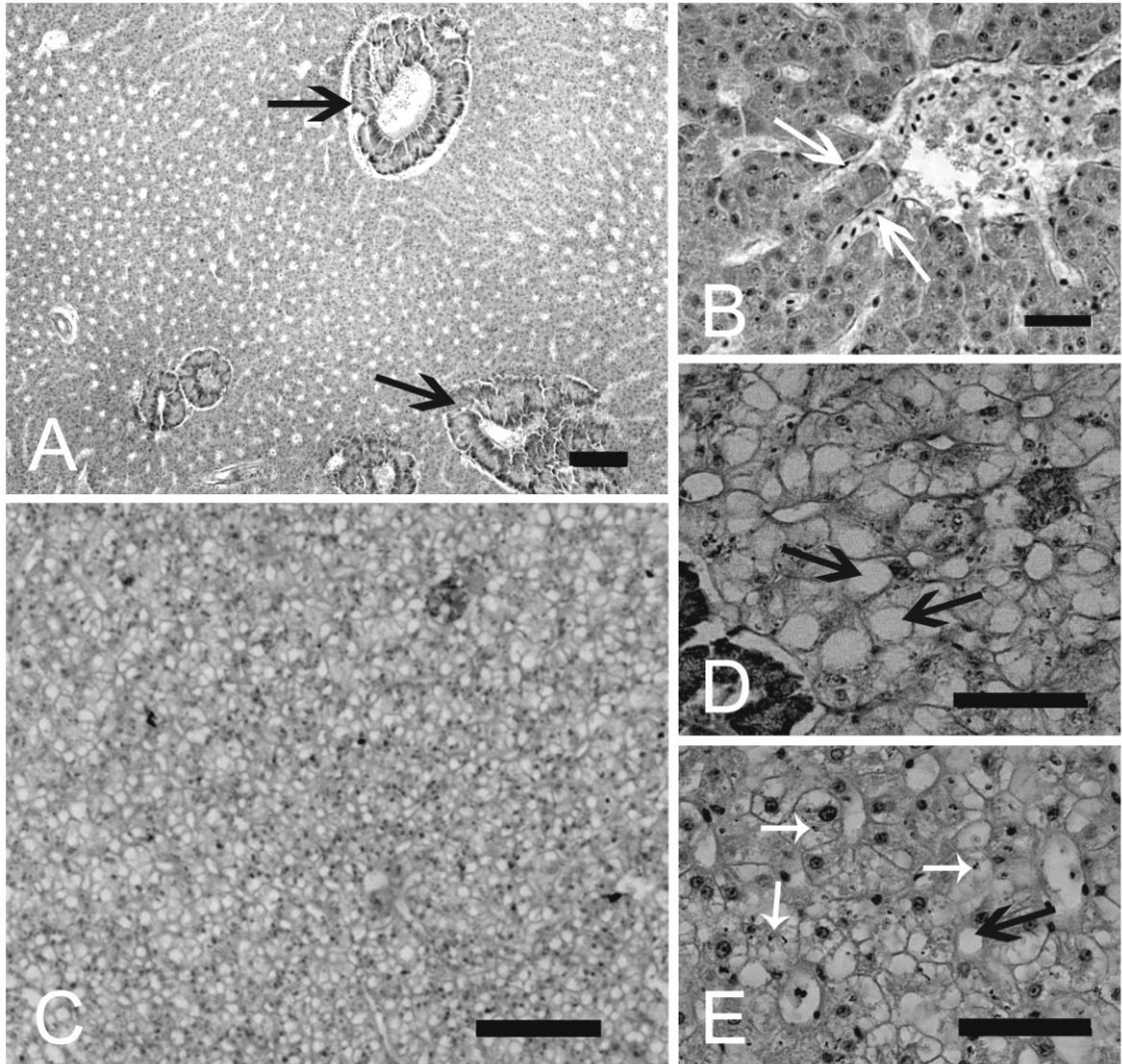


Figura 5 - Histopatologia do fígado de *C. monocolus* do grupo **A** ($0,10$ a $0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A** e **B** mostrou um aspecto normal do tecido. Observe o tecido pancreático difuso (setas pretas) e a organização dos sinusóides da veia central (setas brancas). Barra= 100 e 50 μm . **C** e **D** mostram o citoplasma vacuolizado. Note em **D** o aspecto cheio do citoplasma (setas). Barra = 100 e 50 μm . **E**. Os hepatócitos apresentam vacuolização (flecha preta) e grânulos dentro do citoplasma (seta branca). Barra = 50 μm . Coloração em Hematoxilina e eosina.

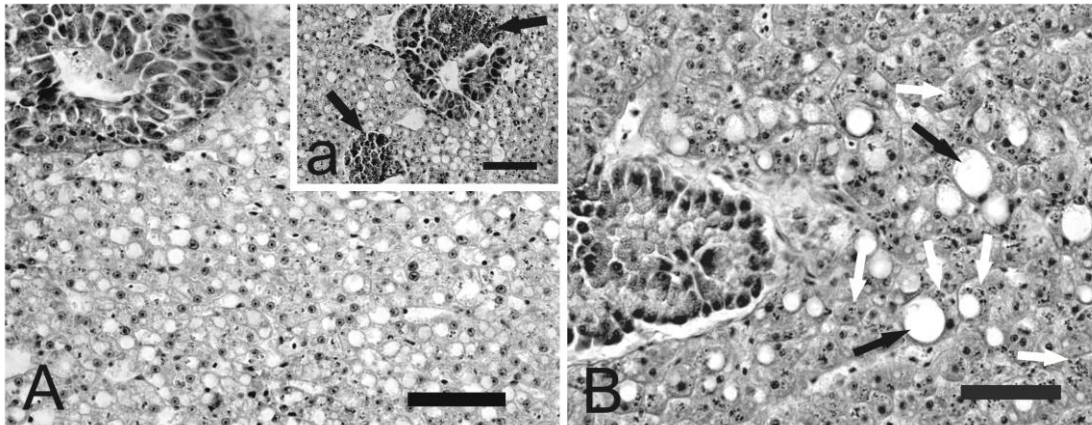


Figura 6- Histopatologia de fígado de *C. monoculus*. **Grupo B** (0.36 a $0.60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). Em **A**, observar o aumento da vacuolização no citoplasma dos hepatócitos. No detalhe (**a**) observar a presença dos centros de melanomacrófagos (setas). Em **B**, observar a vacuolização mais acentuada (setas preta) e depósito de grânulos (seta branca) dentro do citoplasma. Barra = $50 \mu\text{m}$. Corante: Hematoxilina e eosina.

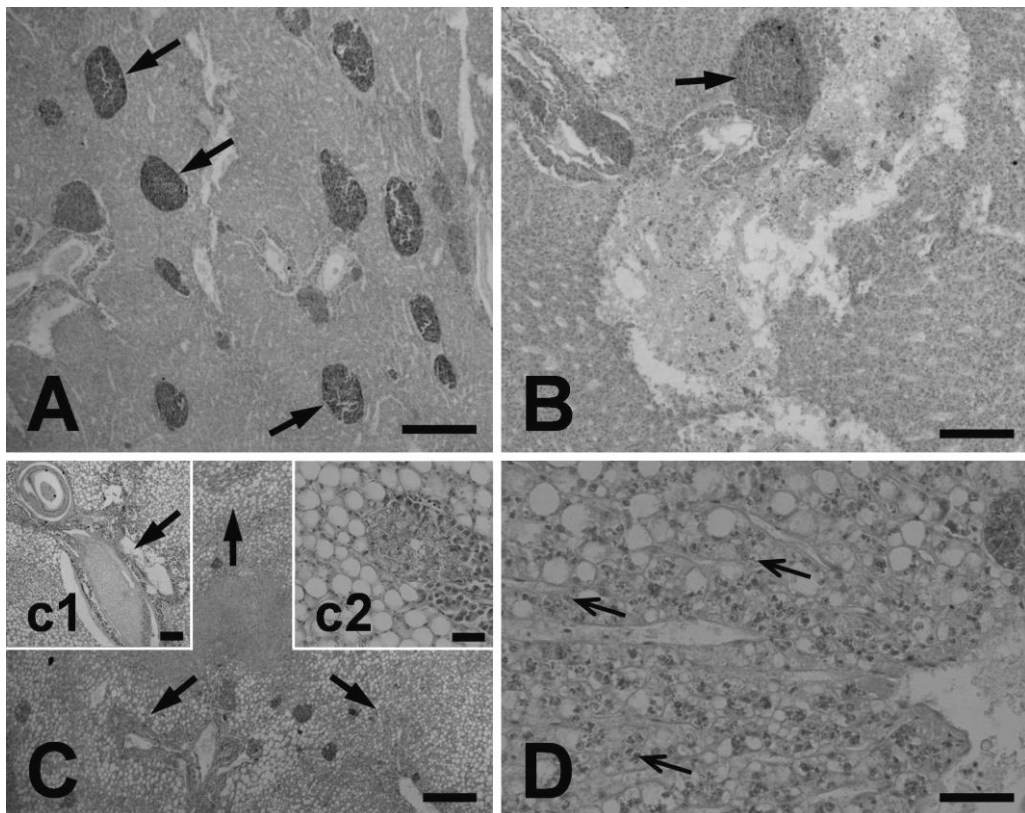


Figura 7- Histopatologia do fígado de *C. monoculus* - **Grupo C** (0.61 a $1.60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). Em **A** observar a alta incidência de centros de melanomacrófagos (setas). Barra = $100 \mu\text{m}$. Em **B** grande extensão de necrose. Notar a presença de centro de melanomacrófagos (setas). Barra = $100 \mu\text{m}$. Em **C** indivíduos com alta incidência de vacuolização citoplasmática (setas). Uma área de necrose é observada em **c1 e c2** mostra em detalhe a alta vacuolização dos hepatócitos. Barra = $50 \mu\text{m}$. Em **D** notar a alta incidência de depósitos de grânulos no citoplasma (setas). Barra = $50 \mu\text{m}$. Corante: Hematoxilina e eosina.

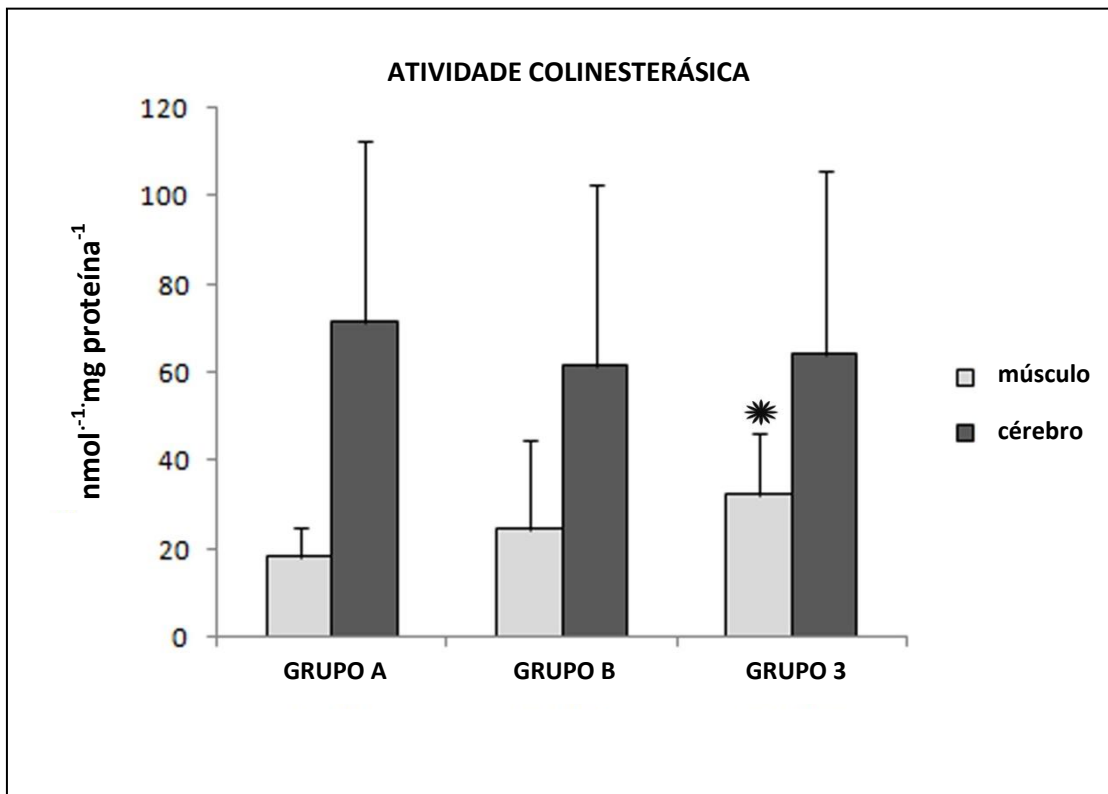


Figura 8 - Atividade colinesterásica do cérebro e músculo de *C. monocolus* dos grupos **A** ($0,10-0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), **B** ($0,36-0,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$) e **C** ($0,61-1,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), em nanomoles de colina. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Médias (colunas) e desvio padrão (Barras). * $p = <0,05$

4. DISCUSSÃO

A complexidade do sistema de rios da Amazônia, devido às alterações ambientais provocadas pelas enchentes anuais, dificulta a compreensão da transferência de mercúrio e de risco para a biota, incluindo a exposição humana. Isto é particularmente importante porque os níveis de mercúrio em músculo dos peixes da Amazônia estão acima do limite estabelecido pela OMS como seguro para consumo humano (Dórea *et al.*, 2006).

O presente estudo mostrou que a concentração de mercúrio no músculo de *C. monoculus*, variou de 0,157-1,53 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ peso úmido, mesmo não havendo atividades de mineração de ouro no rio Jamari, afluente do rio Madeira e no reservatório de Samuel. Além disso, mais de um terço dos indivíduos apresentaram níveis de mercúrio superior ao limite seguro para o consumo humano (WHO, 1990). Comparando estes valores com o de outro estudo no mesmo rio (Reuther, 1994), a bioacumulação de mercúrio no músculo de *C. monoculus* aumentou em até duas vezes ou mais ao longo dos últimos dezesseis anos. Diferentemente, da redução dos níveis de mercúrio que tem sido observado ao longo do tempo no reservatório de Tucuruí (Kehrig *et al.*, 2008; Malm *et al.*, 2004), sugerindo que o reservatório de Samuel é afetado por outras fontes de contaminação por mercúrio, como o transporte por longas distâncias, a remobilização de sedimentos e a re-emissão dos solos devido à queima de floresta, aumentando a biodisponibilidade dos metais para a biota. Esta hipótese pode ser considerada, pois os valores apresentados no estudo atual são similares aos encontrados para a mesma espécie nos rios historicamente afetados pela atividade de mineração de ouro, como o rio Madeira (Bastos *et al.*, 2007; Kehrig *et al.*, 2008). Particularmente, o desmatamento e as mudanças de uso

da terra, como a conversão de floresta para pastagem por corte e queima que representam uma atividade muito intensa no Estado de Rondônia pode ser potencialmente responsável pela manutenção de elevados níveis de mercúrio no Reservatório de Samuel (Lacerda *et al.*, 1995; Roulet *et al.*, 2000; Godoy *et al.*, 2002, 2004; Bastos *et al.*, 2006), embora a possibilidade de impactos indiretos da atividade de mineração de ouro deva ser melhor investigada. Além disso, os recentes projetos do governo brasileiro de construção de novos reservatórios ao longo do Rio Madeira aumentam a necessidade de um melhor controle da biodisponibilidade de mercúrio para a biota e a população humana em reservatórios.

Embora a concentração de MeHg não tenha sido determinada no presente estudo, esta é a principal forma química do mercúrio presente no músculo e no fígado de peixes naturalmente expostos ao mercúrio (Kehrig *et al.*, 2008), podendo exceder a 70% do mercúrio total (Akagi *et al.*, 1995; Kehrig e Malm, 1999; Mason *et al.*, 2000; Bowles *et al.*, 2001; Horvat *et al.*, 2003; Durrieu, 2005). De acordo com Reuther (1994), as condições físico-químicas existentes em águas tropicais como o reservatório de Samuel pode favorecer a mobilização de mercúrio, metilação e, conseqüentemente, a biodisponibilidade. Logo, é necessário prevenir as pessoas dos efeitos nocivos do consumo de peixes contaminados e proporcionar uma alimentação saudável. De acordo com Gladyshev *et al.* (2009), um acompanhamento regular dos quocientes de risco da alimentação de peixes em condições naturais é muito desejável. Para proteger as populações ribeirinhas as agências governamentais poderiam alertar estes indivíduos sobre o risco de toxicidade do mercúrio associado ao consumo de determinadas espécies e da quantidade de peixes a serem consumidas.

O consumo de peixe é a fonte mais significativa de exposição ao MeHg para a população (Rice *et al.*, 2000) e contaminantes como o mercúrio estão em quantidades suficientemente elevadas em alguns peixes, de modo a representar um risco potencial para os consumidores (Burger e Gochfeld, 2009). Por outro lado, esta é também uma discussão muito complexa entre os especialistas no assunto, porque as fontes de baixo teor de gordura de proteína animal, que incluem a presença de ácidos graxos essenciais poliinsaturados da família ω -3 (ácido eicosapentaenóico) encontrados em peixes podem proporcionar muitos benefícios à saúde e sua importância na dieta tem ficado cada vez mais clara (Burger e Gochfeld, 2009). Desta forma, um balanço de riscos, considerando os riscos e benefícios do consumo de diferentes espécies de peixes poderia ser uma nova abordagem para populações ribeirinhas que se alimentam de peixes na Amazônia, especialmente do reservatório de Samuel. A espécie *C. monoculus* tem uma vida longa, é amplamente distribuído na bacia amazônica e bastante aceito na dieta humana, por isso, também representa um risco potencial para a saúde da população ribeirinha. Além disso, esta espécie é útil para o monitoramento biológico de ambientes impactados por mercúrio, tendo em vista a distribuição geográfica e preferência pelos peixes de topo de cadeia para o consumo humano.

Os DDTs também se acumulam nos peixes e representam um risco para a população que consomem peixes na Amazônia. Os DDTs são facilmente bioacumulados na cadeia alimentar, principalmente como DDT, DDE e DDD. Considerando a distribuição DDT e seus metabolitos, Miranda *et al.* (2008) relataram a presença de 100%, 70% e 50% do DDT, DDE e DDD, respectivamente, no músculo da espécie *H. malabaricus* em Ponta Grossa - PR, apesar do uso do DDT não ter sido registrado regularmente nesta região. No estudo atual, DDE e DDT

foram detectados em mais de 85% de *C. monoculus*, do Samuel reservatório, mas as concentrações foram inferiores aos limites recomendados para consumo humano pelo Ministério da Saúde Pública no Brasil e pelo Codex Alimentarius Comissão da FAO / WHO (1997), indicando que os peixes são seguros para consumo quanto aos níveis de DDTs. Os valores também são inferiores aos limites recomendados para a proteção da biota aquática na Grã-Bretanha (500 ng Hg g⁻¹) para o DDT (GB 2763, 2005), estabelecido pela National Academy of Sciences and National Academy of Engineering (1972) (1 µg Hg g⁻¹) e pelo Swedish Food Regulations (1983) (5 µg Hg g⁻¹) (Chung *et al.*, 2008). O uso regular do DDT na Amazônia para controle do vetor da malária deve ser a principal fonte de DDT e metabólitos para o sistema de rios da Amazônia (D'Amato, 2002; 2007), incluindo para o reservatório de Samuel.

O presente estudo fornece informações importantes sobre bioacumulação de mercúrio e DDT no ambiente aquático tropical, que ainda é escassa na Amazônia devido à grande complexidade dos ecossistemas aquáticos desta região (Wania e Mackay, 1993; Kumblad *et al.*, 2001; Dalvie *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2008). A toxicidade relacionada com a associação entre o DDT e o mercúrio ainda não está clara, mas recentemente Filipak Neto *et al.* (2008) descreveu a toxicidade desses contaminantes nos hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Segundo estes autores, a associação de ambos os contaminantes podem interferir com a toxicidade, comparativamente com a exposição isolada. Estes dados foram observados em experimentos realizados com os contaminantes (mercúrio e DDT) separadamente. Sendo assim, os dados sobre a bioacumulação de contaminantes e os efeitos combinados entre eles são necessários para avaliação dos riscos ambientais na Amazônia, o que pode levar ao restabelecimento dos níveis de limite de segurança com relação à saúde animal e humana.

Finalmente, os níveis de DDT e mercúrio no sedimento, água e peixes são suscetíveis a induzir efeitos biológicos adversos ao ecossistema e à saúde humana, através do consumo de peixe. Recentemente, Grotto *et al.* (2010) mostraram que a exposição ao Hg está associada com o estresse oxidativo em comunidades ribeirinhas amazônicas. Segundo os autores, isso pode explicar pelo menos algumas das disfunções neurológicas e cardiovasculares encontradas nestes grupos de risco. Níveis elevados de Hg em peixes têm implicações potenciais para a saúde dessas comunidades que tem o peixe como principal fonte de proteína, apesar dos benefícios nutricionais do consumo de peixe. Os estudos experimentais têm revelado os efeitos do mercúrio em peixes e outros vertebrados, mas poucos têm se preocupado com a exposição natural e crônica. Além disso, as interpretações dos efeitos em animais selvagens são muito difíceis, principalmente devido à presença de outros poluentes e as interações entre eles ainda serem um desafio para os ecotoxicologistas.

Os fígado de peixe tem níveis de mercúrio superiores aos do músculo em *Hoplias malabaricus* provenientes do reservatório de Samuel (dados submetidos) e *Anguilla anguilla* de Lagoa de Vacaré, França (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005), de modo que o fígado é um alvo importante da exposição crônica ao mercúrio. Na verdade, a investigação histopatológica é interessante, porque as alterações histológicas são frequentemente o resultado da interação de um grande número de processos fisiológicos, permitindo a diferenciação morfológica entre os animais não expostos e expostos ao composto, representando um importante parâmetro para estabelecer os danos em animais cronicamente expostos (Letcher *et al.*, 2010). Conforme descrito por Rabitto *et al.* (2005) a ocorrência de centros de melanomacrófagos e melanos livres aumentados com os níveis de mercúrio bioacumulados no músculo significa

que lesões como a degeneração de células e tecidos estão presentes e podem levar à falência do órgão. Desta forma, as alterações histológicas descritas em ambos os órgãos estudados de *C. monoculus* cronicamente expostos ao mercúrio mostraram evidências morfológicas do risco potencial para a espécie, e para populações consumidoras de peixes na Amazônia. Segundo Chevrier *et al.* (2009), crianças com idades entre 7-12 anos da Amazônia brasileira e da Guiana Francesa apresentaram alterações nas funções visuo-espaciais e do desenvolvimento cognitivo, podendo demorar mais tempo ou não ser completa nos grupos expostos a níveis mais elevados de contaminação ao mercúrio, resultando em consequências sociais potencialmente graves a longo prazo.

O mercúrio é conhecido como um poluente neurotóxico, e pode causar distúrbios na atividade das colinesterases, evidenciado com a bioacumulação de mercúrio no músculo de *C. monoculus*, corroborando com esta neurotoxicidade, mesmo sob exposição crônica. Foram observadas diferenças significativas na atividade colinestarásica no músculo nos indivíduos com maiores índices de bioacumulação e apesar do esperado ser uma inibição da atividade, o aumento desta atividade também pode representar um efeito crônico que precisa ser melhor estudado, mas que poderia interferir na sobrevivência da espécie em longo prazo.

Desta maneira, esforços adicionais são considerados necessários para identificar as principais fontes de contaminação por mercúrio e DDT no reservatório de Samuel. Este estudo permitirá uma utilização mais eficaz dos recursos, a mitigação dos efeitos adversos e potenciais de poluentes sobre o ambiente e o conhecimento sobre o risco real para a população consumidora de peixe como principal fonte de proteína na Amazônia.

5. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu uma avaliação dos impactos ambientais do mercúrio e DDTs no reservatório da hidrelétrica de Samuel (Rondônia, Brasil), no Rio Jamari, um afluente do rio Madeira e o risco do consumo de peixes para populações humanas. Pesquisas futuras devem investigar os processos responsáveis pelos altos níveis de mercúrio observados no reservatório e da contribuição das fontes naturais e processos biogeoquímicos. A espécie *C. monoculus* apresenta relevância ecológica para o ecossistema local e importância nutricional para a população ribeirinha, pois os peixes são a principal fonte de proteína para esta população. Desta forma, o presente estudo mostrou que peixes, tais como *C. monoculus* estão sendo afetados pela exposição aos poluentes encontrados e, além disso, constituem um importante veículo para a exposição humana ao mercúrio e DDTs na Amazônia, mesmo em ambientes que não são diretamente afetados pela atividade de mineração de ouro, uma importante fonte de mercúrio na Amazônia. Posteriormente, um acompanhamento contínuo dos níveis de dois poluentes na biota é recomendado a fim de controlar o risco de exposição para a população.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo conselho Nacional de Pesquisa do Brasil-CNPq (projetos 553269/2005-4 e 555543/2006-4). Os autores agradecem todo o apoio logístico e técnico dado por Roberto Keidi Miyai e do Director Regional Edgar Temporim Filho da Companhia ELETRONORTE de Rondônia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F.; PFEIFFER, W.C. **Methylmercury pollution in Amazon, Brazil**. In: Proceedings of the international symposium on assessment of environmental pollution and health effects from methylmercury. World Health Organization, Japan, 1993.

AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO, Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F.J.P.; PFEIFFER, W.C.; KATO, H. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **Sci. Total Environ.**, 175, 85-95, 1995.

AMIN-ZAKI, L.; MAJEED, M.A.; ELHASSANI, S.B.; CLARKSON, T.W.; GREENWOOD, M.R.; DOHERTY, R.A. Prenatal methylmercury poisoning, clinical observations over five years. **Am. J. Dis. Child.**, 133, 172-7, 1979.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. In: ANALYTICAL METHODS- Horacek J, Skládal, 1997. **P. Anal. Chim. Acta.**347:43.

BASTOS, W.R.; MALM, O.; PFEIFFER, W.C.; CLEARY, D. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon Brasil. *Ciêne Cult.* **J. Braz. Assoc. Advn. Sci.**, 50, 255-60, 1998.

BASTOS, W.R.; GOMES, J.P.O.; OLIVEIRA, R.C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E.L.; BERNARDI, J.V.E.; LACERDA, L.D.; SILVEIRA, E.G.; PFEIFFER, W.C. Mercury in the environmental and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Sci. Total Environ.**, 368, 344-351, 2006.

BASTOS, W.R.; ALMEIDA, R.; DÓREA, J.G.; BARBOSA, A.C. Annual flooding and fish-mercury bioaccumulation in the environmentally impacted Rio Madeira (Amazon). **Ecotoxicology**, 16, 341-346, 2007.

BELGER, L.; FORSBERG, B.R. Factors controlling Hg levels in two predatory fish species in the Negro river basin, Brazilian Amazon. **Sci. Total Environ.**, 367, 451-459, 2006.

BERNET, D.; SCHIMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P. AND WAHLI, T. Histopatology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis.**, 22, 25-34, 1999.

BINELLI, A.; PROVINI, A. DDT install a problem in developed countries: the heavy pollution of Lake Maggiore. **Chemosphere**, 52, 717-723, 2003.

BOWLES, K.C.; APTE, S.C; MAHER, W.A.; SMITH, R. Bioaccumulation and biomagnification of mercury in Lake Murray, Papua New Guinea. **Can. J. Fish Sci.**, 58(5):888-897, 2001.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Perceptions of the risks and benefits of fish consumption: Individual choices to reduce risk and increase health benefits. **Environ. Res.**, 109, 343-349, 2009.

CHEVRIER, C.; SULLIVAN, K.; CORDIER, R.S.; GRANDJEAN, P. Qualitative assessment of visuospatial Amazonian children. **Neurotoxicology**, 30, 37-46, 2009.

CHUNG, S.W.C.; KWONG, K.P.; YAU, J.C.W. Dietary exposure to DDT of secondary students in Hong Kong. **Chemosphere**, 73, 65-69, 2008.

CORDIER, S.; GAREL, M.; MANDEREAU, L.; MORCEL, H.; DOINEAU, P.; GOSME-SEGURET, S.L. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. **Env. Res.**, 89, 1-11, 2002.

D'AMATO, C.; TORRES, P.M.; MALM, O. DDT(Dichlodiphenyltrichloethane): Toxicity and environmental contamination – a review. **Quim. Nova**, 25(6), 995-1002, 2002.

D'AMATO, C.; TORRES, P.M.; MALM, O. Determinated Σ DDT in Commercial Fishes Samples from distinct Brazilian Amazon Sites. **Oecol. Bras.**, 11, 202-212, 2007.

DALVIE, M.A.; MYERS, J.E.; THOMPSON, M.L.; ROBINS, G.; OMAR, S. E RIEBOW, J. Exploration of different methods for measuring DDT exposure among malaria vector workers in Limpopo Province South Africa. **Environ. Res.**, 96, 20-27, 2004.

DÓREA, J.G.; BARBOSA, A.C.; SILVA, G.S. Fish-mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. **Comp. Biochemic. Physiol.**, 142, 275-283, 2006.

DÓREA, J.G.; BARBOSA, A.C. Anthropogenic impact of mercury accumulation in fish from the Rio Madeira and Rio Negro (Amazônia). **Biol. Trace Elem. Res.** 115:243-254, 2007.

DURRIEU, G.; MAURY-BRACHET, R. AND BOUDOU, A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). **Ecotox. Environ. Saf.**, 60, 315-323, 2005.

ELLMAN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, 7, 88-95, 1961.

FAO–WHO, **Codex Maximum Residue Limits for Pesticides**. FAO, Rome. 1997.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; NAKAO, L.S.; RANDI M.A.F.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A. Toxic effects of DDT and methylmercury in the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. **Toxicol. In Vitro.**, 22, 1705-1713, 2008.

FORAN, J.A.; GOOD, D.H.; CARPENTER, D.O.; HAMILTON, M.C.; Knuth, B.A.; Schwager, S.J. Quantitative analysis of the benefits and risks of consuming farmed and wild salmon. **J. Nutr.**, 135, 2639-2643, 2005.

GB 2763. **Maximum Residue Limits for Pesticides in food**. 2005

GLADYSHEV, M.I.; SUSHCHIK, N.N.; ANISHCHENKO, O.V.; MAKHUTOVA, O.N.; KALACHOVA, G.S.; Gribovskaya, I.V. Benefit-risk ratio of food fish intake as the source of essential fatty acids vs. heavy metals: A case study of Siberian grayling from the Yenisei River. **Food Chem.**, 115, 545-550, 2009.

GODOY, J.M.; PADOVANI, C.R.; GUIMARÃES, J.R.D.; PEREIRA, J.C.A.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, Z.L. Evaluation of the situation of the River Taquari, pantanal, Brazil, through Pb-210 geochronology of floodplain lake sediments. **J. Braz. Chem. Soc.** 13, 71-7, 2002.

GROTTO, D.; VALENTINI J.; FILLION, M.; PASSOS, C. J. S.; GARCIA, S.C. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon Donna Mergler b, Fernando Barbosa. **Jr. Sci. Total Environ.**, 408, 806-811, 2010.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Crit. Rev. Toxicol.**, 25, 1-24, 1995.

HORVAT, M.; NOLDE, N.; FAJON, V.; JEREB, V.; LOGAR, M.; LOJEN, S.; JACIMOVIC, R.; FALNOHA, I.; LIYA, Q.; FAGANELI, J.; DROBNE, D. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted area in the province Guizhou, China. **Sci. Total Environ.**, 304, 231-256, 2003.

JIANG, C.B.; YEH, C.Y.; LEE, H.C.; CHEN, M.J.; HUNG, F.Y.; FANG, S.S.; CHIEN, L.C. Mercury concentration in meconium and risk assessment of fish consumption among pregnant women in Taiwan. **Sci. Total Environ.**, 408, 518-523, 2010.

KEHRIG, H.A.; HOWARD, B.M.; MALM, O. Methylmercury in a predatory fish (*Cichla spp.*) inhabiting the Brazilian Amazon. **Environ. Pollut.** 154, 68-76, 2008.

KEHRIG, H. A.; MALM, O. Methylmercury in fish as a tool for understanding the Amazon mercury contamination. **Appl. Organomet. Chem.**, 13, 689-696, 1999.

KULLANDER, S.O.; FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla* with descriptions of nine new species (Teleostei:Cichlidae). **Ichthyol. Explor. Freshw.**, 17(4), 289-398, 2006.

KUMBLAD, L.; OLSSON, A.; KOUTNY, V.; BERG, H. Distribution of DDT residues in fish from the Songkhla Lake, Thailand. **Environ. Pollut.**, 112, 193-200, 2001.

LACERDA, L.D. Amazon mercury emissions. **Nature**, 374, 20-1, 1995.

LACERDA, L.D.; RIBEIRO, M.G.; SOUZA, M. The effects of land use change on mercury distribution in soils of Alta Floresta, southern Amazon. **Environ. Pollut.**, 129, 247-55, 2004.

LEAÑOS-CASTAÑEDA, O.; KRAAK, V.G.D.; CANUL, R.R.; GOLD, G. Endocrine disruption mechanism of o,p'-DDT in mature male tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 221, 158-167, 2007.

LECHLER, P.J.; MILLER, J.R.; LACERDA, D.L.; VINSON, D.; BONZONGO, J.C.; LYONS, W.B.; WARWICK, J.J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? **Sci. Total Environ.**, 260, 87-96, 2000.

LETCHER, R. J.; BUSTNES, J.O.; DIETZ, R.; JENSSEN, B. M., JØRGENSEN, E.H.; SONNE, C.; VERREAULT, J.; VIJAYAN, M.M.; GABRIELSEN, G.W. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. **Sci. Total Environ.**, 408, 2995–3043, 2010.

MALM, O.; PALERMO, E.F.A.; SANTOS, H.S.B.; REBELO, M.F.; KEHRIG, H.A.; OLIVEIRA, R.B.; MEIRE, R.O.; PINTO, F.N.; MOREIRA, L.A.; GUIMARÃES, J.R.D.; TORRES, J.P.M.; PFEIFFER, W.C. Transport and cycling of mercury in Tucuruí reservoir, amazon, Brazil: 20years after fulfillment RMZ- **Mater Geoviron**, v. 51, 1195-1198, 2004.

MASON, R.P., LAPORTE, J.M. Andres S. Factors controlling the bioaccumulation of mercury, methylmercury, arsenic, selenium and cadmium by freshwater invertebrates and fish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 38(3), 283-297, 2000.

MEECH, J.A., VEIGA, M.M. Tromans D. Emission and stability of mercury in the Amazon. **Can. Metall. Q.** 36(4):231-239, 1997.

MIRANDA, A.L.; ROCHE, H.; RANDI, M. A. F.; MENEZES, M.L., OLIVEIRA RIBEIRO; C.A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environ. Int.**, 34:939-949, 2008.

NASCIMENTO, E.L. **Concentração de mercúrio no plâncton e fatores ecológicos no Reservatório da U.H.E.** – Samuel – Amazônia Ocidental (Rondônia / Brasil) – Dissertação – Mestrado em desenvolvimento Regional e Meio Ambiente - Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR, 2006 .

National Academy of Sciences & National academy of Engineering. Section III: Freshwater Aquatic Life and Wildlife, Water Quality Criteria. **Ecology and Research Serve Environment**. National Academy of Sciences & National Academy of engineering, Washington, DC, p.62, 1972.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PHA and heavy metals in the Eel (*Anguilla Anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic. toxicol.**, 74, 53-69, 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2008.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI., M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*:

histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 60,147-156, 2005.

RAMESH, C.G. **Veterinary Toxicology** Basic and Clinical Principles. Edited by: Ramesh C. Gupta, DVM, MVSC, PHD, DABT, FACT, 442-448, 2007.

REUTHER, R. Mercury accumulation in sediment and fish from rivers affected by alluvial gold mining in the Brazilian Madeira river basin, Amazon. **Environ. Monit. Assess.**, 32:239-258, 1994.

RICE, G.; SWARTOUT, J.; MAHAFFEY, K.; SCHOENY, R. Derivation of US EPA's oral reference dose (RfD) for methylmercury. **Drug Chem. Toxicol.**, 23, 41-54, 2000.

ROULET, M. ; LUCOTTE, M. ; CANUEL, R.; FARELLA, N. Courcelles M, Guimarães JRD. Increase in mercury contamination recorded in lacustrine sediments following deforestation in the central Amazon. **Chem. Geol.**, 165, 243-66, 2000.

SANCHEZ, W.; PICCINI, B.; MAILLOT-MARÉCHAL, E. AND PORCHER, J.M. Comparison of two reference systems for biomarker data analysis in a freshwater biomonitoring context. **Environ. Int.**, 36, p. 377-382, 2010.

SANTOS, G.M.; FERREIRA, E.J.G.; JEGU, M. **Catálogo dos Peixes do Rio Jamari, Rondônia. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA**, Manaus, Amazonas. Book. 123p., 1991.

SCHNEIDER, L.; BELGERB, L.; BURGERC, J.; VOGTA, R.C. Mercury bioaccumulation in four tissues of *Podocnemis erythrocephala* (Podocnemididae: Testudines) as a function of water parameters. **Sci. Total Environ.**, 407,1048-1054, 2009.

SILVA DE ASSIS, H.C. **Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**. Thesis. Berlin Technical University, Germany. p.99, 1998.

SILVERS, K.M. Scott KM. Fish consumption and self-reported physical and mental health status. **Public Health Nutrition.**, 5, 427-431, 2002.

SWEDISH FOOD REGULATIONS. **Foreign Substances in Food**. SLVFS:I. Stockholm: National Food Administration. 1983.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 13, 57-149, 2003.

WALKER, C.H. **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor and Francis. Wania, F.; Mackay, D. 1993. Global fraction and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. **Ambio**. 22, 10-18, 1996.

WHO. Methylmercury, Environ. Health Crit. 101. **International Program on Chemical Safety** (in Geneve), 1990.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J. AND JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem **Anal. Chim. Acta.** 606, 14, 135-150, 2008.

RESUMO

Os biomarcadores de estresse oxidativo têm sido amplamente utilizados em estudos experimentais na avaliação dos efeitos de poluentes em condições *in vivo* e *in vitro*. Nestes casos tem se mostrado uma ferramenta importante já que o desequilíbrio no balanço óxido-redutor celular é defendido por muitos como o princípio dos efeitos deletérios sobre a célula. Com o intuito de aproveitar o esforço amostral como descrito no Capítulo I e discutir o uso destes biomarcadores em condições de campo, foram coletadas amostras do fígado de *Cichla monoculus* provenientes do reservatório da hidrelétrica de Samuel, no rio Jamari – RO, e realizadas análises dos seguintes biomarcadores: Catalase (CAT), o cloridrato de ácido δ -aminolevulínico (ALA-d), glutationa S-transferase (GST), glutationa reduzida (GSH), peroxidação lipídica (LPO), superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), desidrogenase de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutationa reduzida (GR). Foram amostrados 59 espécimes de peixes que após identificação foram determinados o sexo, o peso corporal (g) e o comprimento total (cm). Em seguida, os indivíduos foram anestesiados com benzocaína (0,02%), sacrificados e as amostras de fígado (\pm 3g) foram coletadas e colocadas em sacos de polietileno e congeladas a -80 °C para as análises bioquímicas. Como no Capítulo I, os exemplares foram separados em três grupos de acordo com os níveis de mercúrio encontrados no músculo: **G1**(0,10-0,35 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), **G2** (0,36-0,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$) e **G3** (0,61-1,60 $\mu\text{g de Hg g}^{-1}$). Com o intuito de avaliar a relação entre os parâmetros bioquímicos e a bioacumulação de Hg total no músculo, os dados foram correlacionados com a concentração de mercúrio entre os grupos distribuídos acima. Não foram considerados a bioacumulação de DDTs por esta se apresentar abaixo do permissível pela legislação. Foi observada uma correlação negativa significativa entre a bioacumulação de Hg total em músculo e a atividade da catalase (CAT). A atividade da δ -ALA-d aumentou significativamente nos grupos com maior concentração de Hg total no músculo, sugerindo aumento das defesas antioxidantes e a GST é significativamente inibida nos indivíduos com maior concentração de Hg total no músculo. Nenhuma outra correlação foi significativa entre os indivíduos com maior concentração de Hg total no músculo e os outros dados bioquímicos de resposta ao estresse oxidativo celular. Com base nestes resultados, pode-se afirmar que embora algumas correlações possam ser significativas, como por exemplo, a inibição da catalase amplamente descrita na literatura, a grande maioria dos outros parâmetros não apresentou nenhuma correlação com as altas taxas de Hg no músculo. Portanto, o uso apenas destes parâmetros, sem considerar outros de longo prazo, não é representativo, pois não traduzem o real efeito nos organismos expostos cronicamente.

Palavras chave: Estresse oxidativo. Biomarcadores. Biomonitoramento. Teleósteos. Mercúrio. DDT. Amazônia.

ABSTRACT

Biomarkers of oxidative stress have been widely used in experimental studies evaluating the effects of pollutants in conditions in vivo and in vitro. These cases has been an important tool since the imbalance in the balance oxide-reducing cell is argued by many as the beginning of the deleterious effects on the cell. In order to take advantage of the sampling effort as described in chapter I and discuss the use of these biomarkers in field conditions, samples of liver of *Cichla monoculus* from the reservoir of the hydroelectric Samuel, Jamari River - RO and analyzed the following biomarkers: Catase (CAT), δ -aminolevulinic acid hydrochloride (ALA-d), glutathione S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione (disulfide) reductase (GR). We sampled 59 specimens, in laboratory fishes were identified, and sex, body weight (g) and total length (cm) were determined. Then, fishes were anesthetized (0.02%), and sacrificed and samples of liver (\pm 3g) were collected and placed in polyethylene bags and frozen at -80 ° C for biochemical analysis. As in Chapter I, the samples were separated into three groups according to levels of mercury found in muscle: G1 (0.10 to 0.35 mg Hg g⁻¹), G2 (from 0.36 to 0.60 mg Hg g⁻¹) and G3 (0.61 to 1.60 mg of Hg g⁻¹). In order to evaluate the relationship between biochemical parameters and bioaccumulation of total mercury in muscle, data were correlated with the mercury concentrations distributed between the groups above. Were not considered the bioaccumulation of DDTs because in this present below the permissible by law. We observed a significant negative correlation between the bioaccumulation of total Hg in muscle and the activity of catalase (CAT). The activity of δ -ALA-d significantly increased in groups with higher concentrations of total Hg in muscle, suggesting an increase of antioxidant defenses and GST is significantly inhibited in individuals with higher concentrations of total Hg in muscle. No other correlation was significant among individuals with higher concentrations of total Hg in muscle and other biochemical data in response to cellular oxidative stress. Based on these results, it can be stated that although some correlations could be significant, for example, inhibition of catalase widely described in literature, most of the other parameters showed no correlation with high rates of Hg in muscle. Therefore the use of only those parameters, without considering other long-term, is not representative because it does not reflect the actual effect on chronically exposed organisms.

Keywords: Oxidative stress. Biomarkers. Biomonitoring. Mercury. DDT. Amazon.

1. INTRODUÇÃO

Mercúrio (Hg) e DDT são contaminantes ambientais importantes, que representam um grave risco para a biota natural e para saúde humana. No entanto a avaliação de risco para a exposição a estes poluentes é um desafio iminente e a busca por biomarcadores capazes de fazer esta avaliação mais confiável e realística é constante e necessária.

Modelos experimentais sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na toxicodinâmica de Hg (Grotto *et al.*, 2010; Farina *et al.*, 2003) e DDT (Pérez Maldonado *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2007; Oliveira Ribeiro, 1999, 2005). Ambos os modelos *in vivo* e *in vitro* mostram que estes contaminantes podem causar estresse oxidativo em sistemas biológicos (Ascher e Syversen, 2005; Crespo-López *et al.*, 2007; Filipak Neto *et al.*, 2008; Grotto *et al.*, 2009, 2010), com geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a depleção da glutathiona (GSH) (Shenker *et al.*, 2000), que podem levar a processos patológicos (Halliwell *et al.*, 1992). No entanto, existem poucos estudos que avaliaram os efeitos do Hg em populações dos peixes da Amazônia e não foram encontrados estudos que consideraram os efeitos da associação natural entre Hg e DDT naquela região. Estudos epidemiológicos de caso-controle relataram o potencial de muitos contaminantes ambientais, tais como metais e pesticidas como fatores de risco para algumas doenças neurodegenerativas (Migliore *et al.*, 2009), em parte, pela ocorrência de estresse oxidativo (Zana *et al.*, 2007).

Há muitos estudos que documentam a exposição Hg na dieta e os primeiros sinais de toxicidade, mas poucos estudos analisaram os possíveis eventos

biológicos subjacentes. Recentemente, Sebreński Silva *et al.*, (submetido) relataram altos níveis de mercúrio em *Hoplias malabaricus* na hidrelétrica de Samuel (bacia amazônica) e a alteração de alguns parâmetros bioquímicos e morfológicos.

No presente estudo, a bioacumulação do mercúrio e DDT e a resposta hepática antioxidante foram investigadas em uma espécie de peixe predador *Cichla monoculus* também provenientes da hidrelétrica de Samuel. Com o intuito de avaliar a viabilidade do uso destes biomarcadores em organismos cronicamente expostos a poluentes nos ambientes naturais, foram realizadas neste estudo correlações entre a bioacumulação de Hg total em músculo e as respostas antioxidantes nos hepatócitos dos indivíduos considerados para o presente estudo.

CAPITULO II

Avaliação crítica do uso de biomarcadores de respostas antioxidantes como ferramenta no biomonitoramento de ambientes tropicais de água doce

OBJETIVOS

- **Objetivo geral**

Utilizar uma espécie de peixe de água doce para avaliar o uso de respostas antioxidantes como ferramenta útil no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos tropicais.

- **Objetivos específicos**

Utilizar marcadores de estresse oxidativo como: Peroxidação lipídica (LPO), concentração de glutathiona reduzida (GSH), atividade da Catalase (CAT), atividade das Glutathiona S-Transferases (GST), atividade da Superóxido Dismutase (SOD), atividade da Glutathiona redutase (GR), atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx), atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), para investigar o ambiente redox celular em *Cichla monoculus* expostos cronicamente ao Hg e DDTs.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O mesmo número de 59 espécimes de *C. monoculus* considerados para o estudo relacionado como o Capítulo I foi utilizado para o presente estudo. Amostras de fígado (± 3 g) foram coletadas e acondicionadas em recipientes de polietileno e armazenadas a -80°C antes das análises.

As análises químicas foram realizadas no músculo para a detecção de mercúrio total e DDTs (Rabitto, *et al.*, *In Press* disponível *on line*, doi:10.1016/j.envint.2010.07.001) enquanto que o fígado foi utilizado para avaliação das respostas antioxidantes. Após ser descongelado no gelo, o fígado foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio gelado ($0,1 \text{ moles.l}^{-1}$, pH 7,2) e centrifugado a 9000 g , 30 min a 4°C . Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C e utilizados para os seguintes ensaios como descrito abaixo.

2.1 Atividade da Catalase (CAT)

Um volume de $20 \mu\text{l}$ de sobrenadante foi misturado com o meio de reação ou tampão fosfato (branco) ($980 \mu\text{l}$, H_2O_2 30 mM , Tris-base 50 mM , EDTA 25 mM , pH $8,0$, 25°C) em uma cubeta de quartzo e a diminuição da absorbância devido à degradação do H_2O_2 foi medida a 240 nm (Aebi, 1984) por 40 segundos em intervalos de 1 segundo. O primeiro intervalo de 30 segundos, com $r^2 = 0,99$ e o coeficiente de extinção de H_2O_2 de $40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, foram utilizados para calcular a atividade da enzima.

2.2. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

Um volume de 10 μL do sobrenadante ou tampão fosfato (para o branco) foi misturado com 130 μl de solução-reação (3,08 mM de azida de sódica, 0,31 mM de β NADPH, 1,54 unidades/ ml^{-1} glutathiona redutase de levedura e 3,08 mM de GSH em 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,0) em uma placa de 96 poços. Após 2 min de estabilização, a reação foi iniciada pela adição de 60 μl de peróxido de hidrogênio 5 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM , pH 7.0. O decréscimo de absorbância foi imediatamente medida a 340 nm por 2 minutos em intervalos de 10 segundos (s). O primeiro intervalo de 60 s, com $r^2 = 0,99$ e o coeficiente de extinção de 6,22 mM de NADPH $^{-1}.\text{cm}^{-1}$ foram utilizados para calcular a atividade da enzima (Takahashi, 1994).

2.3. Atividade superóxido dismutase (SOD)

Um volume de 150 μl de etanol foi adicionado a 450 μl de sobrenadante ou tampão fosfato (branco) a mistura foi centrifugada a 9000g durante 20 min a 4 °C, o sobrenadante da centrifugação foi utilizado para determinar a atividade SOD. Um volume de 20 μl do sobrenadante e 70 μl de meio de reação (286 mM de cloreto de NBT, 0,05 mM de EDTA) foi misturado em uma microplaca de 96 poços. A reação foi iniciada através da adição de 110 μl de 67mM de cloreto de hidroxilamina em carbonato de sódio 182 mM, pH 10,2 (Crouch *et al.*, 1981). A redução do NBT pelo ânion superóxido a azul de formazan foi medido em 560 nm logo após o início da reação e mais uma vez após 1 h de incubação no escuro. Uma unidade de SOD é

definida como a atividade enzimática capaz de inibir a redução do NBT a 50% da taxa em branco.

2.4. Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

Um volume de 20 μl do sobrenadante ou tampão fosfato (branco) foi colocado em microplaca de 96 poços, seguido imediatamente por meio de reação (180 μl , GSH 1,5 mM, de 1-cloro -2,4 dinitrobenzeno (CDNB) 2,0 mM, tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5). O aumento de absorvância foi imediatamente medida a 340 nm (Keen *et al.*, 1976) por 2 minutos em intervalos de 12 s e o primeiro intervalo de 1 min com $r^2 = 0,99$ e o coeficiente de extinção molar do CDNB de 9,6 mm de $1.\text{cm}^{-1}$ foram utilizados para calcular a atividade da enzima.

2.5. Atividade da glutathione redutase (GR)

Um volume de 50 μl de sobrenadante ou tampão fosfato (branco) e meio de reação (170 μl , 0,5 mM β -NADPH, glutathione dissulfeto (GSSG) 5,0 mM, EDTA 5,0 mM, 0,1 M de potássio tampão fosfato, pH 7,6 e 25 ° C) foram misturadas em uma microplaca de 96 poços. A diminuição da absorvância foi monitorada em 340 nm (Sies *et al.*, 1979) por 10 min com intervalos de 40 s, e um período de 10 min foi selecionado e utilizado para determinar a atividade da enzima, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH de 6,22 mm de $1.\text{cm}^{-1}$.

2.6. Atividade da δ -aminolevulínico desidratase (δ -ALAD)

Um volume de 50 μ l do sobrenadante foi misturada com 550 μ l de solução-reação (cloridrato de ácido δ -aminolevulínico (ALA-HCl) 4,0 mM, Triton X-100 0,5% , tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,3) e incubados a 25 °C por 1 h. A reação foi interrompida com 400 μ l de ácido tricloroacético 4% e de HgCl₂ 99,45 mM em água, e banho de gelo. Para os brancos, a reação foi interrompida antes da incubação de 1 h. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5 000 g por 5 min a 4°C. Um volume de 150 μ l do sobrenadante e 150 μ l da solução reagente de Ehrlich (18,18 mg ml⁻¹ p-dimetilamino benzaldeído, 3,18 mg ml⁻¹ HgCl₂, ácido acético glacial 76,36% e ácido perclórico 18,18% em água) foram colocados em uma microplaca de 96 poços. Após 15 min de incubação, foram medidas absorvâncias a 570 nm (Sassa, 1982) e a atividade enzimática foi calculada após a comparação com uma curva padrão porfobilinogênio.

2.7. Medida da glutathiona reduzida (GSH)

O GSH foi medida após precipitação protéica com ácido tricloroacético 10% e centrifugação a 1000g por 15 min e 4°C. Um volume de 50 μ l do sobrenadante e 230 μ l de Tris-base (0,4 M, pH 8,9) foram colocados em uma placa de 96 poços, seguido pela adição de 20 μ l de 5,5 '-ditio (2 - nitrobenzóico ácido) (DTNB) 2,5 mM, em 25% de metanol. As absorvâncias foram determinadas a 415 nm e a concentração de GSH foi calculada por comparação com uma curva padrão de GSH (Sedlak e Lindsay, 1968).

2.8. Quantificação da Peroxidação lipídica (LPO)

A LPO foi medida pelo ensaio oxidação de ferro-xilenol (FOX) (Jiang *et al.*, 1991; 1992). Um volume de 800 µl de solução-reação (xilenol laranja 0,1 mM, H₂SO₄ 25 mM, butil hidroxitolueno BHT 4,0 mM) e FeSO₄.NH₄ (sulfato ferroso amoniacal) 0,25 mM em metanol puro, nesta ordem) foi adicionado um Tubos contendo 100 µl do sobrenadante ou PBS (branco), misturados e incubados por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 9000 g por 10 min. Foram colocados 250 µl do sobrenadante em uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida em 570 nm para determinar a concentração de hidroperóxidos. Foi usado coeficiente de extinção molar aproximado para H₂O₂ (hidroperóxido) é de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.9. Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

Um volume de 30 µl do sobrenadante foi misturada com 170 µl de solução-reação (Tris-HCl a 1 M, pH 8,0, MgCl₂ a 10 mM, NADP⁺ a 1 mM, glicose-6-phosphate 2 mM, 25°C) foram colocados em uma placa de 96 poços. A atividade da G6PDH foi medida em 340 nm (Glock e McLean, 1953) por 2 min em intervalos de 10 s. Foi utilizado o primeiro intervalo de 1 min selecionado ($r^2 = 0,99$), e o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM NADPH}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.10. Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais nas amostras foram quantificadas através do método Bradford (1976). As amostras foram diluídas 1:10 a partir do sobrenadante. Um volume de 10 μ L de sobrenadante ou PBS (branco) e 250 μ l de reagente de Bradford (Sigma) foram colocados em uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida em 620 nm após 5 min de incubação. O teor de proteína foi calculado através da comparação com uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

2.11. Procedimentos estatísticos

A correlação de Pearson's foi utilizada para comparar a associação entre as variáveis. O Wilcoxon test foi realizado a fim de decidir entre testes paramétricos e não paramétricos. Sempre que os dados foram paramétricos seguiu-se a análise ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey quando não-paramétrico utilizou-se o teste de Kruskal Wallis. Os valores foram apresentados como média \pm desvio-padrão e o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

A bioacumulação de Hg e DDTs (DDT e seus metabólitos) foi avaliada em *C. monoculus*, uma vez que estes podem ser considerados dois dos principais poluentes da região em estudo. Como observado no Capítulo I a bioacumulação de mercúrio excedeu os níveis de segurança tendo em vista o limite máximo estabelecido para consumo humano ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (WHO), enquanto os níveis de DDT mostraram-se abaixo do recomendado para o consumo humano de peixes (GB 2763) e abaixo dos limites máximos de resíduos de pesticidas nos alimentos (FAO-Alimentarius CODEX and Swedish Food Regulation). Para facilitar a avaliação do proposto neste Capítulo foram considerados os mesmos grupos separados para os resultados descritos no Capítulo I na avaliação dos riscos de exposição natural ao Hg e DDTs: **Grupo A** ($0,10\text{-}0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), **Grupo B** ($0,36\text{-}0,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$) e **Grupo C** ($0,61\text{-}1,60 \mu\text{g de Hg g}^{-1}$). Estes mesmos indivíduos apresentaram níveis de DDT semelhante entre os grupos, embora com grande variabilidade entre os indivíduos pertencentes ao mesmo grupo (Figura 1).

As comparações entre os três grupos não revelaram diferenças na maioria dos parâmetros analisados, ou seja, peroxidação lipídica (LPO) e a atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), desidrogenase glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutathione peroxidase (GPx) e redutase (GR) (Figura 2). Por outro lado, a glutathione S-transferase atividade (GST) foi significativamente menor no grupo B e grupo C, em comparação com grupo A, ainda o conteúdo de glutathione reduzida (GSH) não foi significativo apesar do aumento de 35% do grupo B e 19% no grupo C em relação ao grupo A (figura 3). O ácido delta-

aminolevulínico desidratase (δ -ALAD) foi maior no grupo C, que é o grupo com maior contaminação de Hg (Figura 4).

As análises de correlação, considerados os níveis de mercúrio de todas as amostras, revelaram correlação negativa apenas da CAT ($r = - 0,4558$, $p = 0,0003$; Figura 5) em relação ao aumento de bioacumulação de mercúrio, corroborando o efeito do metal sobre a atividade desta enzima. O DDT e seu metabólito DDE tiveram correlação positiva ($r = 0,87$, $p = 0,0001$), indicando a bioativação metabólica contínua de DDT através da produção de DDE (Figura 5).

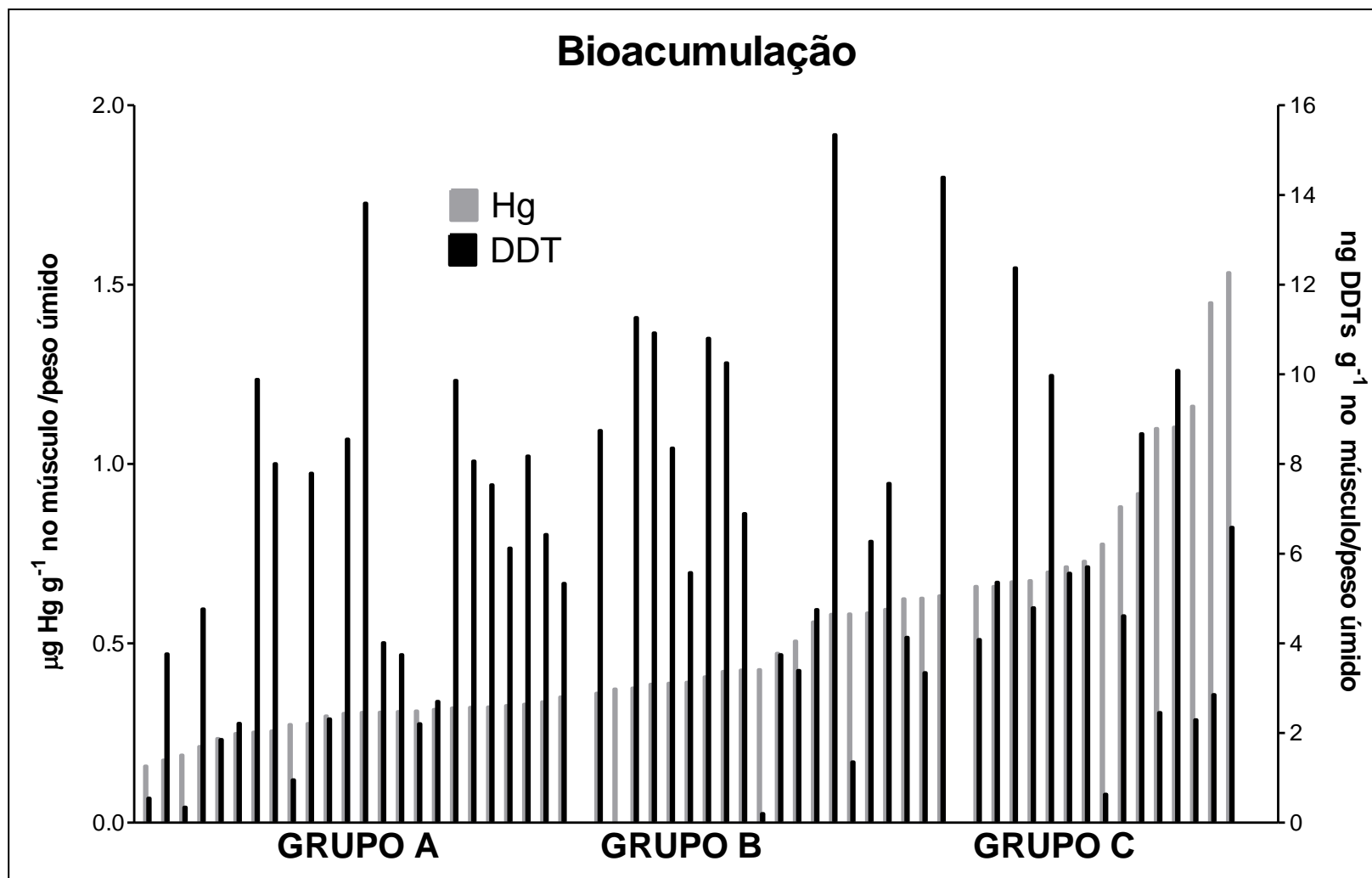


Figura 1 – Bioacumulação de mercúrio total e DDT no músculo de 59 indivíduos de *C. monoculus* provenientes dos grupos **A (GA)** ($0.10\text{-}0.35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), grupo **B (GB)** ($0.36\text{-}0.60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$) e grupo **C (GC)** ($0.61\text{-}1.60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). Média dos níveis de mercúrio (**Hg**) (média \pm SD), **GA**= $0.280 (\pm 0.044)$, **GB**= $0.449 (\pm 0.092)$, **GC**= $0.776 (\pm 0.244)$ e **DDT total**, **GA**= $5.370 (\pm 2.92)$, **GB**= $6.58 (\pm 3.58)$, **GC**= $5.36 (\pm 2.70)$.

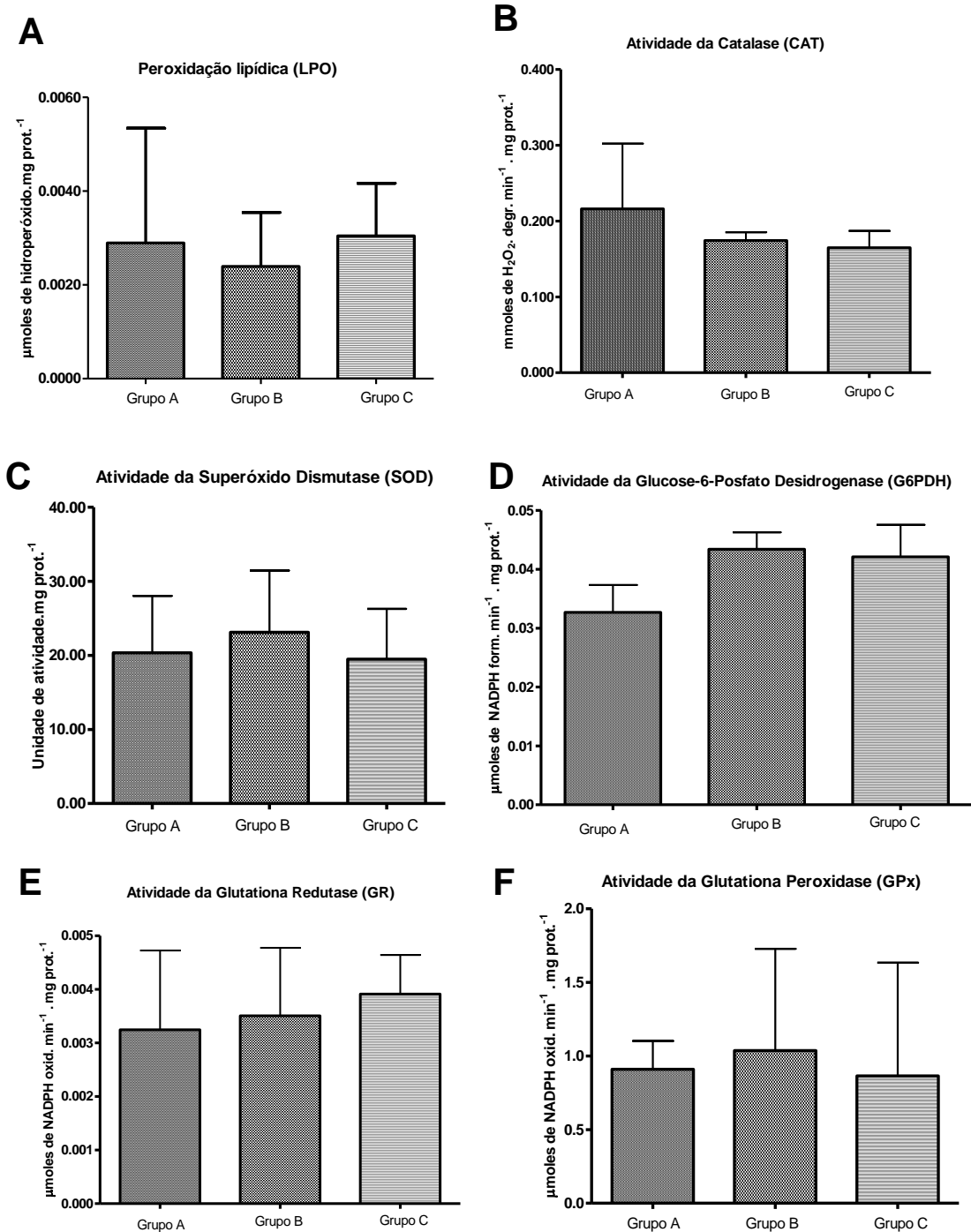


Figura 2 - Biomarcadores de estresse oxidativo: **A:** Peroxidação lipídica (**LPO**) μmoles de hidroperóxido.mg prot.⁻¹; **B:** Atividade da catalase (**CAT**), mmoles of H₂O₂. degr. min⁻¹.mg.prot.⁻¹; **C:** Superóxido desmutase (**SOD**), unidade de atividade.mg prot.⁻¹; **D:** Atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (**G6PDH**), mmoles de NADPH form. min⁻¹.mg prot.⁻¹; **E:** Atividade da glutaciona redutase (**GR**), μmoles de NADPH oxidado. min⁻¹.mg prot.⁻¹; **F:** Atividade da glutaciona peroxidase (**GPx**), μmoles de NADPH oxidado. min⁻¹.mg prot.⁻¹. grupos **A** (0.10-0.35 μg Hg g⁻¹), grupo **B** (0.36-0.60 μg Hg g⁻¹) e grupo **C** (0.61-1.60 μg Hg g⁻¹). Estes biomarcadores não apresentaram diferenças significativas. Média ± desvio padrão da média.

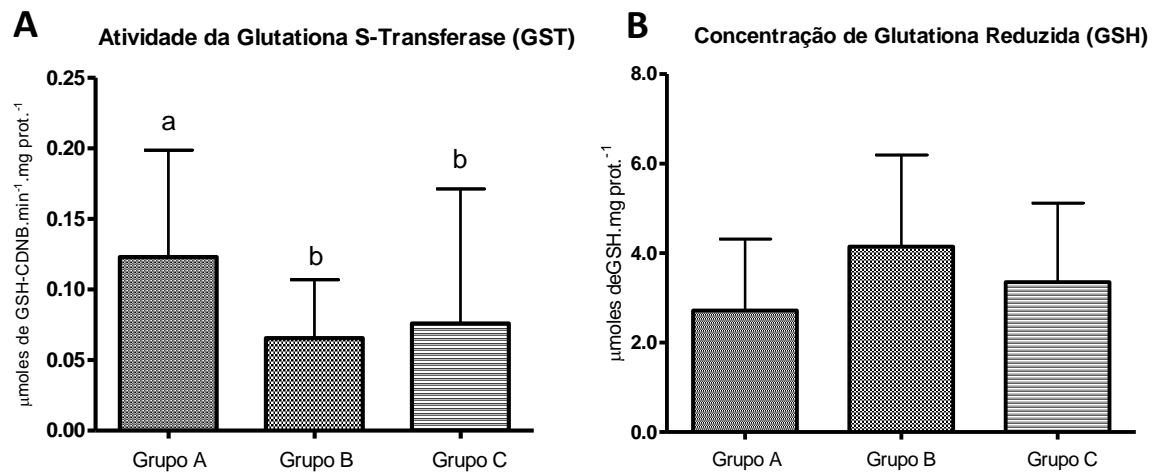


Figura 3 - Comparação entre indivíduos de *C. monocolu* pertencentes aos grupos **A** (0,10-0,35 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), grupo **B** (0,36-0,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$) e grupo **C** (0,61-1,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$). Em **A** - Atividade da glutaciona S-transferase (GST), $p=0,011$. Em **B** - Concentração de glutaciona reduzida (GSH), dados não significativos. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Média \pm desvio padrão da média.

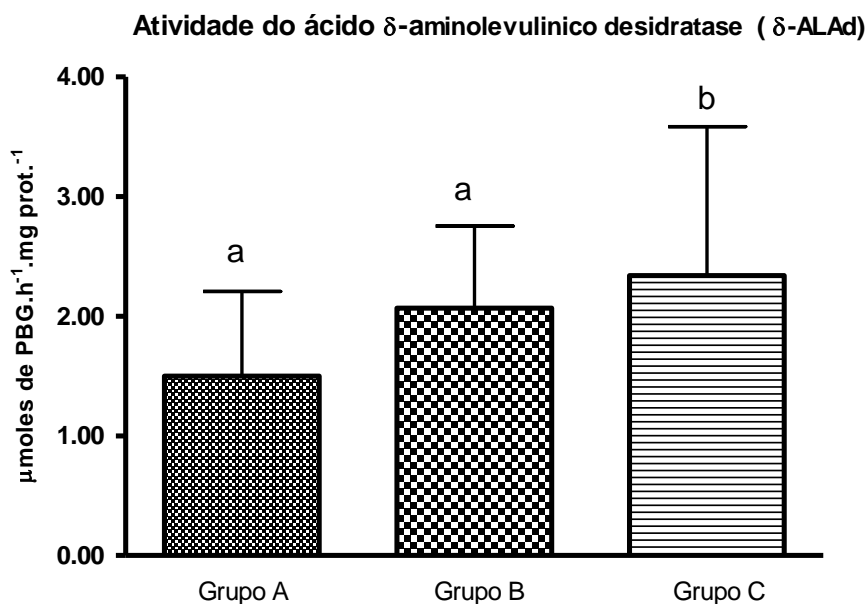


Figura 4 - Atividade do ácido δ -aminolevulinico desidratase (δ -ALA-d). Comparação entre os grupos de *C. monocolu*. Grupo **A** (0,10-0,35 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), grupo **B** (0,36-0,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$) e grupo **C** (0,61-1,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), ($p = 0,0485$). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Média \pm desvio padrão da média.

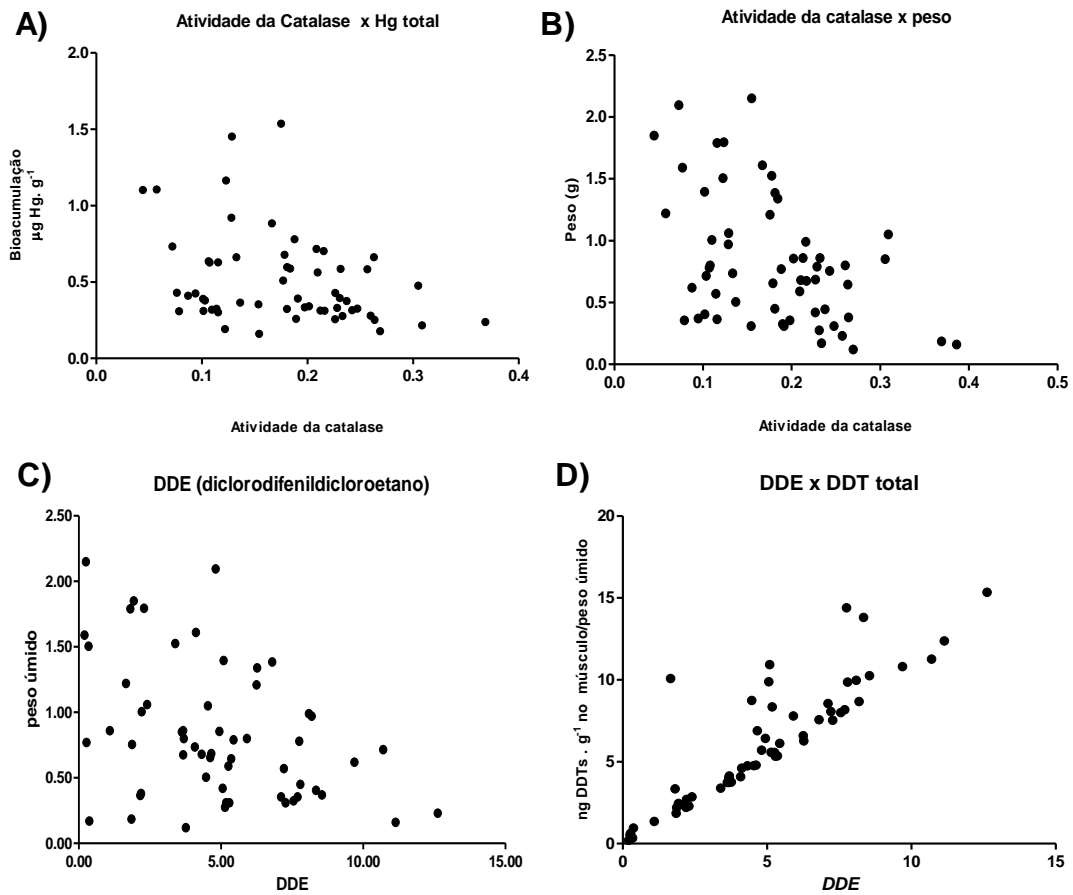


Figura. 5: Correlação entre Hg total e DDT e DDE: **A)** catalase x acumulação Hg - correlação negativa, $r = -0,277$ ($p = 0,0336$); **B)** Atividade da catalase x peso, a correlação negativa $r = -0,4558$, ($p=0,0003$), **C)** DDE x peso correlação, $r = -0,4012$ ($p = 0,018$), **D)** DDE x DDT total, correlação positiva $0,87$, ($p = 0,0001$), ($r^2 = 0,77$). $n = 59$ indivíduos.

4. DISCUSSÃO

Vários trabalhos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a exposição dos animais ao mercúrio é acompanhada pela indução de estresse oxidativo (Nogueira *et al.*, 2003; Filipak Neto *et al.*, 2008; Grotto *et al.*, 2010). No entanto, a exposição crônica natural demonstrou claramente que a testes bioquímicos realizados em *C. monocolus* não foram indicadores eficientes de exposições ao mercúrio e ao DDT, ou dos efeitos tóxicos previamente observados através de avaliação histológica como descrito no capítulo I (Rabitto *et al.*, 2011).

Dos nove biomarcadores analisados no presente estudo para avaliar a presença de estresse oxidativo no fígado de *C. monocolus*, apenas a atividade da GST e δ -ALAD mostraram diferenças significativas entre os três grupos, e a atividade da CAT que mostrou correlação negativa com a bioacumulação de mercúrio no músculo. A análise dos dados em uma abordagem em exposição natural, mesmo se vários biomarcadores são empregados é complexa por causa da influência de fatores bióticos e abióticos sobre respostas de biomarcadores mais sensíveis a estas variações (Sanchez *et al.*, 2008a, 2010), mas que ao mesmo tempo é crucial para definir um sistema de referência que permite uma clara distinção entre um ambiente contaminado e outro não contaminado (Flammarion e Garric, 1999). No caso da Amazônia, estas respostas são particularmente dificultadas devido à ausência de um local de referência livre de mercúrio dadas as peculiaridades de diversidade de fontes já discutidas no capítulo I. Apesar disso, com um número amostral significativo e a distinção de três grupos de indivíduos homogêneos com diferenças significativas entre eles no que se refere à

bioacumulação do Hg no músculo, a presença de uma área de referencia neste caso é desnecessária. Aproveitando esta condição, os dados apresentados aqui são mais representativos, pois a única variável teoricamente parece ser o nível de Hg total no músculo e os níveis dispersos de DDTs, e permitem uma situação quase que experimental para avaliar o uso dos biomarcadores bioquímicos considerados no presente estudo.

O estresse oxidativo é geralmente um dos principais mecanismos envolvidos nos efeitos tóxicos e respostas antioxidantes induzidas por muitos contaminantes, incluindo mercúrio e DDT (Bussolaro *et al.*, 2010). Entretanto, a exposição contínua dos organismos a estes contaminantes pode levar ao desenvolvimento de tolerância e, assim, a maioria dos biomarcadores de estresse oxidativo não se mostrou alterada em *C. monoculus*. Particularmente, os lipídios não foram peroxidados e o conteúdo de GSH manteve-se em níveis normais, embora estes sejam importantes marcadores de estresse oxidativo. A peroxidação lipídica da membrana prejudica as propriedades fundamentais, como a permeabilidade e sua função de barreira, levando à morte celular (Halliwell e Gutteridge, 1989; Montine *et al.*, 2004; Filipak Neto *et al.*, 2008) e redução da concentração de GSH é responsável por esse prejuízo da homeostase redox, desde que o GSH é o primeiro no sistema de defesa contra diversas espécies reativas de oxigênio e radicais livres (Pastore *et al.*, 2003). Então, biomarcadores de resposta rápida podem não ser os melhores biomarcadores para avaliar os efeitos da exposição crônica. Considerando que estes biomarcadores possam ser facilmente modulados pelo ambiente químico celular, não faz destes biomarcadores inapropriados para a avaliação dos efeitos tóxicos sobre as células. Tudo na verdade é uma questão de interpretação, pois se ao mesmo tempo em que não definem uma resposta consistente, em exposições

crônicas, isto não significa que em dado momento o desequilíbrio óxido-redutor não tenha sido o motivo para um dano permanente como a morte celular, desencadeando um processo de necrose.

Com base nestes argumentos, os quais são apoiados pelos danos morfológicos observados e descritos no Capítulo I e melhor explorados no Capítulo III com outras abordagens equivalentes, pode-se dizer que os biomarcadores bioquímicos são úteis para explicar melhor o mecanismo associado ao dano ou alteração como demonstrado por Cuello *et al.* (2010) onde o MeHg e o DDT provocaram estresse oxidativo responsável pela apoptose e necrose em células HepG2, ou por Filipak Neto *et al.* (2008) em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Apesar disso, estes biomarcadores parecem não constituírem uma ferramenta decisiva para afirmar se determinada condição ambiental é de fato impactante para a biota, ou potencialmente deletéria, ou mesmo se ocorre em risco para exposição humana. A situação que ora se apresenta demonstra claramente que esta é uma prerrogativa importante nos estudos de biomonitoramento, pois pouquíssimas vezes foram possíveis uma avaliação a este nível, onde os dados de bioacumulação acusam efeitos deletérios permanentes, mas estes não são corroborados por biomarcadores em níveis mais baixos de organização biológica. Este é um argumento irrefutável de que os biomarcadores bioquímicos, como os discutidos neste trabalho, são muito úteis em condições experimentais ou em condições onde há um forte impacto ambiental, mas mostram insuficientes para um diagnóstico onde as diferenças entre os grupos testados não são tão expressivas.

Por sua vez a histopatologia se reafirma como um biomarcador essencial para avaliações de exposição crônica em ambientes naturais, uma vez que alguns tecidos alvos podem registrar lesões tanto agudas como crônicas podendo ser reversíveis

ou irreversíveis. No primeiro caso, a exposição contínua pode manter a presença de lesões, devido a uma lesão permanente e reparo dos tecidos, enquanto o segundo pode ser observado por muito tempo após ser estabelecido. Várias alterações severas nas brânquias e fígado de *C. monoculus* (Rabitto *et al.*, 2011) confirmam esta hipótese. Particularmente, áreas de necrose indicam a ocorrência de efeitos tóxicos que comprometem o funcionamento do tecido e lesões pré neoplásicas ou neoplasias indicam exposição crônica irreversível de alto grau patológico.

Embora a maioria dos biomarcadores bioquímicos não tenha sido alterada, a correlação negativa entre a atividade da CAT e bioacumulação de Hg demonstra claramente os efeitos tóxicos do mercúrio já relatado para sangue de seres humanos (Pinheiro *et al.*, 2008) e em outros estudos com outras espécies animais (Abdel-Hamid *et al.*, 2001) inclusive peixes (Grotto *et al.*, 2010). Estes dados apontam que a catalase é especialmente afetada pela presença do mercúrio, como já relatado experimentalmente e pode ser útil na avaliação da presença deste poluente ou de outros metais tóxicos que apresentem um comportamento semelhante ao do Hg mesmo em ambientes naturais.

Outro aspecto importante neste trabalho foi a utilização da atividade da δ -ALAD na avaliação dos efeitos do Hg em peixes. Experimentalmente foi observado que esta enzima é afetada significativamente diminuindo sua atividade em estudos experimentais com *Hoplias malabaricus* trófica e subcronicamente exposta ao MeHg^+ (Alves Costa *et al.*, 2007), efeito semelhante ao observado pelo chumbo inorgânico (II). Os dados obtidos no trabalho de Alves Costa e colaboradores (2007) mostram que esta enzima pode ser sensível à presença tanto do Pb como do MeHg em peixes, sendo, portanto uma alternativa minimamente interessante, uma vez que pode também estar relacionada com o estresse oxidativo. Neste caso o acúmulo do

substrato ALA no citosol pode ser tóxico para a célula iniciando mecanismos de geração de espécies reativas interferindo com o equilíbrio óxido-redutor da célula. Além disso, o mau funcionamento desta importante via de incorporação do ferro no grupo heme das hemoglobinas é um fator que é associado em maior escala com quadros de anemia (Alves Costa *et al.*, 2007). Outros autores têm defendido a utilização da atividade desta enzima na identificação dos mecanismos de estresse oxidativo pela sua alta sensibilidade a oxidação de grupos-SH (Valentini *et al.*, 2007, 2008) e a alta reatividade do mercúrio com esses grupamentos químicos (Ercal *et al.*, 2001). Os dados presentes neste trabalho parecem mostrar exatamente o inverso onde em animais com maiores níveis de Hg apresentaram uma ativação na atividade desta enzima. Neste caso outras interpretações para explicar este aumento na atividade são possíveis como, por exemplo, uma resposta fisiológica para suprir os efeitos do Hg na concentração de hemoglobina, como relatado por Oliveira Ribeiro *et al.* (2006) em *Hoplias malabaricus* expostos trófica e subcronicamente ao MeHg⁺.

Finalmente, as atividades mais baixas de GST no grupo B e grupo C comparativamente ao grupo A podem levar a um aumento da sensibilidade das células a outros contaminantes celulares ou mesmo a subprodutos destes ou do metabolismo que exigem uma maior atividade da Fase II do sistema P450 de detoxificação celular (Massela *et al.*, 2005; Cuello *et al.*, 2010). Embora tenhamos observado diferenças entre os grupos para a GST, é difícil saber se as atividades no grupo B e grupo C tinham diminuído ou do grupo A apresentaram aumento da atividade em comparação com os níveis normais das GST. No entanto, esta é uma limitação deste tipo de estudo, onde em tese assumimos que as condições experimentais prevalecem também em condições de campo. O que é correto afirmar

neste caso, é o fato de que as condições de campo são semelhantes, o número de indivíduos considerados nos grupos formados para as avaliações são suficientemente representativos e, portanto este tipo de interpretação pode contar basicamente com apenas uma variável que é a concentração de mercúrio no músculo, a qual apresenta uma relação direta com a concentração também encontrada no fígado de peixes, como descrito por Oliveira Ribeiro *et al.* (2005).

Embora as atividades da CAT, δ -ALAD e GST tenham sido comparadas considerando a bioacumulação de mercúrio, a presença do DDT e seus metabolitos não podem ser ignorados mesmo se presentes em baixas concentrações. Experimentos *in vitro* com hepatócitos de *Hoplias malabaricus* demonstraram efeitos tóxicos do DDT, em concentrações realísticas e acima de tudo, o efeito combinado da associação do DDT e MeHg (Filipak Neto *et al.*, 2008).

Uma comparação histórica das concentrações de DDT e DDE indicam que o DDT e o Hg têm diminuído na região amazônica nos últimos 20 anos, apesar dos peixes continuarem expostos (D'Amato *et al.*, 2002, Bastos *et al.*, 2006), isto, no entanto, não afasta o potencial risco de exposição a estes poluentes na região uma vez que ambos são persistentes no ambiente, são bioacumuláveis e facilmente encontrados em tecidos como o músculo de peixes, importante veículo de contaminação para a espécie humana.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo confirma a importância do monitoramento das condições de exposição de populações expostas ao Hg e DDTs na Amazônia, no entanto, para estabelecer melhor os riscos de exposição a estes poluentes é necessário discutir e avaliar melhor os tipos de parâmetros que devem ser utilizados. Inegavelmente a bioacumulação em tecidos alvos constitui a base para esta discussão. O uso de biomarcadores deve ser adotado, mas com bastantes ressalvas descartando aqueles que têm se demonstrado ineficientes em diagnosticar o potencial efeito para organismos vivos. Os biomarcadores de estresse oxidativo, foco deste Capítulo, devem ser utilizados com cuidado e critério adotando aqueles que podem refletir de forma mais crônica tais possíveis danos. Neste caso é recomendada com base neste estudo, a medida da atividade da Catalase e da GST associados com danos em macromoléculas como LPO, carbonilação de proteínas e danos na estrutura do DNA. Comparativamente, observou-se que os biomarcadores morfológicos mostraram-se mais consistentes e podem favorecer um diagnóstico mais preciso, sendo, portanto bastante úteis e recomendados neste tipo de avaliação ambiental. Outros indicadores poderiam ser adotados como, por exemplo, a expressão da vitelogenina em machos, que constitui hoje um potente biomarcador molecular para avaliar a presença de desreguladores endócrinos. O fato é que há a necessidade de utilizar múltiplos biomarcadores, mas não apenas por uma questão numérica, mas por uma questão de coerência em escolher aqueles que realmente vão se traduzir em dados que de forma consistente possam contribuir para a tomada de decisões.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil-CNPq (projetos 553269/2005-4 e 555543/2006-4). Os autores agradecem todo o apoio logístico e técnico dado por Roberto Keidi Miyai e o Diretor Regional Edgar Temporim Filho da ELETRONORTE Companhia de Rondônia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, H.A.; FAHMY, F.C.; SHARAF, I.A. Influence of free radicals on cardiovascular risk due to occupational exposure to mercury. **J Egypt Public Health Assoc.**, 76:53-69, 2001.

ASCHER, M.; SYVERSEN, T. Methylmercury: recent advances in the understanding of its neurotoxicity. **The Drug Monit.**, 27:278-83, 2005.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Method Enzymol.**, 105, 121-126, 1984.

ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological aspects as biomarker to dietary lead (II) and methylmercury exposure to neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 67:82-8, 2007.

AZEREDO A.; TORRES, J. P. M.; MARLON F. F., JOSÉ, L. B.; BASTOS, W.R.; AZEVEDO E SILVA, C. E. CAVALCANTI, G.; MEIRE, R.O.; SARCINELLI, P.N.; CLUDIO, L.; MARKOWITZ, S.; MALM, O. DDT and its metabolites in breast milk from the Madeira River basin in the Amazon, Brazil. **Chemosphere**, 73, S246-S251, 2008.

BASTOS, W. R.; GOMES, J. P.O.; OLIVEIRA, R.C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E. L. BERNARDI, J. V.E.; LACERDA, L.D. SILVEIRA, E.G.; PFEIFFER, W. C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Sci.Total Environ.**, 368 344- 351, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.**, 72:248-254, 1976.

BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. **Toxicol. In Vitro**, 24, 1491-1497, 2010.

CRESPO-LÓPEZ, M.E.; SÁ, A.L.; HERCULANO, A.M.; BURBANO, R.R.; NASCIMENTO, J.L.M. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cells lines of the central nervous systems. **Environ. Int.**, 33:141-6, 2007.

CUELLO, S.; GOYA, L.; MADRID, Y.; CAMPUZANO, S.; BRAVO, M. P.L.; CÁMARA C.; RAMOS, S. Molecular mechanisms of methylmercury-,induced cell death in human HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 1405-1411, 2010.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, 30:235-241, 1981.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M., MALM, O. DDT (Diclodifeniltricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental – Uma Revisão. **Quim. Nova**, vol.25, No. 6, 995-1002, 2002.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. **Curr. Top Med. Chem.**, 1:529-39, 2001.

FARINA, M.; SOARES, F.A.; FEOLI, A.; ROEHRING, C.; BRUSQUE, A.M.; ROTTA L. In vitro effects of selenite and mercuric chloride on liver thiobarbituric acid-reactive substances and non-protein thiols from rats: Influences of dietary cholesterol and polyunsaturated and saturated fatty acids. **Basic Nutr. Investig.**, 19:531-5, 2003.

FLAMMARION, P.; GARRIC, J. A statistical approach for classifying the extent of EROD induction of fish sampled in clean and contaminated waters. **Water Res.**, 33, 2683-9, 1999.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; NAKAO, L.S.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. **Toxicol. In Vitro**, 22, 1705-1713, 2008.

GB 2763. Maximum Residue Limits for Pesticides in food.

GROTTO, D.; BARCELOS, G.M.; GARCIA, S.C.; BARBOSA, F. Low level and sub-chronic exposure to methylmercury induces hypertension in rats: nitric oxide depletion and oxidative damage as possible mechanisms. **Arch. Toxicol.**, 83:653-62, 2009.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; FILLION, M.; PASSOS, C.J.S.; GARCIA, S.C.; MERGLER, D.; BARBOSA, J.R.; F. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Sci. Total Environ.**, 408, 806-811, 2010.

GLOCK, G.E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem. J.**, v.55, p.400-408, 1953.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 2a ed. Clarendon, Press, Oxford, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; Cross, C.E. Free radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, 119:598-620, 1992.

HARRIS, C.A.; WOOLRIDGE, M.W.; HAY, A.W.M. Factors affecting the transfer of organochlorine pesticides residues to breast milk. **Chemosphere** 43, 243-256, 2001.

HINCK, J.E.; NORSTROM, R.J.; ORAZIO, C.E.; SCHMITT, C. J.; TILLITT, D.E. Persistence of organochlorine chemical residues in fish from the Tombigbee River (Alabama, USA): Continuing risk to wildlife from a former DDT manufacturing facility. **Environ. Poll.**, 157, 582-591, 2009.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, 26:853-856, 1991.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal. Biochem.**, 202:384-389, 1992.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases **J. Biol. Chem.**, 251, 6183-6188, 1976.

LÓPEZ, F.O.; HERNÁNDEZ, A.F.; RODRIGO, L.; GIL, F.; PENA, G.; SERRANO, J.L.; PARRÓN, T.; VILLANUEVA, E.; PLA, A. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides, **Toxicol., Lett.** 171, 146-153, 2007.

MASELLA, R.; BENEDETTO, R. D.; VARÍ, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, **Journal of Nutritional Biochemistry.**, 16 (2005) 577-586, 2005.

MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRARIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 68, 426-435, 2007.

MIGLIORI, L.; FABIO, C. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Res.**, 674, 73-84, 2009.

MONTINE, K.S.; QUINN, J.F.; ZHANG, J.; FESSEL, J.P.; ROBERTS, L.J.; MORROW, J.D.; MONTINE, T.J. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. **Chem. Phys. Lipids**, v.128, p.117-124, 2004.

NOGUEIRA, C. W.; SOARES, F.A.; NASCIMENTO, P.C.; MULLER, D.; ROCHA, J. B. T. 2, 3-Dimercaptopropane -1-sulfonic acid and meso-2,3- dimercapto succinic acid increase mercury- and cadmium induced inhibition of σ -aminolevulinatase dehydratase. **Toxicol.**, 184-85-95, 2003.

OLIVEIRA FILHO, A. M. **International Workshop on Organic Micro pollutants in the Environment**, IBCCF-UFRJ. Note no. 1097 AB-Dlo, Ministry of Agriculture, The Netherlands, 1997.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; ROULEAU, C.; PELLETIER, E.; AUDET, C.; TJALVE, H. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Sci .Technol.** 33:902-907, 1999.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PHA and heavy metals in the Eel (*Anguilla Anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic toxicol.** 74, 53-69, 2005.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chim. Acta**, 333, 19-39, 2003.

PÉREZ-MALDONADO, I. N.; HERRERA, C.; BATRESA L. E.; GONZÁLEZ-AMARO, R.; DÍAZ-BARRIGA, F.; YÁÑEZA, L. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. **Environ. Res.**, 98, 177-184, 2005.

PINHEIRO, M.C.N.; MACCHI, B.M.; VIEIRA, J.L.F.; OIKAWA, T.; AMORAS, W.W.; GUIMARAES, G.A.; COSTA, C.A.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; HERCULANOB, A.M.; SILVEIRA, L.C.L. Nascimento, J.L.M. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: A comparative study in the Amazon. **Environ. Res.**, 107, 53-59, 2008.

RABITTO, I.S.; BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ANJOS, A.; HOLANDA, Í. B. B.; GALVÃO R.C.F.; FILIPAK NETO, F.; MENEZES M. L.; SANTOS C. A. M.; OLIVEIRA RIBEIRO C. A. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environ. Int.**, 37 56–65, 2011.

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, 28, 133-145, 1982.

SEBRENSKI, S.G. **Uso de biomarcadores morfológicos e bioquímicos para a avaliação da ação tóxica do mercúrio em peixes da espécie *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) na usina hidrelétrica de Samuel-Rondônia** Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade federal do Paraná, Brasil, 2007

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, 25,192-205,1968.

SHENKER, B.J.; GUO, T.L.; SHAPIRO, I.M. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. **Environ. Res.Section A**, v.84, p.89-99, 2000.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett.**, 103:287-290, 1979.

Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Disponível em: www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf. Acesso em: 03/2010.

TAKAHASHI, K. **Glutathione peroxidase coupled enzyme assay**. In: Taniguchi N Gutteridge, J.M.C. (Ed) *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University Press, London, p.79-80, 1994.

VALENTINI, J.; GROTTTO, D.; PANIZ, C.; ROHERS, M.; BURG, G.; GARCIAB, S.C. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients, **Biomed Pharmacother**, 62, 378-82, 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mercury – environmental aspects**. Geneva. Environmental Health Criteria, 86. 115p, 1989.

ZANA, M.; JANKA Z.; KÁLMÁN, J Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease **Review. Neurobiology of Aging**, 28, 648–676, 2007

RESUMO

Com objetivo investigar o efeito tóxico do Hg e do DDT nos tecidos de *C. monoculus*, amostras de brânquias, fígado e rim anterior foram fixadas em ALFAC para Microscopia de Luz (ML), o segundo arco branquial esquerdo em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1 M e pH 7,2 – 7,4 para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e o fígado foi fixado em Karnovsky para Microscopia Eletrônica de transmissão (MET). Com o objetivo de conhecer a arquitetura morfológica e a estrutura da matriz extracelular foram realizadas análises histológicas e histoquímicas nestes tecidos e para caracterizar os componentes da matriz extracelular (GAGs) das brânquias foi utilizado eletroforese em gel de agarose. Para estas análises foi adaptado o mesmo procedimento dos Capítulos I e II, onde foram considerados três grupos considerando apenas a bioacumulação do mercúrio: **G1** (0,10-0,35 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), **G2** (0,36-0,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$) e **G3** (0,61-1,60 $\mu\text{g de Hg g}^{-1}$). Os resultados das análises foram expressos através de índices de lesão segundo Bernet et al. (1999), que é baseado na determinação de fatores de importância (mínima, moderada ou grave) e um escore para cada alteração. Na análise morfológica através de ML e MEV de brânquias foi considerado o desarranjo das lamelas secundárias, proliferação celular, fusão de lamelas primárias e secundárias, alterações estas que podem potencialmente interferir na funcionalidade do tecido branquial. A análise do fígado e rim anterior tanto para microscopia de luz como MET, foram observadas alterações como: necroses, vacuolização dos hepatócitos e infiltrações leucocitárias bem como centros de destruição de eritrócitos no rim anterior. Estas alterações evidenciam danos ao tecido, ou respostas teciduais que podem indicar prejuízo em suas funções. Observou-se que o mercúrio e o DDT podem estar induzindo alterações em todos os tecidos estudados. Os resultados aqui apresentados constituem dados complementares dos efeitos do Hg e do DDT em peixes amazônicos, após exposição crônica no ambiente, tendo em vista que foram realizadas outras análises que corroboram com estes achados. Concluímos que o mercúrio e o DDT incorporados aos ciclos biogeoquímicos e às cadeias tróficas representam potencial perigo para a saúde dos peixes expostos cronicamente a estes poluentes.

Palavras chaves: Histo e citopatologia. Teleósteo. Biomarcadores. Mercúrio. DDT. Amazônia.

ABSTRACT

With objective to investigate the toxicity of mercury and DDT in tissues of *C. monoculus*, samples of gill, liver and head kidney were fixed in previous lettuce to light Microscopy (LM), the second left gill arch in 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 to 7.4 for electron microscopy (SEM) and the liver was fixed in Karnovsky for transmission electron microscopy (TEM). Aiming to know the architecture and the morphological structure of the extracellular matrix were conducted histological and immunohistochemical these tissues and to characterize the components of the extracellular matrix (GAGs) from the gills was used in agarose gel electrophoresis. For this analysis was molded by the same procedure in chapters I and II, where we considered three groups only considering the bioaccumulation of mercury: G1 (0.10 to 0.35 mg Hg g⁻¹), G2 (0.36-0 , 60 mg Hg g⁻¹) and G3 (0.61 to 1.60 mg of Hg g⁻¹). The analysis results were expressed through injury rates second Bernet et al. (1999), which is based on determining factors of importance (low, moderate or severe) and a score for each change. In the morphological analysis by LM and SEM of gills was considered the breakdown of secondary lamellae, cell proliferation, fusion of primary and secondary lamellae, these changes that can potentially interfere with the functionality of the gill tissue. The analysis of the liver and head kidney for both light microscopy and TEM, changes were observed as necrosis, vacuolization of hepatocytes and leukocyte infiltration and destruction of erythrocytes centers in the head kidney. These changes demonstrate tissue damage or tissue responses that may indicate impairment in their functions. It was noted that mercury and DDT may be inducing changes in all tissues studied. The results presented here provide additional data from the effects of DDT and mercury in Amazonian fish after chronic exposure in the environment, given that other analysis were conducted that corroborate these findings. We conclude that mercury and DDT incorporated in biogeochemical cycles and food chains represent potential danger to the health of fish chronically exposed to these pollutants.

Keywords: Histo and citopathology. Teleost. Biomarkers. Mercury. DDT. Amazon.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de toxicologia ambiental tem como um de seus objetivos, a prevenção dos danos à saúde dos organismos vivos causados por contaminantes de origem antrópica ou não, presentes no ambiente. Tais estudos auxiliam também nos trabalhos investigativos de avaliação e determinação dos níveis máximos permissíveis e posteriormente gerando dados de tal forma que estes níveis sejam mantidos dentro de valores estabelecidos e aceitáveis (Amorin, 2003). Para isso, tornam-se necessárias a identificação e quantificação do risco ambiental através de agentes encontrados no próprio ambiente. Este trabalho visa a avaliação de respostas biológicas, através de diversos biomarcadores, encontradas em peixes com a finalidade de avaliar a exposição natural e crônica ao mercúrio e ao DDT e estimar riscos que possam causar às populações expostas.

Os estudos das substâncias químicas sobre a saúde possibilitam avaliar o risco da população exposta e constitui o primeiro passo na fixação de normas ambientais para um contaminante químico presente num meio. E para isso é importante conhecer a solidez e as limitações dos dados toxicológicos, assim como as informações disponíveis provenientes destes estudos (WHO, 2000). Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição, os quais são instrumentos que possibilitam identificar a substância tóxica ou uma condição adversa antes que sejam evidenciados danos à saúde (Amorim, 2003; WHO, 1996).

Os biomarcadores ambientais podem fornecer respostas biológicas diversas que podem se apresentar em diversos níveis de organização, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares (Walter *et al.*, 1997). Na literatura são classificados

como: Biomarcadores de “exposição”, que são os que estimam a dose interna ou a biodisponibilidade de um xenobiótico. Podendo ser utilizados para avaliar a exposição individual ou de um grupo, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna. Já os biomarcadores de “efeito” podem ser usados para documentar as alterações ou efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição e absorção da substância química. São caracterizados pela indução de mecanismos de defesa celular, podendo ser desencadeadas alterações fisiológicas ou histológicas, podendo ser ou não reversíveis (Zagatto e Bertolotti, 2006). Ainda os biomarcadores de “susceptibilidade” que permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos (Rüdiger, 1999; WHO 1993), pois organismos da mesma espécie podem não responder igualmente à exposição aos xenobióticos, dependendo da variação de diversos fatores individuais e ambientais.

Para se obter conhecimentos científicos e capacitação necessária para avaliar e controlar os perigos à saúde de origem ambiental, muitas vezes, necessitamos as mesmas abordagens dos perigos para a saúde no local de trabalho, são os instrumentos básicos da ciência do meio ambiente. O processo de avaliação e gestão de riscos é também o mesmo, ou seja, identificação do perigo, avaliação da dose-resposta, avaliação da exposição e estimativa do risco. Assim, a saúde no trabalho e a saúde no meio ambiente estão estritamente ligadas por metodologias comuns, especialmente em relação à avaliação da saúde e ao controle da exposição (Yassi e Kjellström, 2001).

As concentrações ambientais aceitáveis são referenciadas em normas internacionais e na comunidade científica. Deve ser considerado, portanto, que algumas destas normas podem não ter como base estudos de toxicidade confiáveis e adequados e não serem apropriadas para indivíduos sensíveis ou para exposições crônicas. A realização de estudos ambientais utilizando estes parâmetros biológicos na avaliação do risco químico e ambiental são fundamentais (Amorim, 2003).

O biomonitoramento humano mostrou que aliado ao biomonitoramento ambiental, fornece consistente subsídio para decisões em saúde, porém há necessidade de se buscar mais informações sobre os efeitos na saúde dos diferentes contaminantes ambientais e melhorar a interpretação dos dados de biomonitoramento. Existe necessidade urgente de se definir valores limite e valores de referência adequados no Brasil, levando-se em conta as diferenças intrínsecas da população e da exposição, quando comparadas com outras partes do mundo. Conclusões equivocadas na estimativa do risco da exposição aos contaminantes dificultam a interpretação e o entendimento da gestão integrada ocupacional/ambiental (Kuno *et al.*, 2010).

O uso de biomarcadores permite a análise de exposição a baixos níveis, e a níveis crônicos, fornecendo conhecimentos e evidências científicas necessários para a aplicação de medidas de prevenção e controle da exposição aos agentes químicos ambientais no âmbito das políticas públicas. Desta forma este trabalho objetiva fornecer informações que auxiliem a escolha de biomarcadores que possam responder as diversas necessidades ambientais e humanas em relação a melhor resposta para cada caso.

Neste capítulo objetivamos demonstrar os diversos biomarcadores histopatológicos e outros possíveis biomarcadores que possam contribuir com os

demais biomarcadores utilizados e discutir a importância de se estabelecer a união de diversas análises que auxiliem na identificação de relações entre as respostas dos biomarcadores e os efeitos ecologicamente relevantes.

CAPÍTULO III

Avaliação morfológica da exposição crônica e natural ao mercúrio e DDTs em *C. monoculus* e novas perspectivas de biomarcadores

OBJETIVOS

- Objetivo geral

- Estudar através de análises morfológicas em tecidos alvos o efeito tóxico da exposição natural de mercúrio e de DDTs em *Cichla monoculus*.

- Objetivos específicos

- Descrever a arquitetura geral dos tecidos em fígado, brânquias e rim anterior de *C. monoculus*;

- Avaliar através do índice de lesão no órgão se o mercúrio e os DDTs interferem com a funcionalidade dos mesmos;

- Avaliar se o perfil dos carboidratos em células mucosas das brânquias é alterado pela exposição ao mercúrio e os DDTs;

- Avaliar os efeitos do mercúrio e de DDTs na composição da matriz extracelular das brânquias de *C. monoculus* através da marcação de colágeno;

- Verificar se o mercúrio e os DDTs alteram os componentes glicosaminoglicanos de matriz extracelular em tecidos alvos de *C. monoculus* através de análise bioquímica em gel de agarose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análises Cito e Histopatológica de Tecidos Alvos

3.1.1 Microscopia de Luz de fígado, brânquias e rim anterior de *C. monoculus*

- Coloração com Hematoxilina e Eosina - detecção da arquitetura morfológica.

As amostras dos tecidos foram coletadas e processadas conforme descrito no Capítulo I.

- Coloração com Ácido Periódico - Reativo de Schiff (P.A.S.) - detecção do perfil dos carboidratos do tecido das brânquias.

O protocolo de coleta segue o que consta para hematoxilina e eosina. Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram colocados em solução de ácido periódico 0,5% durante 5 minutos e lavados em água destilada (3 banhos rápidos). Passados em reativo de Schiff durante 20 minutos e posteriormente em solução de água sulfurosa (10 ml de bissulfito de sódio 10%, 10 ml de HCl 1 N em água destilada q.s.p. 200 ml) (3 banhos de 2 minutos cada), sendo lavados a seguir em água corrente por 10 minutos. Em seguida, foram desidratados em série crescente de etanol (70 a 100%, por 5 minutos cada etapa), diafanizados com xilol (2 vezes de 5 minutos cada etapa) e montados com Entelan. Para controle negativo da reação, será omitida a etapa em que os cortes passam pela solução de ácido periódico.

- Coloração com Azul de Alcian - O protocolo de coleta segue o que consta para hematoxilina e eosina

Os cortes desparafinizados e hidratados, foram corados com solução de azul de Alcian, pH 1,0 (para carboidratos sulfatados) e pH 2,5 (para carboidratos carboxilados) durante 30 minutos, montados e observados em microscópio de luz.

- Coloração com Picrosirius - Análise de fibras colágenas da matriz em fígado, brânquias e rim anterior.

O protocolo de coleta segue o que consta para hematoxilina e eosina. Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram corados com picrosirius por uma hora, passados por uma solução de HCl 0.01 M por dois minutos e lavados em água destilada durante dois minutos. Foram então corados com hematoxilina de Harris por um minuto, lavados em água corrente por dez minutos e desidratados em soluções crescentes de etanol (90 a 100% por 5 minutos cada etapa), diafanizados com xilol (2 vezes de 5 minutos cada etapa) e montados com Entelan.

3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de fígado de *C. monocolus*

O fígado coletado para microscopia eletrônica foi fixado em Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 4% e cloreto de cálcio 0,05 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 a 7,4) por 2 horas em temperatura ambiente. Após o período de fixação os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato 0,1 M, pós-fixados em ósmio, lavados em cacodilato 0,1 M e realizada a técnica de uranila em bloco e desidratados em série alcólica crescente e em óxido de propileno. A inclusão foi em resina PolyEMBED812 (EMS Co.) e posteriormente cortados em ultramicrótomo. Os cortes ultrafinos foram montados em telinhas de cobre de 200 mesh, contrastados em uranila 5% por 20 minutos e em citrato de

chumbo (Reynolds, 1963) por cinco minutos. Posteriormente foram analisados em microscópio eletrônico JEOL TEM 1200 EX II.

3.3. Caracterização dos componentes de matriz extracelular

Os órgãos (fígado, brânquias e rim anterior) foram removidos, colocados em Acetona onde permaneceram até o processamento. Posteriormente, foram picoteados com auxílio de uma tesoura e mantidos na acetona por mais 24 horas até a evaporação da acetona e obtenção do pó cetônico. Este foi pesado para normatização das diferentes amostras. Posteriormente, ao pó cetônico foi adicionado maxatase (uma protease alcalina) (4 mg/ml em Tris/HCl 15 mM, pH 8,0 contendo 1 M de NaCl), sendo a mistura mantida “overnight” a 56°C. Ao término da incubação, as proteínas foram precipitadas pela adição lenta de TCA (ácido tricloroacético) 10% (v/v). Ao sobrenadante foram adicionados 3 volumes de Etanol, o qual foi mantido “overnight” a - 20 °C. Posteriormente a mistura foi centrifugada (2000g por 20 min) e o “pellet” seco em estufa a 60 °C. Os glicosaminoglicanos (GAGs) foram obtidos neste “pellet” da fração alcoólica, sendo que o mesmo foi resuspenso em 50 µl de água.

- Eletroforese em gel de agarose

Uma alíquota da amostra alcoólica obtida foi submetida à eletroforese em gel de agarose (Jaques *et al.*, 1968), tampão PDA (1,3 diaminopropanol) pH 9,0 (o qual separa por afinidade à diamina do tampão, heparan sulfato, dermatan sulfato e condroitin sulfato, sendo que a heparina migra com o heparan sulfato). Os GAGs foram submetidos à eletroforese em caixa refrigerada, utilizando o mesmo tampão do gel. A corrida eletroforética dos compostos foi realizada com uma diferença de potencial de 100V, durante um período de aproximadamente 1 hora, conforme descrito por Dietrich e Dietrich (1976). Ao final da corrida eletroforética, os GAGs foram precipitados com Brometo de Cetiltrimetilamônio 0,1% (v/v), seco sob ventilação e calor e então corado com azul de toluidina 0,01% em solução

de 50% de etanol e 1% de ácido acético por 15 min, sendo descorado com a mesma solução, sem o corante. Os GAGs foram quantificados pela densitometria a 540nm, utilizando como padrão, amostras com massa conhecidas de condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato.

3.4. Análises histopatológicas

Os resultados foram expressos pela análise das lesões histopatológicas, e os índices de lesão do fígado e rim anterior foram determinados de acordo com Bernet *et al.* (1999) como descrito no Capítulo I. Utilizou-se a fórmula: $IL = \sum pr \sum alt (a \times w)$. Onde: pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância.

3.4.1. Análises estatísticas

Para analisar os dados gerados pelo índice de Bernet foi utilizado o programa GraphPad Prisma, teste ANOVA com pós teste "Tukey's Multiple Comparison Test". Para realizar os testes de normalidade foi utilizado a teste, "Shapiro-Wilk normality test" e quando os dados foram considerados não paramétricos foi utilizado o kruskal Wallis test e pós teste "Dunn's Multiple Comparison Test". Considerou-se um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Histopatologia de rim anterior de *C. monoculus*

As análises histopatológicas do rim anterior foram realizadas observando-se as lâminas em H.E. e seguindo a divisão de três grupos distintos baseados na bioacumulação do Hg em músculo conforme descrito no Capítulo I. No Grupo A foi observado o aspecto heterogêneo característico do rim anterior dos teleósteos. Verificou-se que esta espécie mantém regiões de concentração de eritrócitos (Figura 1A) e regiões com predomínio de células indiferenciadas, leucócitos e macrófagos em formação. Algumas áreas apresentaram regiões de aspecto acelular amorfo circundado por grande concentração de eritrócito e foram identificadas como sendo centros de destruição de eritrócitos, devido ao aspecto deteriorado que se encontram estas áreas (Figura 1B). Áreas de concentração de eritrócitos também apresentam infiltrações de leucócitos (Figura 1C) e outras com predomínio de áreas basofílicas com vários tipos celulares (Figura 1D). A figura 2 (A e C) mostra um tecido com aspecto bastante alterado, com regiões repletas de centros de melanomacrófaos (CMM) e melanomacrófaos livres (ML). Também foi observada a presença de neoplasia (Figura 2B). A presença de células interrenais característica do tecido renal dos teleósteos e responsáveis por secreção de catecolaminas foram também identificadas (Figura 2D). Detalhes dos CMM podem ser observados na Figura 3 (A e B), mostrando a formação de grandes CMM em torno de vasos. Diferentes estágios de formação dos CMM parecem estar presentes neste tecido (Figuras 3B e 3B1). A formação de neoplasias foi identificada também nas Figuras 3C e 3D, mostrando em detalhe a presença de pigmentos que aparecem associados à formação das neoplasias.

No Grupo B com níveis de contaminação de Hg entre (0,36-060 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), foram observadas alterações como infiltração de leucócitos (Figura 4A e B), mas o tecido renal característico é representado pelo parênquima heterogêneo com células que formam sinusóides renais (Figura 4C) e CMM distribuídos pelo tecido e quase sempre associados aos vasos (Figura 4D).

Nos indivíduos encontrados no Grupo C pode-se observar uma grande quantidade de infiltração de leucócitos (Figura 5A) e células alteradas destacadas no parênquima (Figura 5B) assim como círculos celulares com células sendo encapsuladas, possivelmente focos de neoplasias (Figura 5C). Possíveis centros de destruição de eritrócitos e espaços entre as células, preenchidos por substância amorfa não identificada são também observados (Figura 5D). Grandes CMM são observados nestes indivíduos próximo a grandes e pequenos vasos (Figura 6A), entre áreas de infiltração de leucócitos (Figura 6B) ou mesmo associados a focos de neoplasia (Figura 6C). Podemos observar também a presença do tecido rico em eritrócitos e do tecido rico em células basofílicas, formado por células indiferenciadas e leucócitos. Uma grande quantidade de CMM pode ser observada na figura 6D.

4.2. Histopatologia de Fígado de *C. monoculus*

O fígado de *C. monoculus*, mostrou uma organização estrutural muito parecida com o observado para outros teleósteos, composto em sua maioria de hepatócitos com núcleos arredondados e nucléolos evidentes. O parênquima hepático é preenchido com sinusóides, veias, dutos biliares e vários grupos celulares constituindo os hepatopancreas (Figuras 7A e C). Nos indivíduos do Grupo A os hepatócitos apresentam uma grande quantidade de vacuolização citoplasmática possivelmente uma esteatose (acúmulo de vesículas de gordura no fígado)(Figura 7B) e áreas de necroses, também observadas nos outros grupos analisados (Figura 7D). No Grupo B a concentração de vacuolização citoplasmática é mais evidenciada (Figura 8A e 8B), e se concentra em torno do tecido pancreático tomando quase todo o citoplasma de alguns hepatócitos. O sinusóides e veia porta característicos são observados na Figura 8C. Os CMMs se concentram perto das veias como ocorre no rim anterior e aqui também se associam ao tecido pancreático (Figura 8D).

No Grupo C, que apresenta os níveis mais altos de mercúrio, o citoplasma dos hepatócitos contém grande número de vacuolização (Figuras 9A e 9B), ou áreas onde os

hepatócitos encontram-se ausentes (Figura 9B), o que pode indicar áreas de necrose difusa. A presença de CMM na área pode ajudar a identificar estas áreas (Figura 9B), uma vez que estas estruturas estão ligadas a função de limpeza do tecido. Neste grupo o número de CMMs aumenta por todo o parênquima se comparado aos outros grupos considerados (Figuras 9C e 9D).

4.3. Ultraestrutura de fígado de *C. monoculus*

As observações em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) confirmam os achados observados e descritos no Grupo A (Figura 10A e 10B). Apesar de não ser possível observar o formato hexagonal dos hepatócitos característica dos peixes teleósteos, devido a uma preservação deficiente do tecido, podemos observar núcleos esférico, geralmente centrais, com eucromatina clara e homogênea, demonstrando a alta atividade metabólica destas células. No Grupo B (Figura 10C e 10D), observamos células com núcleos picnóticos, grande quantidade de vesículas e Retículo Endoplasmático Granular (REG) e mitocôndrias próximas ao núcleo, revelando alta atividade celular.

No Grupo C, também observamos uma situação idêntica ao Grupo B (Figura 11A), com núcleos disformes e picnótico (rico em heterocromatina) (Figura 11B) e áreas de necrose. Observa-se nas Figuras 11C e 11D a presença de vesículas citoplasmáticas eletrodensas, cujo papel não foi esclarecido. É observada uma grande quantidade de REG por todo o citoplasma, o que é incomum na descrição de hepatócitos de peixes teleósteos, no entanto, a concentração destes nos limites celulares e posicionados de forma perinuclear pode se tratar de uma característica específica para o fígado de *C. monoculus*.

4.4. Histopatologia de brânquias de *C. monoculus*

Os resultados de histopatologia das brânquias de *C. monoculus* indicaram alterações em todos os indivíduos avaliados. Os três grupos considerados apresentaram as mesmas

alterações, confirmados pelas observações realizadas pelo índice proposto por Bernet e colaboradores.

As alterações encontradas em todos os grupos foram basicamente: Infiltração de leucócitos (Figura 12A e B); nas lamelas secundárias, observamos a fusão das mesmas (Figura 12C) e lamelas secundárias atrofiadas (Figura 12D). Algumas amostras apresentaram lamelas com início de fusão lamelar de um lado e do outro lado na mesma lamela primária, apresentando lamelas secundárias atrofiadas (Figura 12 D). Os Aneurismas (Figura 12E) ocorreram em todos os grupos, porém, com pouca frequência, assim como o descolamento de epitélio e edema de lamela secundária, que ocorreram simultaneamente (Figura 12F), ou seja, quando ocorreu descolamento de lamela, ocorreu o edema. Outra alteração bastante comum foi a presença de exsudato (matéria resultante de processo inflamatório saindo de vasos sanguíneos e se depositando em tecidos ou superfícies teciduais, sendo constituídos de líquidos e fragmentos celulares) (Figura 13A), embora a necrose não tenha sido uma lesão muito frequente, ocorreu em todos os grupos (Figura 13B). Eventos de hiperplasia parcial de lamela secundária (Figura 13C) e hiperplasia total de lamela secundária (Figura 13D) foram observados, sendo a alteração que recorre, algumas vezes acompanhada de pigmentos celulares. Tumores benignos ocorrem em poucas amostras, porém presente em todos os grupos.

Parasitas ocorreram em todos os grupos (Figura 14A). Estes se alojam entre as lamelas secundárias e apresentam-se em diferentes estruturas, em alguns casos sugerindo estagios reprodutivos (Figura 14B). Na ausência de exoparasitos maiores observa-se locais ocupados pelos mesmos (Figura em detalhe, 14B1 e 14E) provavelmente expelidos pelo procedimento de preparação do material para análise. A localização de células mucosas presentes nas brânquias foi observada na base da lamela primária (Figura 14C) ou ainda na parte apical da lamela secundária, quando as lamelas aparecem hiperplásicas (Figura 14D). A natureza dos mucopolissacarídeos variam de neutro pela coloração positiva pelo PAS (Figura 14 C-D) e carboxilados pela coloração em Alcian Blue (pH 2,5) (Figura 14F)

também na base da lamela primária (Figura 14G), indicando a presença de dois tipos de polissacarídeos: neutros e ácidos.

4.4. Distribuição de colágeno nas brânquias, fígado e rim anterior de *C. monoculus*

As lâminas das brânquias, rim anterior e fígado foram corados com a coloração picrosirius red e observadas no microscópio de luz polarizada. As análises do fígado e do rim anterior demonstraram uma quantidade muito pequena ou inexistente de colágeno distribuído no parênquima. No fígado esta distribuição restringe-se às áreas próximas aos vasos e no rim não foi identificada, o que não possibilitou uma comparação entre os grupos considerados neste estudo.

As lâminas das brânquias foram observadas na coloração com picrosirius red, utilizando-se microscopia de campo claro (Figuras 15A, B e C) e microscopia de polarização (Figuras 15A1, B1 e C1). As diferenças na coloração observadas na microscopia de polarização sugerem diferentes tipos de colágeno. Observamos também mudanças na distribuição e na densidade do colágeno.

Na figura 15 foram observadas diferenças nítidas nas tonalidades verdes e vermelhas quando o material é exposto à luz polarizada, principalmente no grupo com maior concentração de mercúrio, Grupo C (Figura 15C1). As fibras colágenas Tipo I se apresentam pela coloração amarela, laranja e avermelhada, enquanto as fibras Tipo III estão expressas pela cor verde. Nos três grupos, as fibras Tipo I foram predominantes, só apresentando-se entrelaçadas pelas fibras Tipo III (fibrilas) no Grupo C. Não só a mudança na coloração foi observada, mas também na densidade destas fibras no Grupo B (Figura 15 B2) e no Grupo C (Figura 15 C1), podendo fornecer indícios de uma reparação ou remodelamento mais intenso do tecido branquial nestes grupos.

4.5. Caracterização dos componentes de matriz extracelular

A fim de determinar o perfil dos glicosaminoglicanos nos diferentes órgãos (rim anterior, fígado e brânquias), realizamos um teste com a enzima maxatase (uma protease alcalina). Uma vez realizado este teste, verificou-se um resultado insatisfatório na qualidade da digestão dos órgãos do rim anterior e fígado. Foram, testadas, duas novas enzimas: pronase e proteinase K, para obtermos uma melhor digestão. O resultado verificado (figura 16A) foi a ausência de GAGs detectáveis por este método, na amostra de rim anterior, tanto para o pronase como para proteinase K, para as brânquias houve uma digestão parcial para as duas enzimas testadas. No fígado, houve um resultado positivo para a pronase, aparecendo uma pequena banda de dermatan e uma banda muito fraca com proteinase K. A partir destas análises decidimos utilizar a maxatase como enzima de digestão das brânquias e utilizar apenas as brânquias para esta análise, devido ao fato que o rim e o fígado apresentam uma massa muito pequena para a extração dos GAGs. Sugerimos que para uma boa análise os órgãos devem ser coletados exclusivamente para este fim.

Foi realizada a caracterização dos componentes de matriz extracelular, (condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato) em brânquias, órgão escolhido como sendo o melhor para padronização dos glicosaminoglicanos (GAGs) (figura 16B, C e D) nesta espécie. Os GAGs foram quantificados, utilizando como amostras padrão de condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato. As leituras foram realizadas tendo em vista os grupos segundo o nível de contaminação de mercúrio sendo: **grupo A** ($0,10-0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), **grupo B** ($0,36-0,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), **grupo C** ($0,61-1,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$) utilizando um “n” de cinco indivíduos para cada grupo. Dados preliminares demonstraram diferenças visuais na concentração de glicosaminoglicanos, principalmente no grupo mais contaminado, no entanto, se faz necessária leitura em espectrofotômetro para se obter uma resposta mais precisa e confiável. Esta metodologia deverá ser melhor padronizadas para peixes, uma vez que existem poucos trabalhos que utilizaram esta metodologia para

detecção de glicosaminoglicanos, e ainda, não encontramos nenhum trabalho que utilizasse este método com os objetivos aqui propostos. Desta forma decidimos primeiro padronizar o método para então obtermos dados mais precisos.

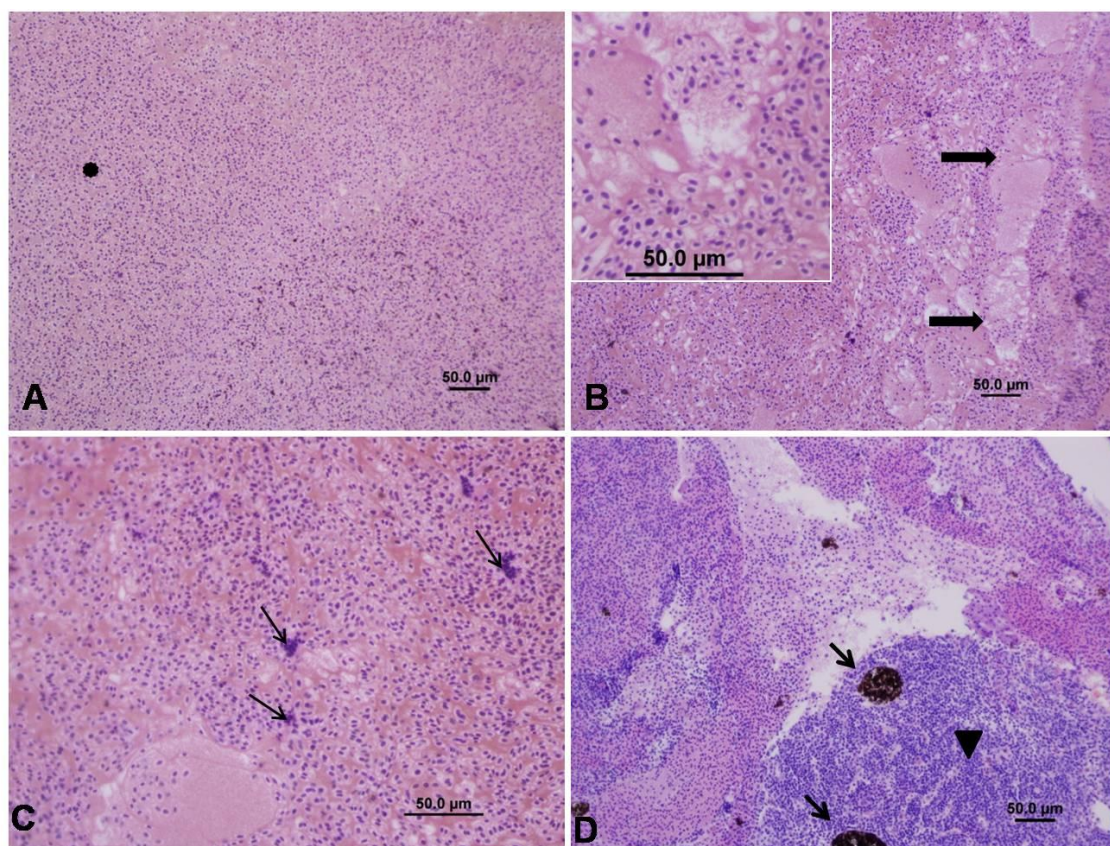


Figura 1 – RIM ANTERIOR DE *Cichla monoculus*. Grupo A ($0,10-0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), **A**: Porção hematocitopoiética do rim anterior rica em eritrócitos (•) região rica em eritrócitos **B**: Possível centro de destruição de hemáceas, (➡) no detalhe, aumento das áreas alteradas **C**: (➡) grupos de células (infiltração de leucócitos). Em **D**, predomínio de áreas basofílicas (▼) (porção com vários tipos celulares comuns ao rim anterior de peixes teleósteos), observar os CMM (Centros de Melanomacrófagos) (➡). Coloração H.E.

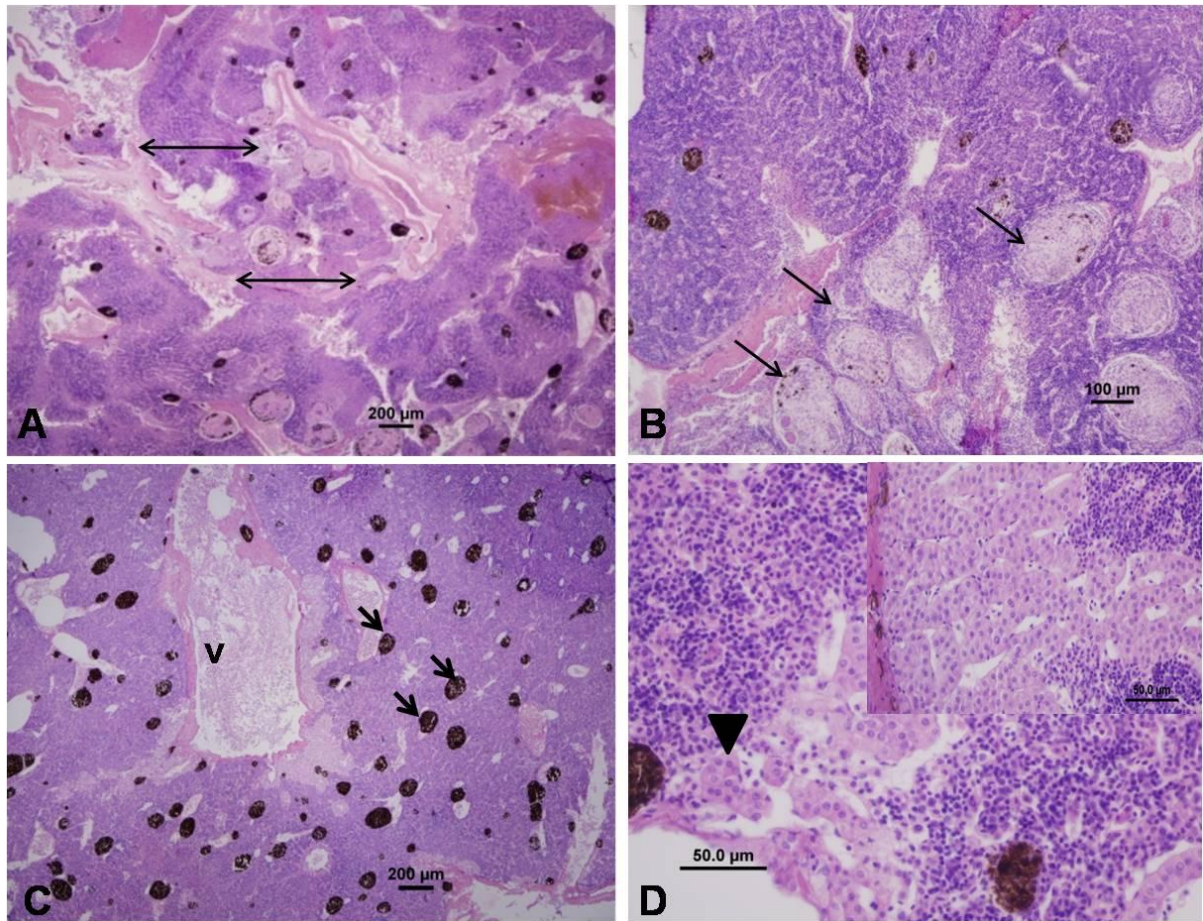


Figura 2 – RIM ANTERIOR DE *Cichla monoculus*. Grupo A ($0,10-0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A:** tecido renal com aspecto alterado (\leftrightarrow). **B:** focos de neoplasia (\rightarrow). Observar em **C**, vaso (**v**) circundado por grande número de Centro de Melanomacrófagos (CMM) (\rightarrow). Em **D**, células interrenais (\blacktriangledown) células secretoras de catecolaminas. Coloração H.E.

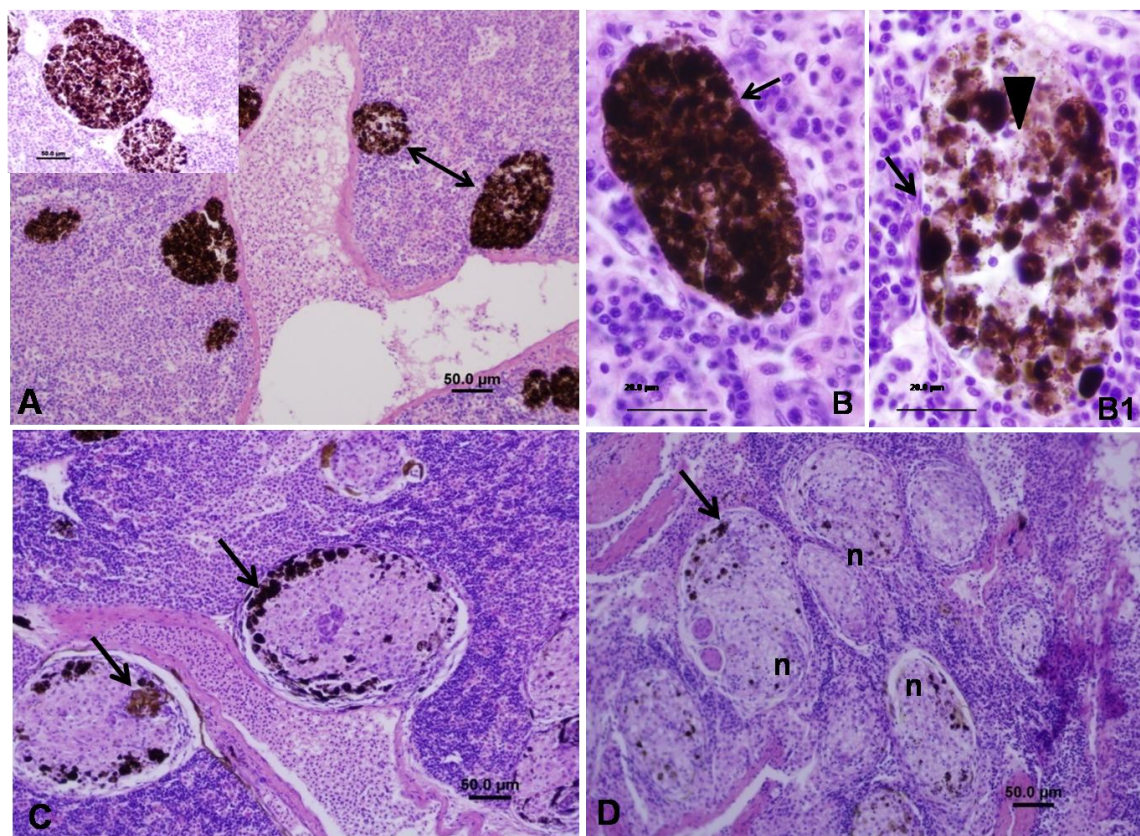


Figura 3 – RIM ANTERIOR DE *Cichla monoculus*. Grupo A ($0,10-0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A**: Centro de melanomacrófagos (CMM) associados ao vaso (\rightarrow). **B**: CMM com pigmentação completa. Observe a célula formando uma cápsula que envolve as células no interior em **B** e em **B1**. **B1**: Centro de Melanomacrófagos (CMM) em formação (\blacktriangledown) apresentando macrófagos não pigmentados. **C**: pigmentos no interior de regiões neoplásicas (\rightarrow). **D**: neoplasia (**n**), pigmentos (\rightarrow). Coloração H.E.

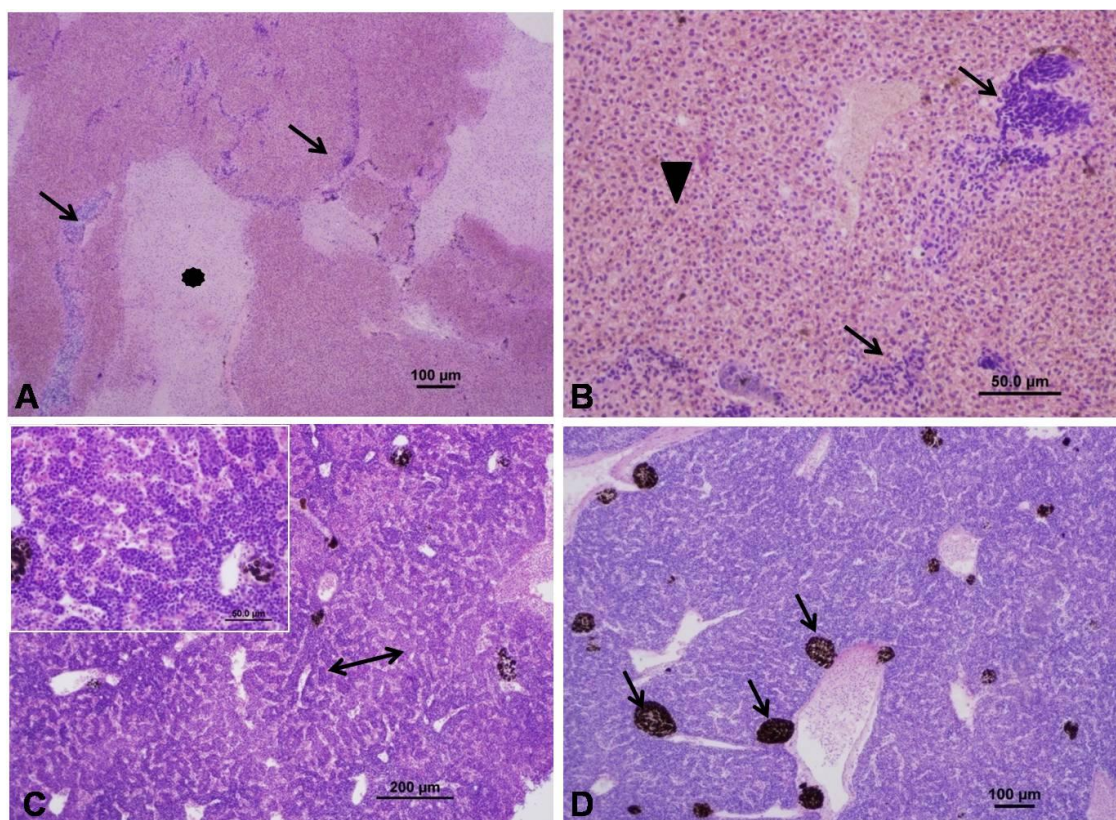


Figura 4 – RIM ANTERIOR DE *Cichla monoculus*. Grupo B ($0,36-0,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A:** parênquima renal com presença de focos de infiltração (\rightarrow). **B:** Tecido renal rico em eritrócitos (\blacktriangledown) e infiltrações de leucócitos (\rightarrow). **C:** observar a presença de sinusóides renais, no detalhe observar os eritrócitos dentro dos sinusóides. **D:** Parênquima com Centro de Melanomacrófagos (CMM) distribuídos pelo parênquima (\rightarrow). Coloração H.E.

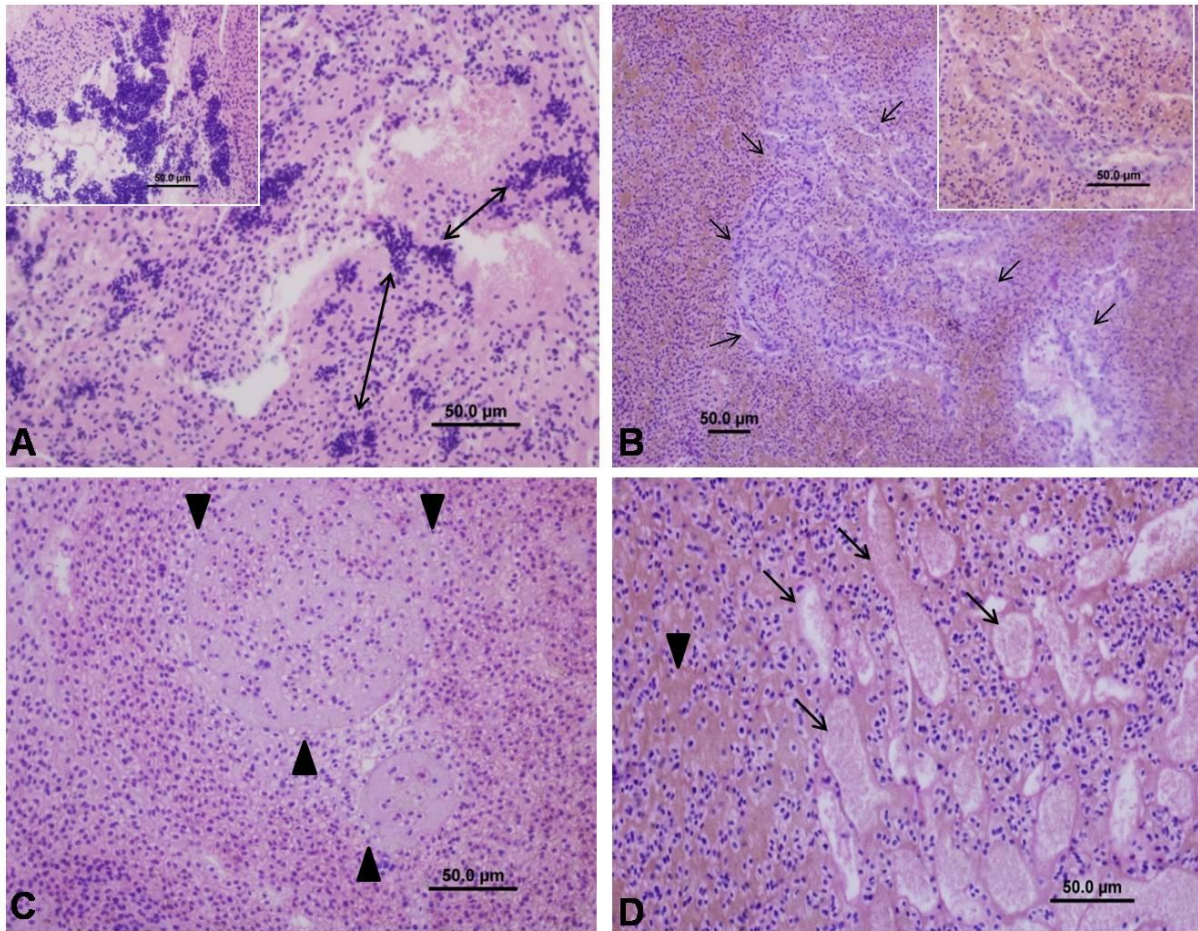


Figura 5 – RIM ANTERIOR DE *Cichla monoculus*. Grupo C ($0,61-1,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A** – Infiltração leucocitária (\leftrightarrow). **B**: grandes áreas de necrose formando espaços vazios no parênquima (\rightarrow). **C**: parênquima com centros de células encapsuladas. **D**: Possíveis centros de destruição de hemácias (\rightarrow) e espaços intersticiais (\blacktriangledown). Coloração H.E.

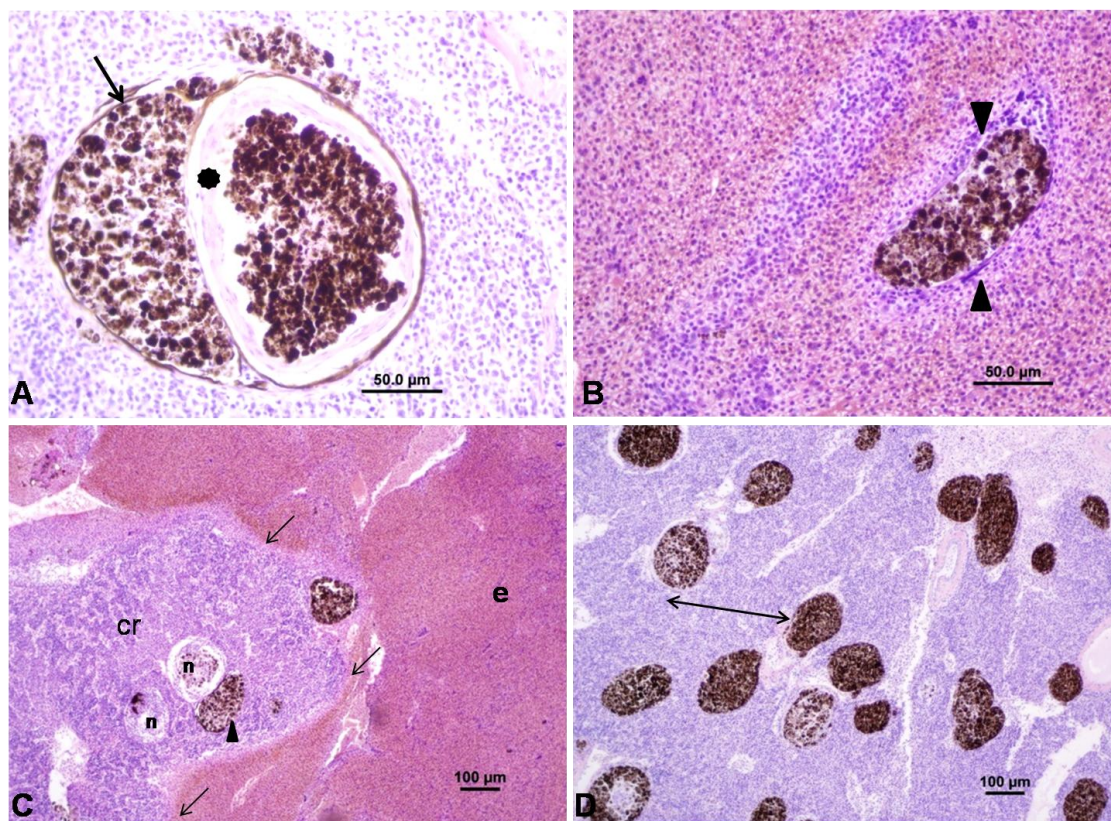


Figura 6 – RIM ANTERIOR DE *Cichla monoculus*. Grupo C ($0,61-1,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A:** Centro de melanomacrófagos (CMM) (●), observar células que formam a cápsula (→) envolvendo um segundo CMM. **B:** CMM associado à infiltração de leucócitos (▼). **C:** observar transição de tecido (→) com predomínio de eritrócitos (e), observar presença de neoplasia (n) células renais (cr) com sinusóides e CMM (▼). **D:** tecido com grande quantidade de Centro de Melanomacrófagos (CMM) (↔). Coloração H.E.

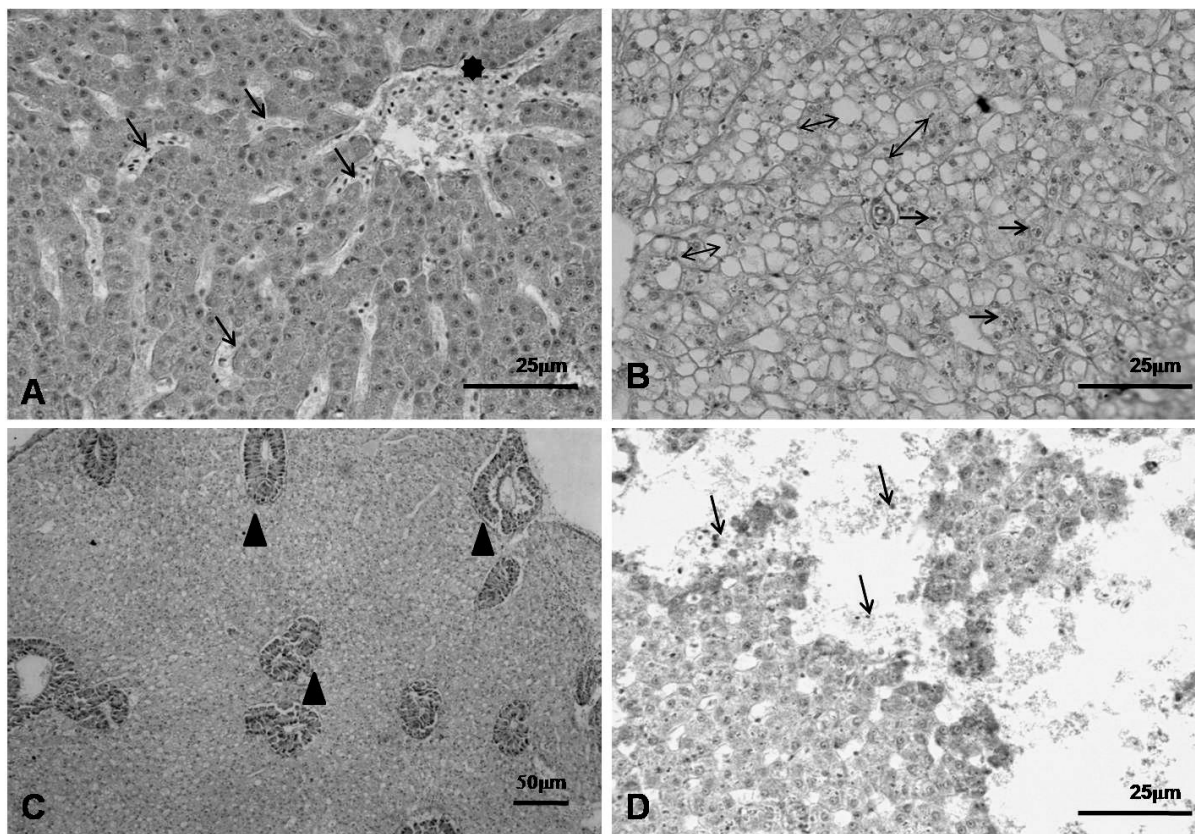


Figura 7 – FÍGADO DE *Cichla monoculus*. Grupo A ($0,10-0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A:** Aspecto geral do parênquima hepático, observar os sinusóides (→) veia porta (●). **B:** Presença de vacuolização (↔) e pigmentos (→) citoplasmáticos. **C:** Hepatopâncreas distribuído pelo parênquima (▼). **D:** Área de necrose, observar a presença de leucócitos (→). Coloração H.E.

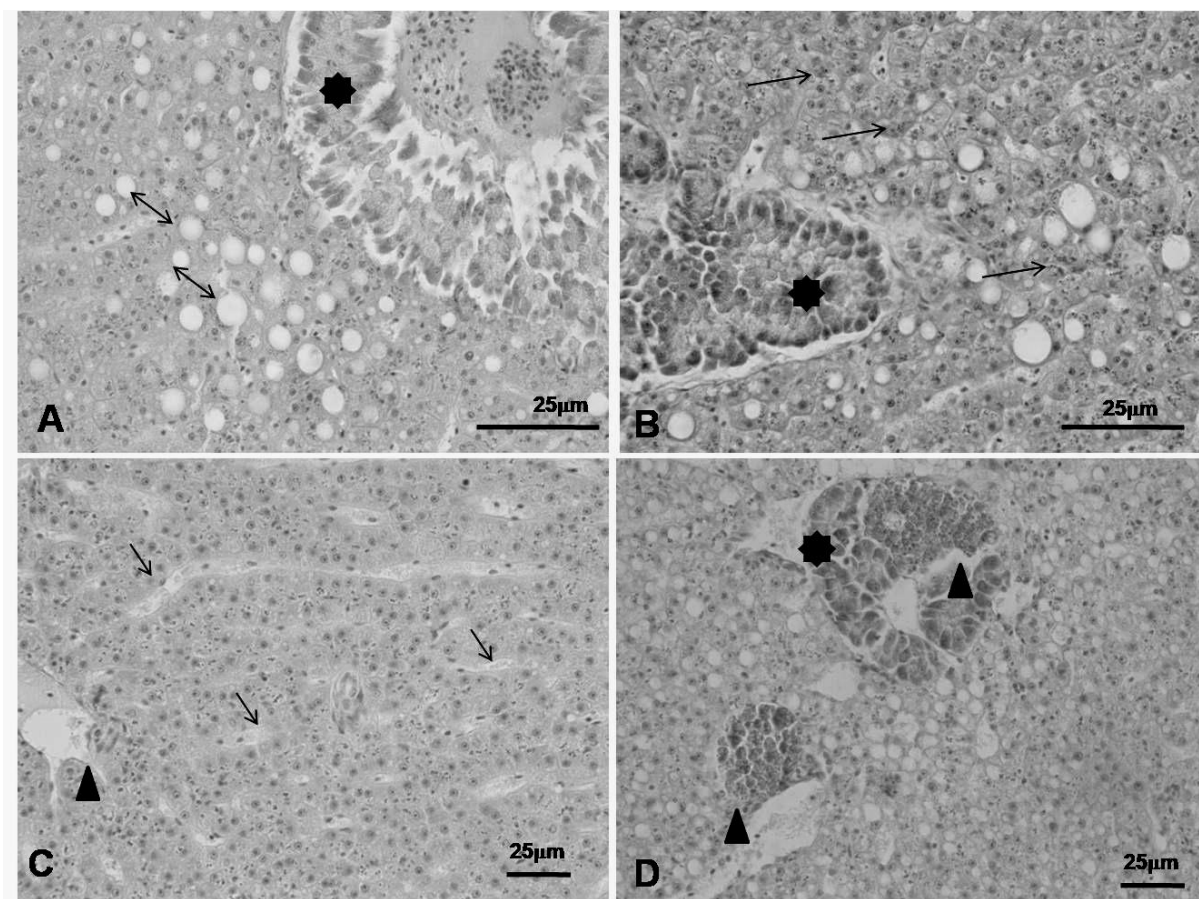


Figura 8 – FÍGADO DE *Cichla monoculus*. Grupo B ($0,36-0,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A:** Observe a presença de áreas de coloração negativa (possível vacuolização citoplasmática) (\leftrightarrow), tecido pancreático (\bullet). **B:** Tecido pancreático (\bullet) e presença de pigmentos (\rightarrow) citoplasmáticos. **C:** Aspecto geral do parênquima hepático, observar os sinusóides (\rightarrow) e veia porta (\blacktriangledown). **D:** Área com Centro de Melanomacrófagos (CMM) (\bullet) associado ao tecido pancreático (\bullet), observe a grande quantidade de vacuolização citoplasmática. Coloração H.E.

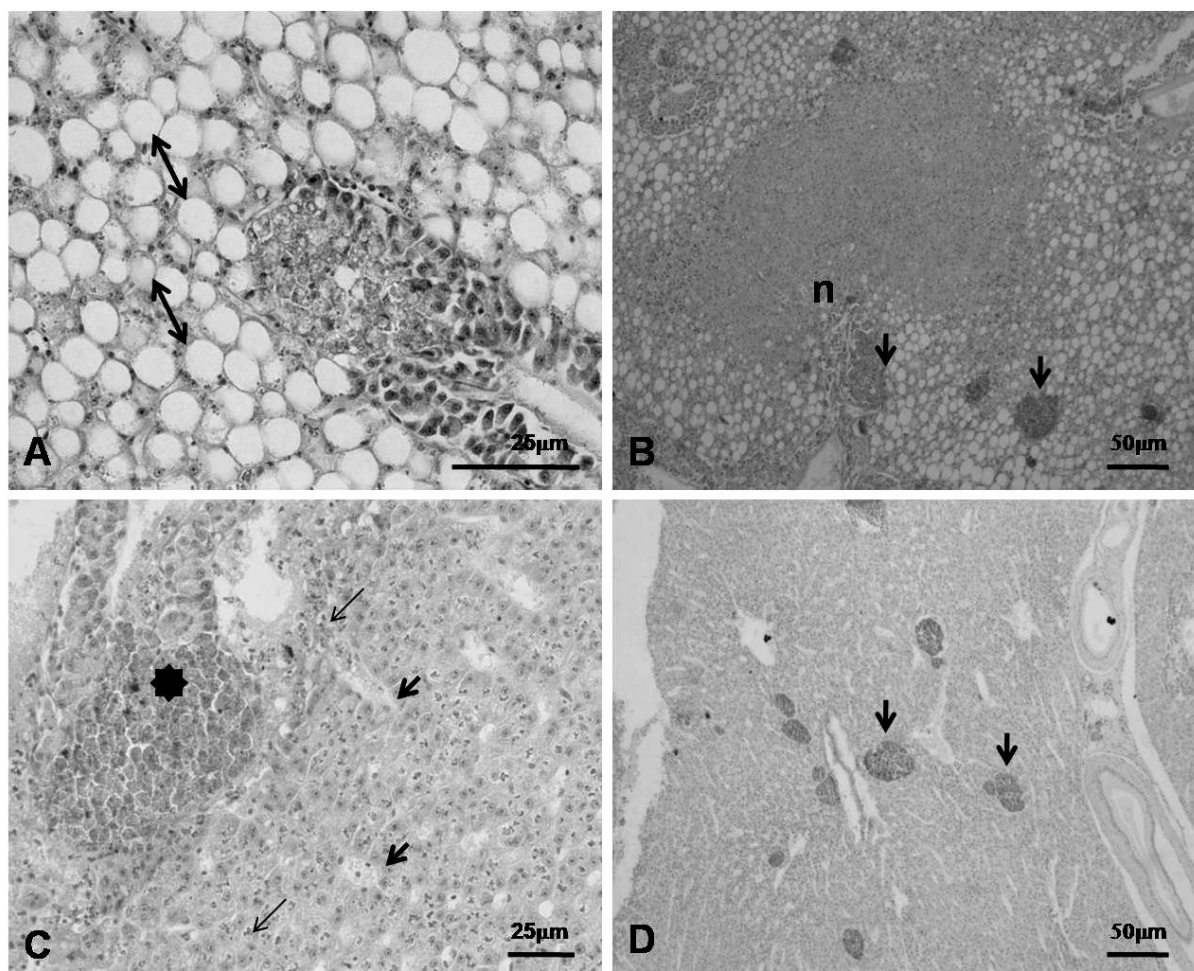


Figura 9 – FÍGADO DE *Cichla monoculus*. Grupo C ($0,61-1,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A** – Grande quantidade de vacuolização citoplasmática (\leftrightarrow). **B**: espaços desprovidos de células (n), Centro de Melanomacrófagos (CMM) (\rightarrow) e extensa área de vacuolização citoplasmática. **C**: pigmentos citoplasmáticos distribuídos pelos hepatócitos (\rightarrow), sinusóides (\downarrow), Centro de Melanomacrófagos (CMM) (\bullet). **D**: Centro de Melanomacrófagos (CMM) (\downarrow). Coloração H.E.

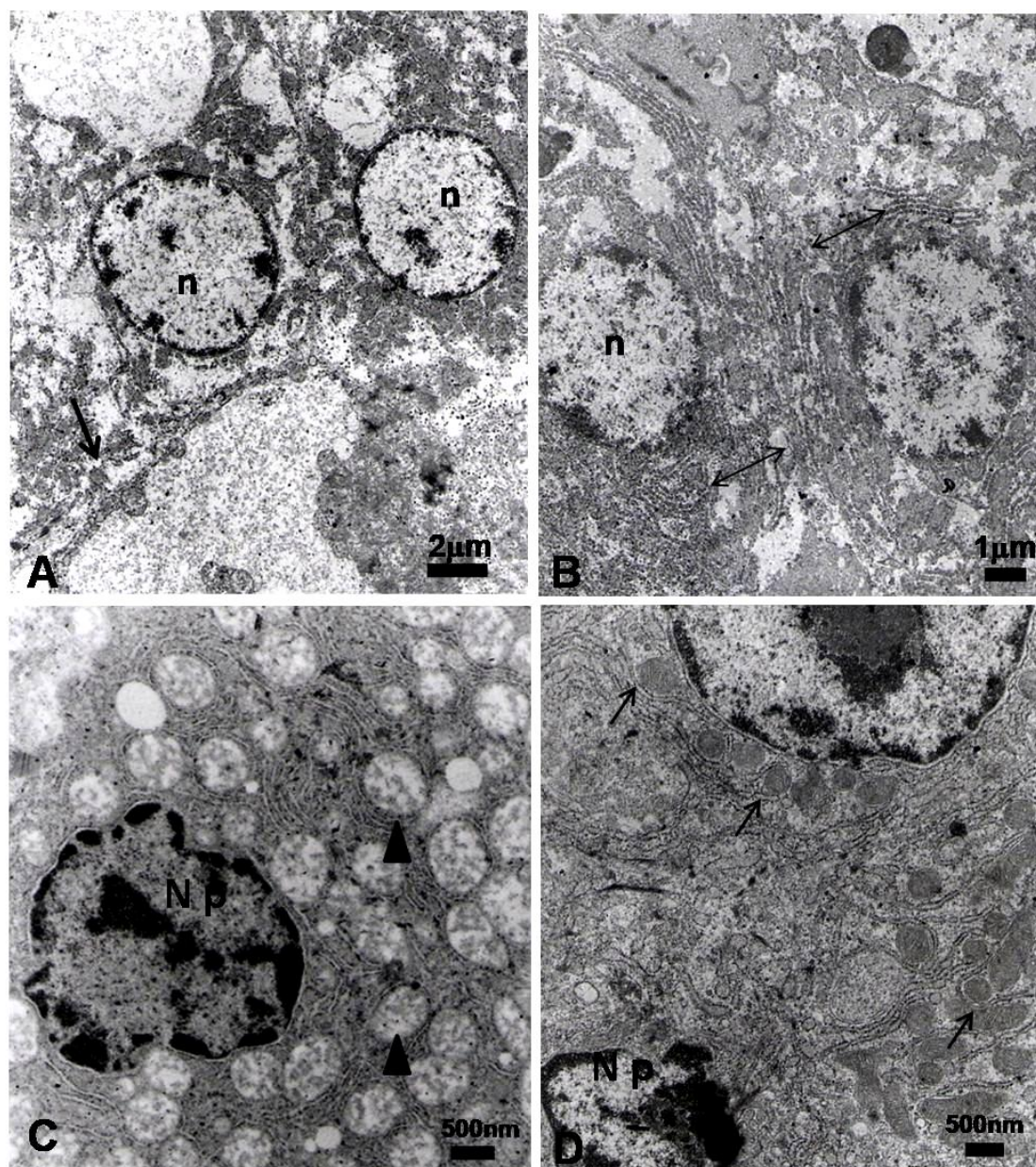


Figura 10 – Eletromicrografias de fígado de *Cichla monoculus*. **A e B:** Grupo A ($0,10-0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), observar núcleos (**n**) arredondados e retículo endoplasmático granular (REG) por todo citoplasma do hepatócito. **C e D:** Grupo B ($0,36-0,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), **C:** núcleo picnótico (**Np**) e citoplasma rico em vesículas em meio a grande quantidade de REG e **D:** citoplasma rico em retículo granular e mitocôndrias (\rightarrow), núcleo picnótico (**Np**).

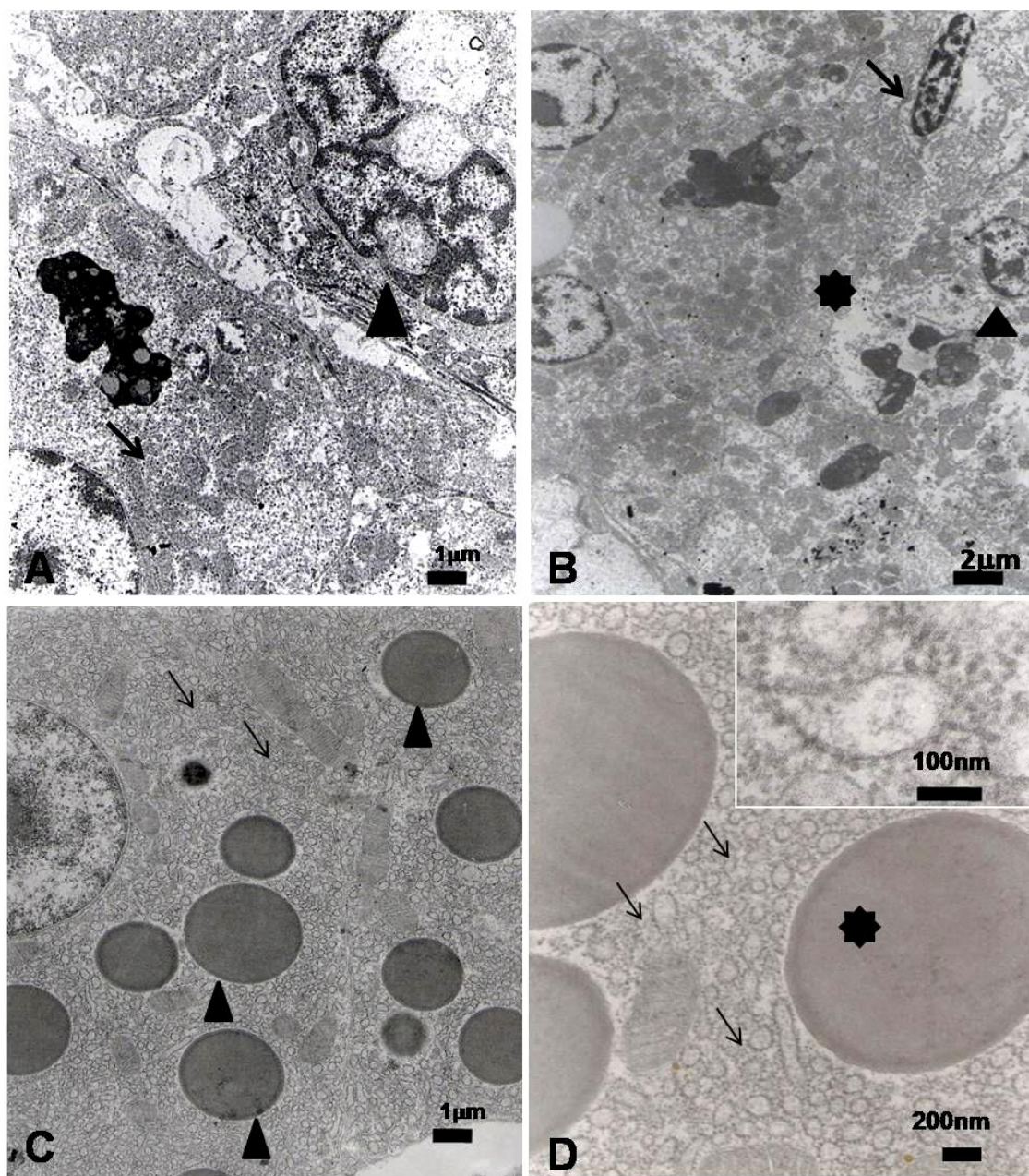


Figura 11 – Eletromicrografias de fígado *Cichla monoculus*. Grupo C ($0,61-1,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). **A:** observar os núcleos irregulares (\blacktriangledown) e uma grande incrustação citoplasmática de aspecto irregular e eletrodense. **B:** área de necrose, observe célula endotelial e macrófago (\blacktriangledown). **C:** citoplasma rico em vesículas eletrodensas (\blacktriangledown), observar grande quantidade de REG (\rightarrow) e **D:** ampliação da figura **C**, mostrando citoplasma rico em retículo endoplasmático granular (\rightarrow), vesículas eletrodensas (\bullet). Em detalhe a presença de REG abundante no citoplasma dos hepatócitos.

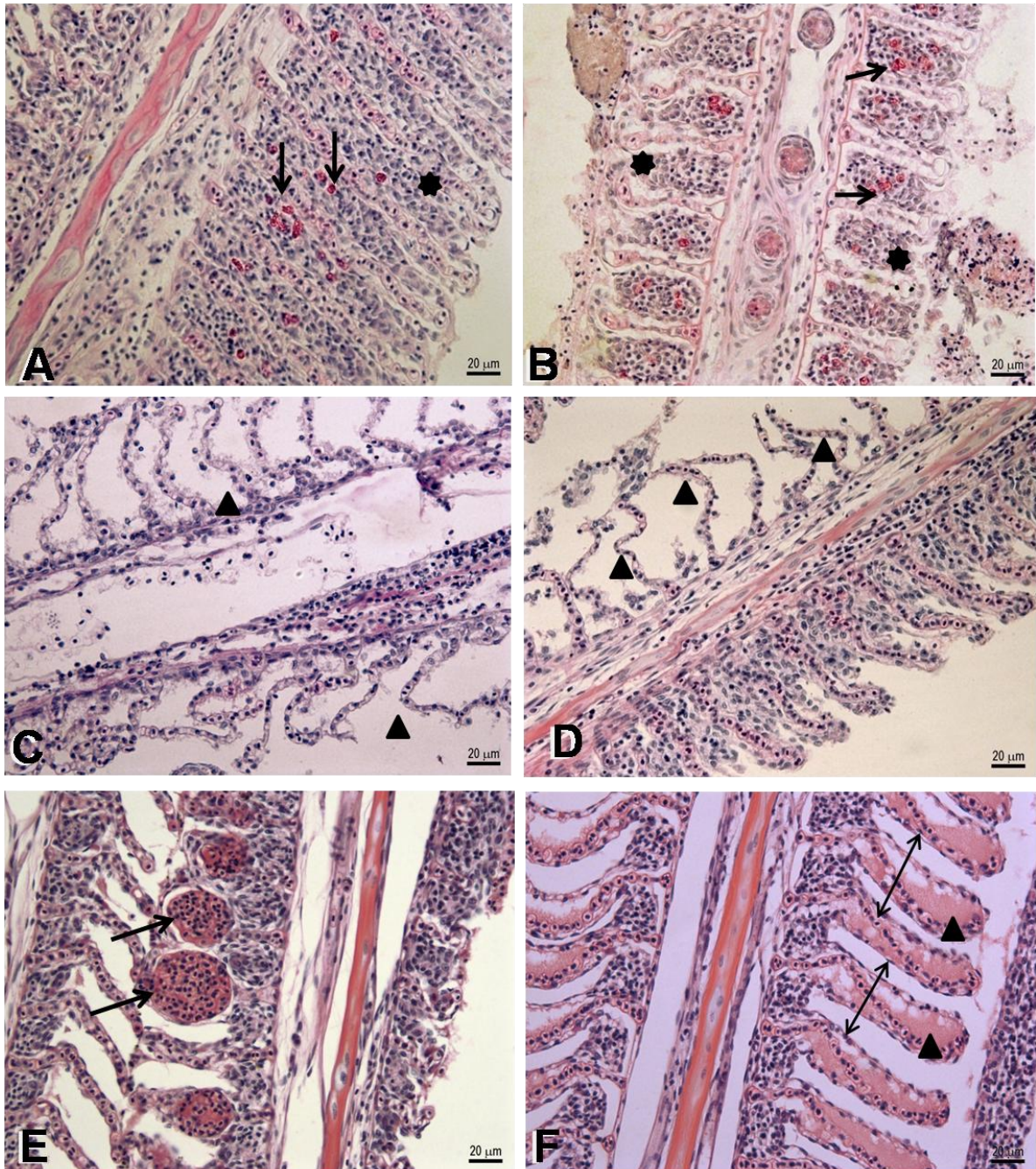


Figura 12 – Brânquias de *C. monoculus*. **A** e **B**: Infiltração de leucócitos (→) nas lamelas secundárias, observar a fusão das lamelas secundárias (●). **C**: lamelas secundárias e primárias atrofiadas (▲). **D**: Atrofia de um lado da lamela primária e fusão do outro lado (▲). **E**: Aneurisma (→) **F**: Descolamento de epitélio (↔) e edema de lamela secundária (▲). Coloração em H.E.

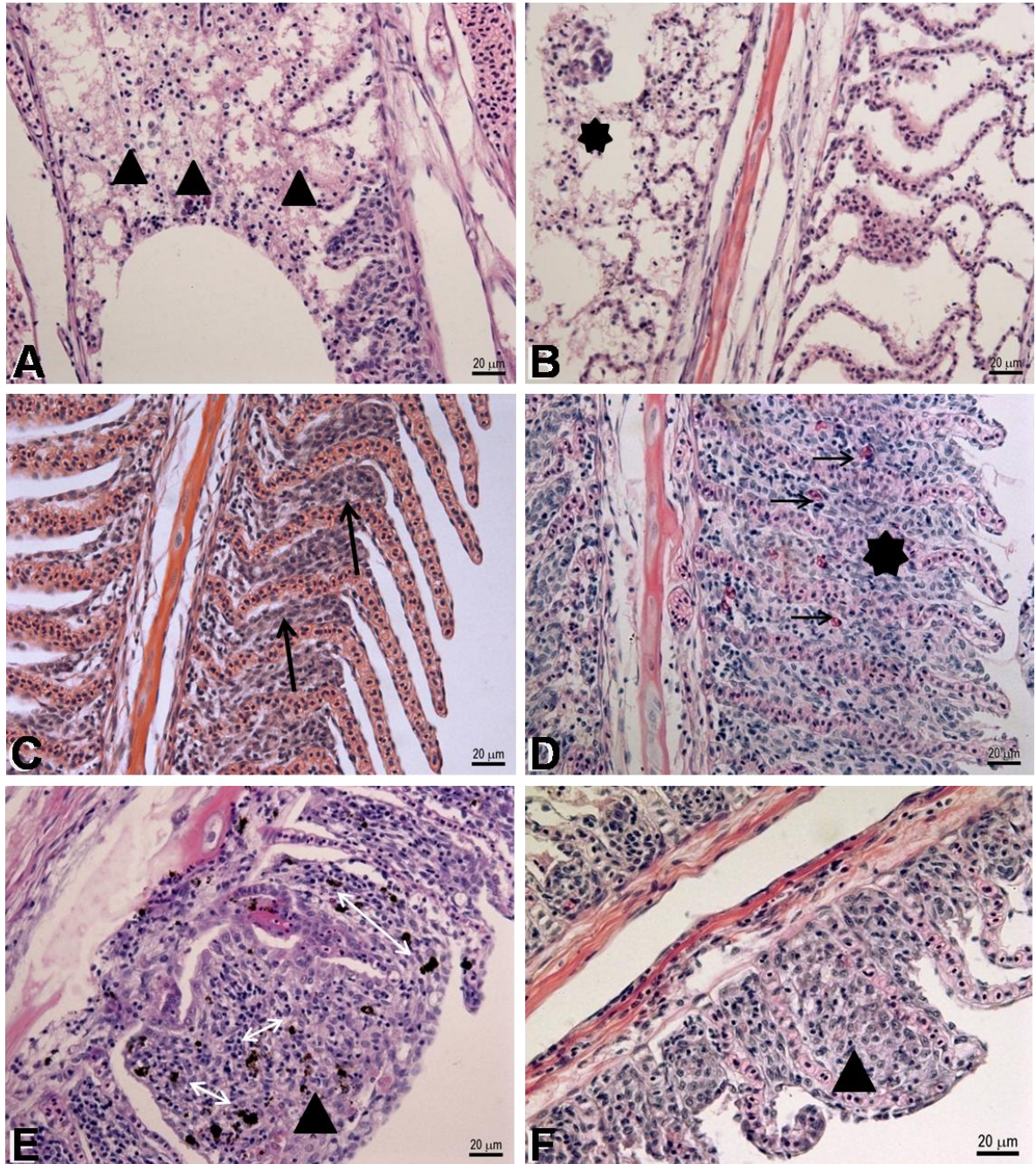


Figura 13 - Brânquias de *C. monoculus* . **A**: Exsudato (extravasamento de resíduos celulares) (▲) em **B**: necrose das lamelas (●). **C** Hiperplasia parcial de lamelas secundárias (→). **D**: hiperplasia total de lamelas secundárias (●) com infiltração de leucócitos (→). Observe em **E**: Tumor benigno (▲) e (↔ branca) pigmentos, **F**: hiperplasia tecidual com fusão das lamelas e neoplasia (▲). Coloração em H.E.

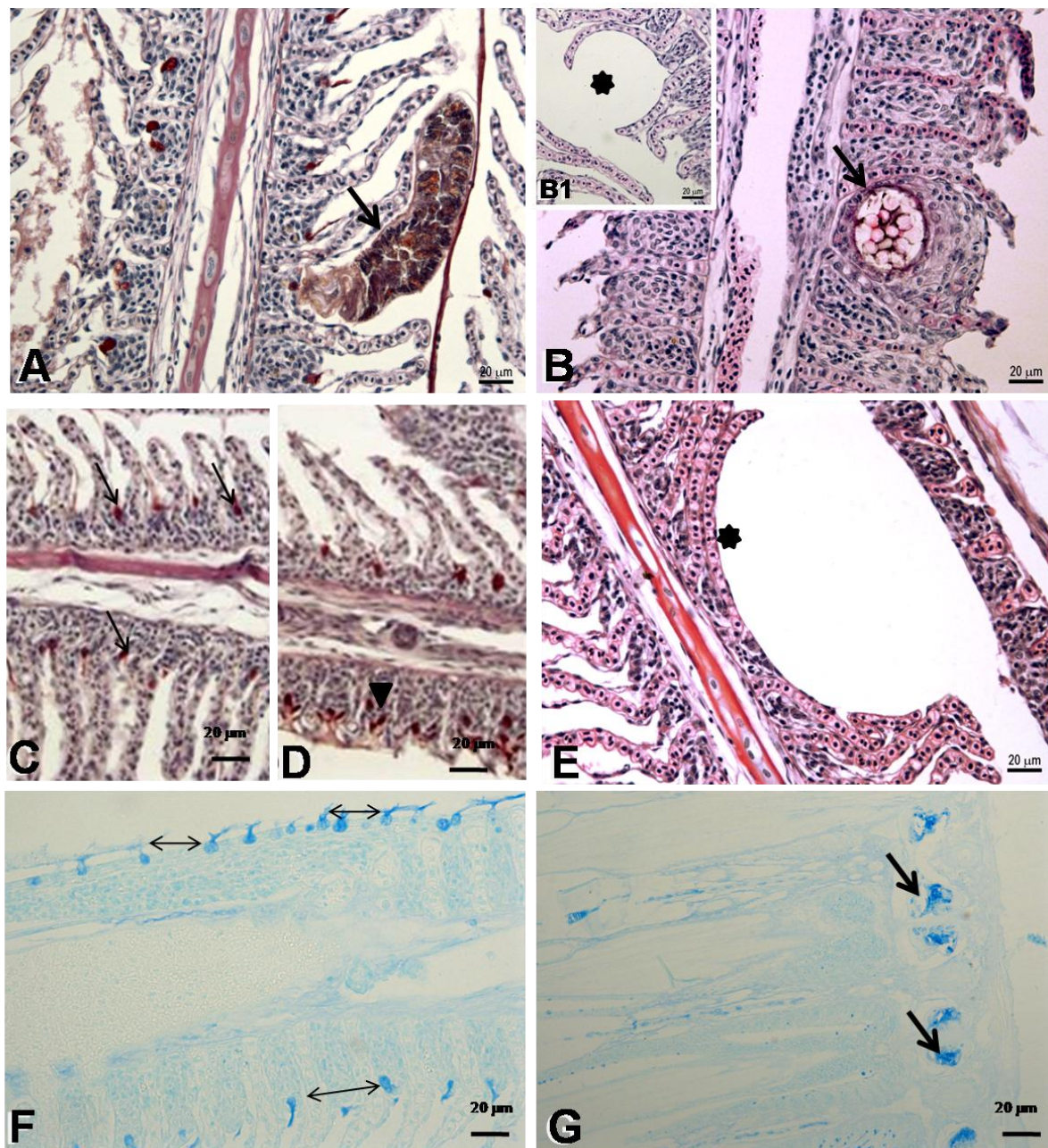


Figura 14 - Brânquias de *C. monoculus*. **A:** parasita alojado entre as lamelas secundárias. **B:** prováveis ovos de parasitas, em **B1**, local onde se alojava um parasita. **C:** células mucosas localizadas na base da lamela primária (→). **D:** ou na parte apical da lamela secundária. **E:** Local de alojamento de exoparasita, (observe o desarranjo das lamelas secundárias). Em **F:** observa-se células de secreção mucosa (↔) na lamela secundária. Em **G** observa-se reação com a cartilagem na lamela primária, **C** e **D:** Mucopolissacarídeos neutros (→) coloração PAS; Em **F** e **G:** (polissacarídeos ácidos carboxilados, coloração em Alcian Blue, 2,5 pH). **A** e **B** e **E**, coloração em H.E.

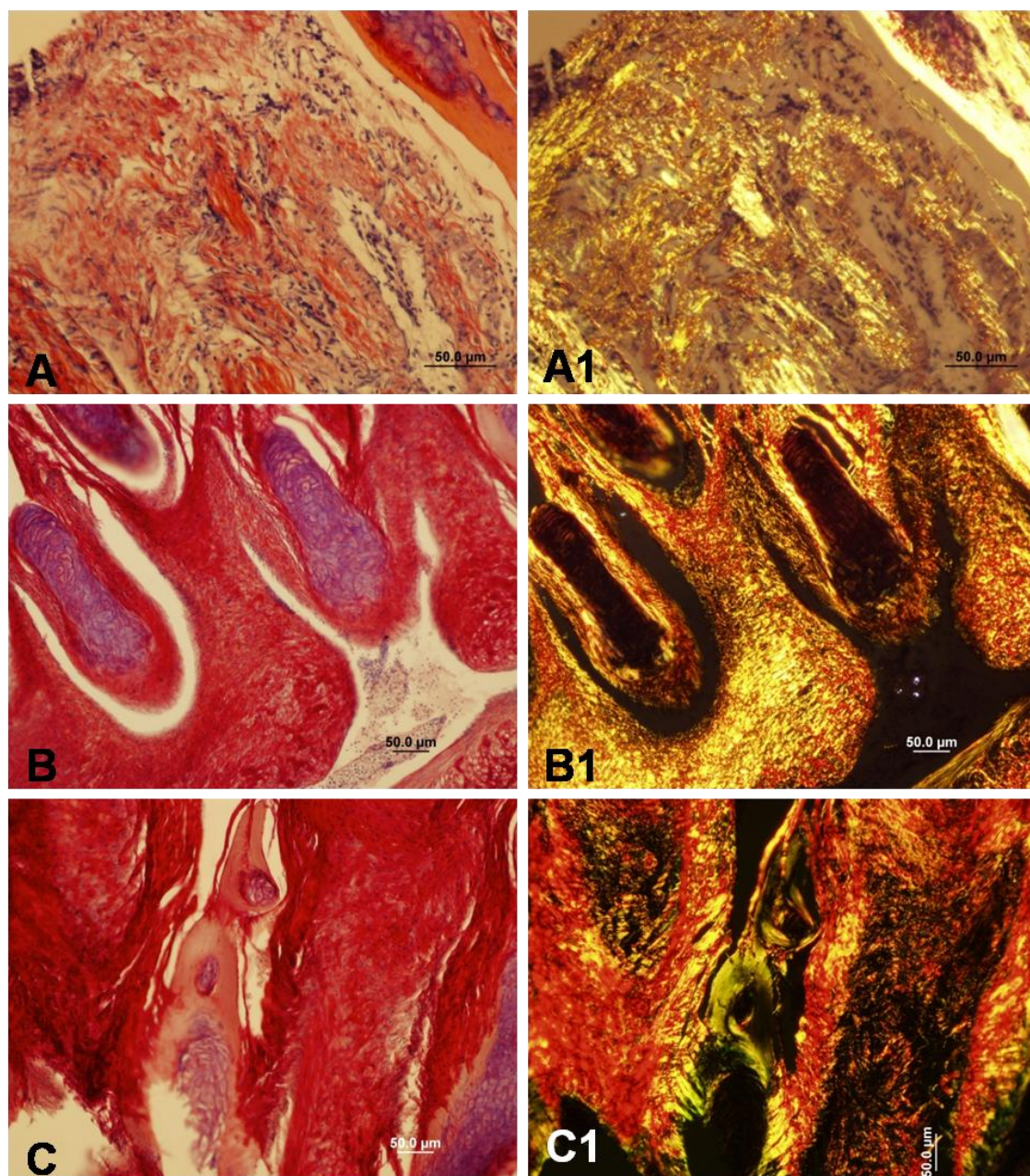


Figura 15 – Brânquias (lamela primária) de *Cichla monoculus* corados com picrosirius red. Observação em microscopia de campo claro em **A**, **B** e **C**; e microscopia de polarização **A1**, **B1** e **C1**. **A** e **A1** (**Grupo A** - 0,10-0,35 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), observar as fibras colágeno da matriz extracelular cor amarelo claro (colágeno tipo I **Grupo B** - 0,36-0,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), observar aumento da densidade e mudança na coloração com regiões com fibras vermelhas (colágeno tipo I). Em **C** e **C1**, aumento da intensidade da coloração vermelha (colágeno tipo I) e verde (colágeno tipo III) (**Grupo C** - 0,61-1,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$).

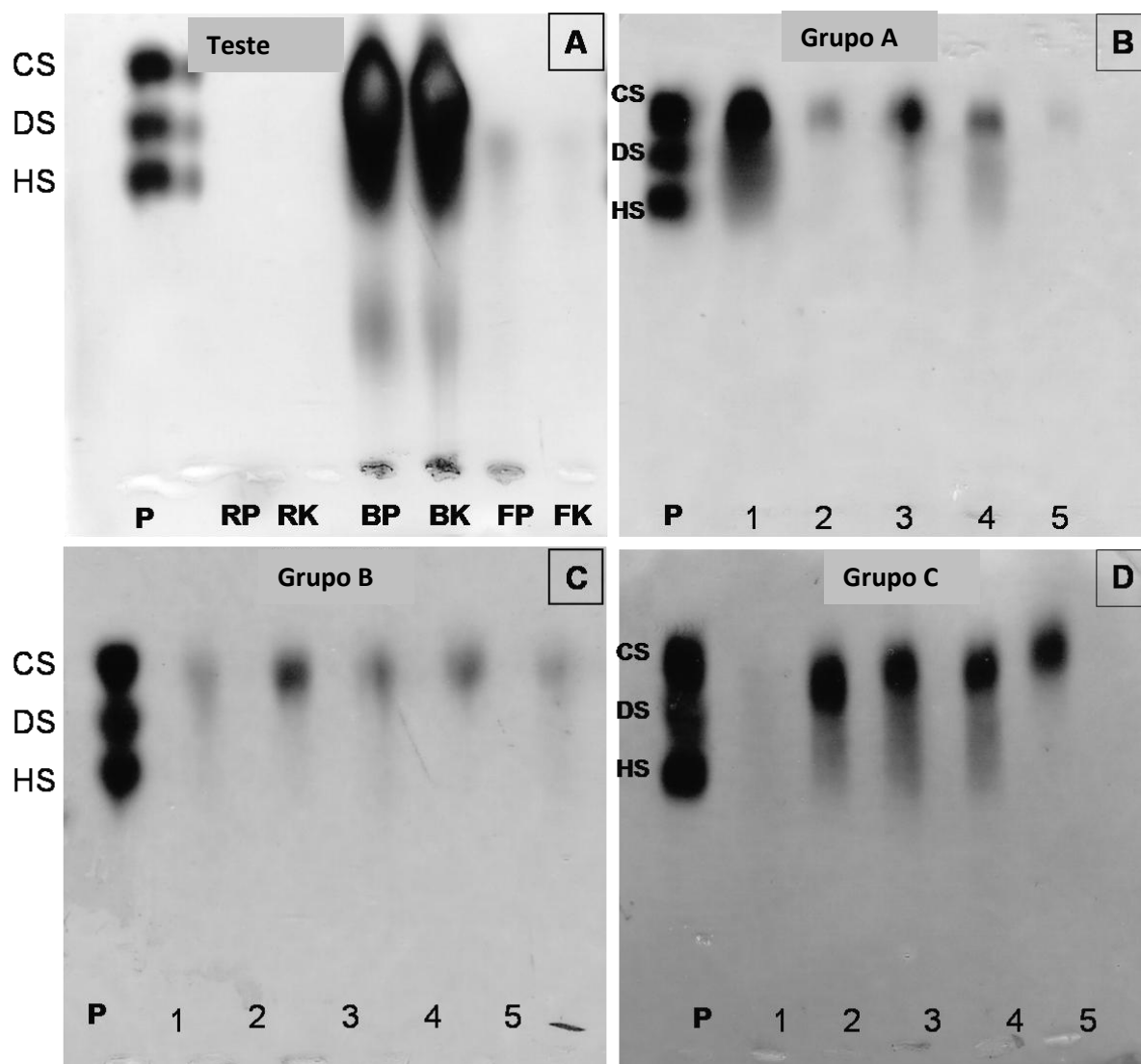


Figura 16 – Caracterização dos componentes de matriz extracelular glicosaminoglicanos (GAGs) nos tecidos de rim anterior, fígado e brânquias de *C. monoculus* (Tucunaré) através de análise bioquímica, em eletroforese em gel de agarose. **A:** Perfil dos glicosaminoglicanos (Condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato). **P=** padrão, **RP** rim anterior (digestão em pronase), **RK** rim anterior (digestão em proteinase K), **BP**, brânquias, (digestão em pronase), **BK** brânquias (digestão em proteinase K), **FP** fígado (digestão em pronase), **FK** fígado (digestão em proteinase K), **P=** padrão. Gel **A** - teste de enzimas para digestão de proteínas do rim anterior, brânquia e fígado. Grupos **A**, **B** e **C**, foi utilizada maxatase para digestão das proteínas das brânquias **B: Grupo A** ($0,10-0,35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), **C: Grupo B** ($0,36-0,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), **D: Grupo C** ($0,61-1,60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). $n=5$ para cada grupo.

4.6. Análise do índice de lesão do rim anterior

As análises foram realizadas considerando a mesma divisão dos Grupos A (0,10-0,35 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), Grupo B (0,36-0,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$) e Grupo C (0,61-1,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), segundo a bioacumulação de mercúrio. Observamos um aumento nas alterações histopatológicas no grupo 3 se considerado o rim anterior (Figura 6) levando em consideração as seguintes alterações: necrose, infiltração de leucócitos, presença de Centro de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (ML). Para considerarmos estes parâmetros o método do Índice de Bernet foi utilizado com modificações, onde o valor do fator de importância atribuído aos ML (melanomacrófagos livres) foi de 4 e aos CMM foi de 5.

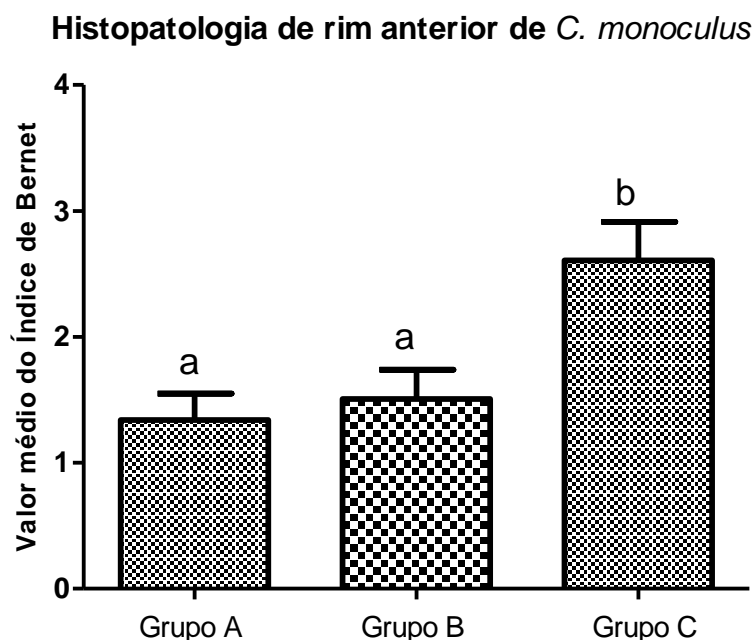


Figura 17 - Análise do índice de lesão do rim anterior de *C. monocolus* segundo Índice de Bernet, **Grupo A** n=21, **Grupo B** n=16 e **Grupo C** n=14, p=0, 003. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Média \pm erro padrão da média. **Grupo A** (0,10-0,35 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), **C: Grupo B** (0,36-0,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), **D: Grupo C** (0,61-1,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$).

4.7. Análise do índice de lesão do Fígado

As análises foram realizadas considerando a mesma divisão dos grupos descrita anteriormente. Observamos um aumento nas alterações histopatológicas no Grupo C de fígado (Figura 9) levando em consideração as seguintes alterações: necrose, vacuolização, presença de Centro de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (ML).

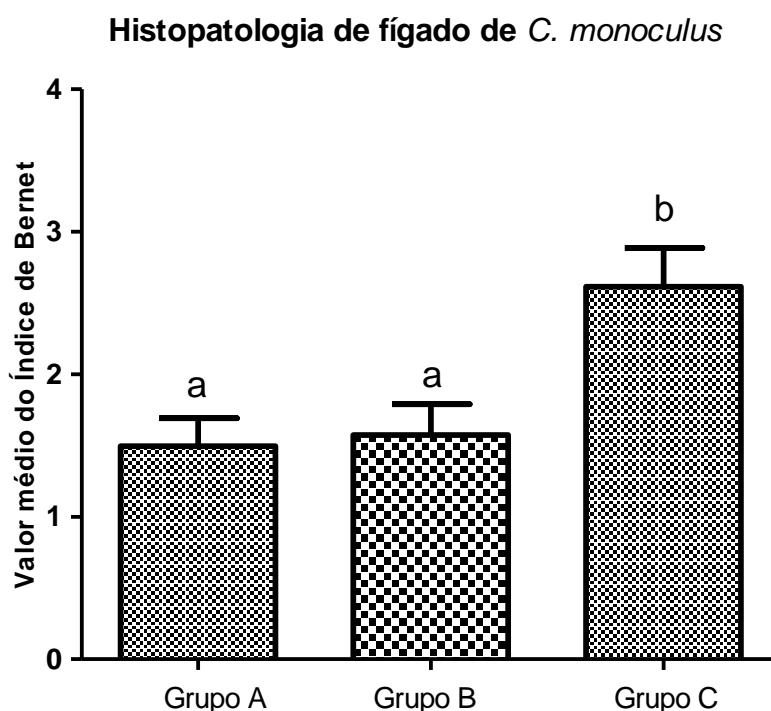


Figura 18 - Análise do índice de lesão do fígado de *C. monocolus* segundo Índice de Bernet. **Grupo A** n=21, **Grupo B** n=16 e **Grupo C** n=14. p=0,0032. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Média \pm erro padrão da média. Grupo A (0,10-0,35 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), C: Grupo B (0,36-0,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$), D: Grupo C (0,61-1,60 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$).

Foram realizadas as mesmas análises nas brânquias de *C. monoculus*, considerando a mesma divisão dos grupos descrita anteriormente. Observamos alterações histopatológicas como: aneurismas, necrose, atrofia, descolamento de epitélio, edema, hiperplasia, hipertrofia, infiltração de leucócitos, necrose e presença de tumores. No entanto, não houveram diferenças significativas entre os grupos segundo o Índice de Bernet. Consideramos que de modo geral estes peixes apresentaram graves alterações nas brânquias e mesmo no grupo com menor bioacumulação de mercúrio verificamos que estes animais apresentam alterações que poderiam prejudicar os processos respiratórios e trocas gasosas.

5. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado o acúmulo de mercúrio e dos DDTs em diferentes tecidos de peixes (Oliveira Ribeiro *et al.*, 1999; Aschner, 2002; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2000; 2002; Mela *et al.*, 2007; Drevnick *et al.*, 2008, Miranda *et al.*, 2008; Giari *et al.*, 2008), bem como alterações histopatológicas, seja em ambiente natural ou experimentalmente (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005; 2006; Liao *et al.*, 2006; Mela *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010; Rabitto *et al.*, 2011).

A resposta imune em peixes representa uma resposta rápida de defesa contra patógenos, no entanto, devido à presença de contaminantes ambientais estes causar distúrbios neste sistema e influenciar na habilidade destes animais peixes se protegerem contra infecções (Datta *et al.*, 2009). O rim anterior dos peixes teleósteos é um órgão hemocitopoiético com papel importante na defesa imune. Observamos que para esta espécie ocorrem áreas onde predominam células exclusivamente com eritrócitos e áreas com leucócitos e células indiferenciadas e ambas as áreas organizadas por células reticulares, estroma e fibras, como o observado em outros teleósteos (Leenhuer, 1969; Rabitto *et al.*, 2005). O rim anterior apresentou muitas alterações importantes como: neoplasias, infiltrações de leucócitos, centros de destruição de hemácias, espaços intersticiais, formação de muitos centros de melanomacrófagos por todo parênquima, o que ocorreu em todos os grupos. O Grupo A foi o que mais apresentou neoplasias, dano este que é sabidamente irreversível, o que poderia estar relacionado com a sobrevivência destes indivíduos, aspecto este difícil de relacionar com a bioacumulação de mercúrio, mas se considerado a presença de DDTs nestes organismos, estes podem

interferir provocando este tipo de lesão. No entanto, é difícil dizer se a causa destas alterações deve-se à presença dos DDTs ou se esta alteração poderia estar relacionado à associação destes contaminantes.

O fígado de peixes é o órgão mais utilizado para análise de diversos contaminantes potencialmente tóxicos. Alterações no fígado devido à toxicidade do Hg e outros metais como o cobre e chumbo são quase sempre associados com a condição degenerativa, necroses, vacuolização e condensação nuclear e já foram descritas por outros autores (Arellano *et al.*, 1999; Olojo *et al.*, 2005; Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007; Mishra e Mohanty, 2008). Neste trabalho observamos as mesmas alterações em relação à contaminação de Hg e DDT. Por se tratar de uma região com poucas atividades antrópicas e de difícil acesso, até hoje não foram detectados outros tipos de contaminantes na área. As alterações encontradas demonstraram que o uso da histopatologia do fígado é indispensável para estabelecer um bom diagnóstico dos danos que o Hg e o DDT causados a esta espécie e o uso deste órgão como biomarcador em monitoramentos biológicos é indispensável para uma boa análise.

Velmurugan *et al.* (2007) observou mudanças histológicas importantes como degeneração, congestão, dilatação de sinusóides, hipertrofia de hepatócitos e necrose com a contaminação experimental de baixas concentrações de pesticidas piretróides em relação ao controle. Neste trabalho não podemos afirmar que os danos encontrados no fígado sejam relacionados à presença do DDT e seus metabólitos, no entanto, podemos afirmar que embora se encontrem em baixas concentrações e até mesmo em concentrações permitidas pela legislação, podem estar contribuindo para explicar os danos histopatológicos encontrados.

O fígado é o órgão interno que mais sofre sérias alterações em peixes pela exposição a pesticidas, uma vez que é o principal órgão de detoxificação (Dutta *et al.*, 1993, Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005). A exposição crônica ao Hg e ao DDT e seus metabólitos podem estar causando os danos observados, visto que estes indivíduos estão expostos a baixas concentrações, porém por muito tempo. As conseqüências para fisiologia celular são principalmente com relação à secreção da bile, metabolismos celular de lipídeos e proteínas e nos mecanismos de detoxificação (Filipak Neto *et al.*, 2008; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2006). A presença de uma grande quantidade de vesículas contendo lipídeos (foi realizada a coloração de sudan Black e confirmado que as vesículas contêm lipídeos: dados não mostrados) foi uma característica muito encontrada e é considerada patológica uma vez que o acúmulo de lipídeos pode trazer prejuízo ao metabolismo celular. Em humanos a presença de lipidose é conhecida como esteatose, um processo que pode evoluir para cirrose, ou ainda indicar uma doença metabólica, formando vacúolos em conseqüência de desequilíbrios na síntese, utilização ou mobilização (Cotrin, 2006).

As observações ultraestruturais deste trabalho corroboram com dados encontrados por Giari *et al.* (2008), onde os autores encontraram danos em todas as concentrações testadas, que foram tempo e dose dependente, demonstrando que este órgão é bastante sensível ao mercúrio. Muitos trabalhos sobre alterações observadas em fígado de peixes expostos a uma gama de compostos orgânicos têm sido descritos (Hinton e Lauren, 1990; Au, 2004). A perda da compartimentação regular citoplasmática é uma reação inespecífica ultraestrutural típica de hepatócitos de peixes que indica perturbação da homeostase hepatocelular. A desorganização do citoesqueleto poderia afetar diretamente o tráfego de vesículas, disposição e movimentação das organelas e membrana plasmática, bem como os processos de

divisão celular (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Rabitto *et al.*, 2005; Giari *et al.*, 2008). Giari *et al.* (2007) sugerem que estes sintomas de estresse são inespecíficos, uma vez que estas alterações têm registro em células expostas a compostos orgânicos e inorgânicos ou em situações patológicas. Os lisossomos do hepatócito são importantes na degradação e renovação das organelas intracelulares. Assim como os lisossomos, os peroxissomos, abundantes nos hepatócitos, são organelas que contêm enzimas. Algumas de suas funções são as oxidações de ácidos graxos em excesso, quebra de peróxido de hidrogênio gerado por oxidação (por meio da atividade da catalase) (Junqueira e Carneiro, 2006).

A presença de Centro de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (ML) foi evidenciada tanto no fígado como no rim anterior de *C. monocolus*. Os melanomacrófagos são relacionados na literatura como envolvidos com processos de defesa, degradação de tecidos (Agius e Roberts, 1981, Rabitto *et al.*, 2005) e conteúdo de metais nos alimentos (Manera *et al.*, 2000).

Os melanomacrófagos foram detectados em todos os grupos estudados e no fígado apresentaram uma diferença significativa no grupo mais contaminado. Vários autores questionam o uso de melanomacrófagos no monitoramento ambiental de peixes, porque o número de CMMs pode variar devido a fatores diversos como a alimentação, qualidade da água, temperatura, idade e estágio de maturação (Wolke, 2002) ou até mesmo o estado nutricional. Estes resultados, portanto, devem ser considerados desde que levemos em conta os fatores de interferência e sejam utilizados associados a outros biomarcadores.

As brânquias são consideradas boas indicadoras da qualidade da água, sendo utilizadas como modelo para estudos de impactos ambientais a vários anos, tendo em vista que estão em contato imediato com o ambiente e conseqüentemente

com os contaminantes ambientais. Mudanças histológicas nos tecidos dos animais possibilitam um método rápido para detecção do efeito dos contaminantes, especialmente em avaliações de exposição crônica (Bernet *et al.*, 1999; Velmurugan *et al.*, 2007). Vários trabalhos observaram alterações como: edema atrofia aneurisma, necroses lamelares, fusão de lamelas, hiperplasia, hipertrofia de lamelas secundárias, dentre outros. Liao *et al.* (2006) demonstrou que a resposta do mercúrio foi dose dependente em experimento realizado por 60 dias aumentando o número de edemas nas brânquias.

Neste trabalho observamos diversos danos que confirmam relatos de diversos autores consultados. Foram encontradas alterações como: exsudato (matéria resultante de processo inflamatório e saindo de vasos sanguíneos, depositam-se em tecidos ou superfícies teciduais, sendo constituídos de líquidos e fragmentos celulares), necrose, infiltração de leucócitos, atrofia, aneurisma, descolamento de epitélio acompanhado de edema, hiperplasia parcial e total de lamela secundária, neoplasias, presença de parasitas (o que pode caracterizar uma diminuição das defesas do indivíduo)(Bernet *et al.*, 1999).

Alterações como fusão lamelar, hipertrofia epitelial, edema, necrose, dentre outras são reladas por outros autores e foram relacionadas com alterações no funcionamento do órgão como trocas gasosas e nas funções de osmorregulação, tanto pela presença do DDT e seus metabólitos como pela bioacumulação do mercúrio (Liao *et al.*, 2006; Velmurugan *et al.*, 2007; Giari *et al.*, 2008). Segundo Oliveira Ribeiro *et al.* (2000) o efeito tóxico do mercúrio nas brânquias podem ser atribuído ao comprometimento da atividade oxidativa das brânquias, por meio do rompimento da organização celular. Ainda observou que peixes tropicais poderiam ter alta sensibilidade, pela ação da temperatura, como observado no estudo

realizado com *Trichomycterus zonatus*. Esta teoria poderia ser reforçada pelo fato que a espécie estudada neste trabalho, apresentou muitas alterações semelhantes nas brânquias deste peixe, que parecem reforçar estes dados e ainda, corroborando com a discussão sobre a sensibilidade dos peixes tropicais à ação do mercúrio devido em altas temperaturas.

A matriz extracelular (MEC) é um conjunto de agregados supramoleculares constituído por colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas (GPs), que mantém as células associadas possibilitando a organização dos tecidos e a sobrevivência celular (Aoudjit e Vuori, 2001). Os diferentes tipos de colágeno existentes parecem ter sido formados durante a evolução para suprir o organismo de uma variedade muito grande de estruturas supramoleculares organizadas, necessárias para adaptar os tecidos conjuntivos a diferentes papéis mecânicos e funcionais (Kühn, 1987).

Os colágenos compreendem uma família de glicoproteínas que ocorrem em todos os eucariontes (exceto nos protozoários), sendo em muitos organismos constitui o componente predominante da matriz extracelular. Por muitos anos foi atribuída ao colágeno uma função apenas de suporte e resistência mecânica. No entanto, resultados obtidos nas últimas décadas mostraram que os colágenos estão envolvidos também com fenômenos de adesão e diferenciação celular (Hay, 1984). É possível que as diferenças observadas na microscopia de polarização e devido as mudança na proporção e no tipo de colágeno I e III no Grupo C este tecido pode estar sofrendo algum tipo de remodelação.

A resistência mecânica do tecido é estreitamente relacionada com a presença das fibras de colágeno na derme reticular. Estas fibras se apresentam entrelaçadas e são constituídas por 90% do tipo I e 10% do tipo III. Quantificar a densidade destas fibras nas diversas fases da cicatrização permite uma análise do efeito de diversos

processos de recuperação dos tecidos. A resistência mecânica da pele está estreitamente relacionada com a presença das fibras de colágeno. A contagem destas fibras de colágeno nas diferentes fases da cicatrização permite avaliar o efeito e a reparação tecidual (Vilela *et al.*, 2010).

Neste trabalho foi demonstrado que condroitin sulfato é o glicosaminoglicano predominante nas brânquias de *C. monoculus*. Também demonstramos que há uma diferença entre a quantidade relativa de condroitin sulfato das brânquias nos grupos estudados. As brânquias possuem maior concentração (observação visual) de condroitin sulfato nos indivíduos do Grupo C. O significado funcional deste aumento não está bem estabelecido. Este dado pode demonstrar uma reparação nos tecidos e poderia ser sugerido como um biomarcador de exposição, desde que pode indicar modificações teciduais importantes.

Além do condroitin sulfato (CS), o dermatan sulfato (DS) talvez seja o principal glicosaminoglicano associado ao colágeno, envolvendo-se inclusive com a organização e fibrinogênese desta proteína (Poole, 1986). O DS ocorre em altas concentrações em tecidos fibrosos ricos em colágeno do Tipo I, porém este glicosaminoglicano foi encontrado em pouca quantidade nesta espécie, utilizando a enzima maxatase. O conhecimento da distribuição dos glicosaminoglicanos nas brânquias poderá trazer subsídios para o melhor entendimento do processo degenerativo e de reparação deste tecido. Os condroitin sulfatos (CS) são encontrados em uma ampla variedade de tecidos, sendo mais freqüentes na cartilagem e discos intervertebrais, onde podem alcançar a concentração de 10% do peso total (Lozzo, 1985). Além disso, em todos os tipos de tumores (benignos ou malignos) há aumento significativo de condroitin 6-sulfato (Sampaio *et al.*, 1977; Dietrich *et al.*, 1978).

A função estrutural desempenhada pela MEC está relacionada com a resistência mecânica conferida pelas fibrilas de colágeno; ao papel essencial estabelecido pela elastina e proteoglicanos na elasticidade, resistência do tecido, inter-relações entre a célula e a matriz (Hay, 1984; 1991; Jakson *et al.*, 1991). Os diferentes tipos de colágenos e a associação destas moléculas com os GAGs, PGs, e glicoproteínas (GPs) específicas, confere aos tecidos características próprias nos diferentes compartimentos do organismo. A grande diversidade bioquímica destas moléculas da MEC e a diversidade das associações pressupõem uma grande variedade de funções.

Segundo Berto *et al.* (2003) mudanças na composição da matriz podem estar relacionadas com modificações na arquitetura do tecido que podem levar a alteração em vários fenômenos biológicos como fator de crescimento, adesão e migração celular e resposta imune. Desta forma, muito ainda há para se investigar e elucidar sobre as interações celulares, envolvendo seus constituintes intracelulares, sinalizações e o real papel da matriz extracelular frente às dinâmicas celulares. Os resultados apresentados revelaram a importância dos proteoglicanos e do colágeno na organização da matriz extracelular e é necessário mais análises para determinar a utilização destes componentes da MEC como biomarcadores.

6. CONCLUSÕES

As técnicas histopatológicas utilizadas como biomarcadores de exposição crônica ao mercúrio e aos DDTs mostraram-se excelentes ferramentas para complementar os diversos biomarcadores utilizados. São importantes para que possamos identificar danos mais profundos nos tecidos, além de serem sensíveis e economicamente viáveis. Além disso, podem complementar diferentes informações sobre o efeito tóxico destes poluentes e as interações com os demais biomarcadores propostos, em condições crônicas. Os dados histopatológicos para rim anterior e fígado mostraram claramente que existe uma relação concentração de mercúrio no músculo, demonstrados claramente pelos índices de lesão.

Os biomarcadores de matriz extracelular como caracterização dos glicosaminoglicanos e detecção do colágeno necessitam ser melhor padronizados e uma revisão de metodologia de coleta e de análise dos dados precisam ser adaptados para análises ambientais, uma vez que poucos trabalhos foram realizados com este objetivo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos estudos de biomonitoramento ambiental, onde as condições são adversas e complexas, para uma avaliação que revele a real condição de determinado ecossistema aquático, faz-se necessária uma caracterização mais completa possível considerando tanto as interferências intrínsecas como extrínsecas ao sistema biológico. Não bastasse isso, mais complexo ainda é a determinação dos riscos que este sistema representa para a exposição humana. A geração de dados empíricos com espécies nativas a respeito da ação de xenobióticos nos ambientes naturais é condição imprescindível para a compreensão dos efeitos biológicos resultantes da exposição, sendo que uma visão holística da interação xenobiótico-compartimento vivo depende da complementaridade de várias abordagens, difíceis de serem contempladas em apenas um projeto ou estudo.

Neste trabalho, procurou-se identificar no capítulo I a bioacumulação do mercúrio e de DDTs na biota constituindo assim as bases para o estudo. Para isso foi utilizada uma espécie de peixe importante para o ecossistema local e que ao mesmo tempo fosse tipicamente utilizada na dieta humana. Estes poluentes já são conhecidos como integrantes do sistema aquático da Amazônia brasileira, sendo assim fazem parte de uma preocupação regional, justificando os objetivos em avaliar a interferência destes compostos na saúde dos animais expostos e discutir os potenciais riscos para a exposição humana.

O termo “risco” pode ser definido de diferentes formas, no entanto, o mesmo está associado a dois fatores: à possibilidade de ocorrer um evento indesejado e às suas respectivas conseqüências (danos/impactos). A análise de risco está voltada para uma estimativa, quantitativa ou qualitativa do mesmo, baseada na avaliação e

em técnicas estruturadas para promover a combinação das freqüências e conseqüências de um dano ambiental. A avaliação de risco também pode ser utilizada, indiretamente, para uma tomada de decisão quanto ao gerenciamento dos mesmos, através de implantação de medidas e procedimentos que têm por finalidade prevenir, controlar ou reduzir riscos (Serpa, 2002).

Apesar do rio Jamari, no qual se localiza a usina hidrelétrica de Samuel, não possuir registros de mineração de ouro, os garimpos de outras regiões podem ter impactado a região através da dispersão atmosférica do Hg, ou mesmo através da lixiviação do solo naturalmente rico no metal ou ainda pela queima da biomassa muito comum na região. Além do mais, o represamento do rio Jamari para a formação do reservatório da U.H.E. Samuel em 1988 e conseqüentemente biomassa vegetal submersa, pode ter contribuído significativamente nas mudanças das características físicas e químicas da água, gerando um ambiente com valores elevados de matéria orgânica associado a baixos valores de pH, fatores estes que propiciam a metilação do mercúrio (Nascimento, 2006).

Uma vez quantificadas estas substâncias, observamos que os níveis de mercúrio em mais de 48% dos peixes se apresenta com valores acima dos permitidos pelas agencias de saúde, e que os DDTs, apesar de não serem utilizados na área para controle da malária, estava presentes, embora em quantidades bem abaixo do máximo permitido pela legislação.

No capítulo II, foram utilizados vários biomarcadores de estresse oxidativo, com o objetivo de avaliar se a bioacumulação do mercúrio e dos DDTs poderiam alterar ou estarem associados ao ambiente redox celular. A aplicação destes biomarcadores no diagnóstico ambiental utilizando peixes, ainda é bastante discutida, no entanto, as maiores dificuldades seriam: a determinação dos níveis

normais destas enzimas e moléculas, para cada espécie; e ainda a falta de uma região não impactada para ser utilizada como referencia o que representa a realidade da maioria dos estudos ambientais realizados hoje.

No entanto, a utilização destes biomarcadores é positiva desde que tomadas os cuidados necessários quanto à interpretação dos resultados, uma vez que o uso de outros biomarcadores é essencial para que haja uma compreensão mais geral dos mecanismos celulares que podem estar sendo afetados. Desta forma a validação dos biomarcadores pode ser uma condição prévia que vai determinar a segurança no uso dos mesmos.

No capítulo III, procuramos avaliar de forma mais aprofundada os biomarcadores que se mostraram mais eficientes nos dois primeiros capítulos no que diz respeito à exposição crônica nos ambientes naturais. Com isso tentamos estabelecer ainda novas formas de avaliação baseando sempre na estrutura tecidual de tal forma que pudéssemos trazer para a discussão novas abordagens. Neste contexto, dois novos biomarcadores foram sugeridos (GAGs e marcação de colágenos). No entanto, o tempo não foi suficiente para que estas abordagens estivessem padronizadas, mas mesmo assim podemos afirmar a importância destes marcadores para complementar as análises histopatológicas e iniciar a caracterização dos componentes de matriz extracelular, uma vez que diversas patologias dependem da estabilidade molecular da mesma.

Os resultados destas análises (químicos, bioquímicos e histológicas) contribuíram para analisar os efeitos resultantes da exposição ao mercúrio e aos DDTs. Fica claro que houve uma resposta celular a estes xenobióticos buscando mecanismos de defesa como resposta adaptativa em nível molecular e bioquímico e ao que parece levou a alterações histológicas e conseqüentemente fisiológicas,

podendo ser ou não reversíveis. No entanto, não há como saber se haverá um comprometimento maior da biota a longo prazo, e qual o nível de comprometimento no futuro para a biodiversidade e os riscos para a exposição humana. Neste sentido, há a necessidade de um biomonitoramento constante, agora em menor escala, apenas com o intuito de acompanhar a evolução dos processos de bioacumulação, uma vez que as bases para se entender os efeitos já se encontram minimamente estabelecidas.

8. CONCLUSÕES GERAIS

- Este estudo demonstrou que o reservatório da hidrelétrica de Samuel (Rondônia, Brasil), no rio Jamari, um tributário do rio Madeira, não afetado diretamente pela mineração do ouro, encontra-se impactado pelo mercúrio e DDTs e constitui risco de exposição tanto para as populações de peixes como para populações humanas;
- Estudos contínuos são necessários para avaliar a segurança para a saúde humana e, apesar dos benefícios nutricionais do consumo de peixes se faz necessária uma avaliação da segurança devido à exposição crônica ao mercúrio das comunidades ribeirinhas da Amazônia, com uma dieta rica em peixes;
- Pesquisas futuras devem investigar os processos responsáveis pelos altos níveis de mercúrio observados no reservatório e do significado de outras fontes deste metal para aquele ecossistema;
- Alguns biomarcadores de estresse oxidativo sugerem que a exposição crônica ao mercúrio e a DDTs podem comprometer a atividade enzimática antioxidante, no entanto, não é recomendado o uso destes biomarcadores isoladamente;
- As técnicas histopatológicas utilizadas como biomarcadores de exposição crônica ao mercúrio demonstraram que mesmo em condições naturais há uma relação direta entre os efeitos e os níveis de bioacumulação do mercúrio;
- Outras metodologias associadas com aspectos patológicos em tecidos alvos devem ser exploradas com o intuito de melhorar a interpretação dos efeitos histopatológicos, visto que esta ferramenta tem se mostrado cada vez mais útil neste tipo de avaliação.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil-CNPq (projetos 553269/2005-4 e 555543/2006-4) e parcialmente financiado pelo Edital CT-AMAZONIA/MCT/CNPq nº 27/2005 dentro do projeto: IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES BIOLÓGICOS COM PROSPECÇÃO BIOTECNOLÓGICA ATRAVÉS DE MONITORAMENTO AMBIENTAL, coordenado pelo Dr. Wanderley Rodrigues Bastos da Fundação Universidade Federal de Rondônia, em colaboração com o Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR. Os autores agradecem todo o apoio logístico e técnico dado por Roberto Keidi Miyai e o Diretor Regional Edgar Temporim Filho da ELETRONORTE Companhia de Rondônia e pela relevante contribuição dada pela Universidade Federal de Rondônia (UNIR).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, C. e ROBERTS R. J. Effects of starvation on the melanomacrophage centres of fish. **J. fish biol.**, 19, 161-169, 1981.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais **Rev. Bras. Epidemiol.**, 158. v. 6, n. 2, 2003.

AOUDJIT, F.; VUORI, K. Matrix attachment regulates fas-induced in endothelial cells: A role for c-Flip and implications for anoikis. **J. Cell Biol.**, v.152, p.633-643, 2001.

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 44, 62-72,1999.

ASCHNER, M. Neurotoxic mechanisms of fish-borne methylmercury. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 12, 101-104, 2002.

AU, D.W.T. The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Mar. Pollut. Bull.**, 48, 817-834, 2004.

BERNET, D.; SCHIMIDT, H; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P. AND WAHLI, T. Histopatology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Diseases**, 22, 25-34, 1999.

BERTO, A. G. A.; SAMPAIO, L.O.; FRANCO, C.R.C.; CESAR, JR.R.M. AND MICCHELACCI, Y. M. A comparative analysis of structure and spatial distribution of decorin in human leiomyoma and normal myometrium. **Biochim. Biophys. Acta**, (BBA) - General Subjects V.1619, Issue 1, 2 January , Pages 98-112, 2003.

BRASIL. Ministério do Trabalho. **Secretaria de Segurança e Higiene e Medicina do Trabalho.Segurança e Medicina do Trabalho**: Lei n. 6514, de 22de dezembro de 1997, normas regulamentadoras (NR) aprovadas pela Portaria 3214, de 8 de junho de 1978.43.ed. São Paulo: Atlas; 1999.

COSTA, P. M.; CAEIRO, S.; LOBO, J; MARTINS, M.; FERREIRA, A. M.; CAETANO M.; VALE, C.; DELVALLS , T. A.; COSTA, M.H. Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological índices from laboratory and in situ tested fish, **Mar. Poll. Bull.**, *In press*, 2010.

COTRIM, H. P. Doença hepática gordurosa não alcoólica. **Programa de Educação Médica Continuada da Sociedade Brasileira de Hepatologia**, 2006.

DATTA, S.; GHOSH, D.; SAHA, D.R.; BHATTACHARAYA, S. AND MAZUMDER, S. Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: Role of head kidney macrophages as biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*. **Aquat. Toxicol.**, v. 92, Issue 2, 9 April, p86-94, 2009.

DIETRICH, C.P.; ARMELIN, H.A. Sulfated mucopolysaccharides from normal 3T3 cells and its tumorigenic variant ST1: Possible role of chondroitin sulfates in neoplastic transformation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1978, v.84, p.794-801.

DREVINICK, P.E.; ROBERTS, A.P.; OTTER, R.R.; HAMMERSCHMIDT, C.R.; KLAPER, R. AND ORIS, J.T. Mercury toxicity in livers of northern pike (*Esox lucius*) from Isle Royale, USA Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, v. 147, Issue 3, p.331-338, 2008.

DUTTA, H. M.; ADHIKARI, N. K.; SINGH, P. K.; MUNSHI, J. S. Histopathological changes induced by malathion in the liver of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 51, 895-900, 1993.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J. V.; GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to water borne copper. **Pesqui. Vet. Bras.**, 27 (3), 103-109, 2007.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; NAKAO, L.S.; RANDI M.A.F.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A. Toxic effects of DDT and methylmercury in the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. **Toxicol. In Vitro.**, 22, 1705-1713, 2008.

GIARI, L.; MANERA, M.; SIMONI, E.; DEZFULI, B.S. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. **Chemosphere.**, 67, 1171-1181, 2007.

GIARI, L.; SIMONI, E.; MANERA, M.; DEZFULI, B.S. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 70, 400-410, 2008.

HAY, E.D. **Cell-Matrix interaction in the embryo**: cell shape, cell surface, cell skeletons, and their role in differentiation, *In: The role of extracellular matrix in development*. R.L. Trelstad Ed., New York, **Alan R. Liss Inc.**, p.1-32, 1984.

HAY, E.D. **Cell Biology of extracellular matrix**. 2nd ed. Plenum Press. New York. p.468, 1991.

HINTON, D.E.; LAUREN, D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. *In: McCarty, J.F., Shigart, L.R. (Eds.), Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, p.15-57, 1990.

IOZZO, R.V. Proteoglycans: structure, function and role in neoplasia. **Lab. Invest.**, 1985, v.53, p.373-396.

JACKSON, R.L.; BUSCH, S.J.; CARDIN, A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. **Physiol. Rev.**, v.2, p.481-538, 1991.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. HISTOLOGIA BÁSICA – 11.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KÜHN, K. The classical collagens: types I, II and III. In: Biology of extracellular matrix: A series-structure and function of collagen types. Ed. R. Mayne R.E., Burgeron, Orlando, **Academic Press.**, p.2-42, 1987.

KUNO, R.; ROQUETTI, M. H. E UMBUZEIRO, G. A. **Indicadores biológicos de exposição ocupacional x ambiental**, Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente disponível em: <http://www.ecodebate.com.br/2009/07/15/indicadores-biologicos-de-exposicao-ocupacional-x-ambiental-artigo-de-rubia-kuno-maria-helena-roquetti-e-gisela-a-umbuzeiro/>. Acesso em: 25.10.2010.

LEENHUER, E. L. **Haemopoiesis in the kidney of *Oncorhynchus masou* (Brevoort) M.S.** Thesis. University of Western Ontario, London, 1969.

LIAO, C-Y.; FU, J-J.; SHI, J-B.; ZHOU, Q-F.;YUAN, C-G.; JIANG, G-B. Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. **Environ.Toxicol. Pharmacol.**, 22, 225–233, 2006.

MANERA, M.; SERRA R.; ISANI, G. & CARPENÉ, E. Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. **J. Fish Biol.**, 57, 457-465, 2000.

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*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, In Press, Corrected Proof, 2007.

MIRANDA, A.L.; ROCHE, H.; RANDI ,M.A.F.; MENEZES, M.L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environ. Int.** 34:939-949, 2008.

MISHRA, A. K., MOHANTY, B. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 26,136-141, 2008.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; ROULEAU, C.; PELLETIER, E.; AUDET, C. AND TIALVE, H. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Artic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Sci. Technol.**, 33, 902-907, 1999.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PELLETIER, E.; PFEFFER W.C. AND ROULEAU, C. Comparative Uptake, Bioaccumulation, and Gill Damages of Inorganic Mercury in Tropical and Nordic Freshwater Fish. **Environ. Res.**, Section A 83, 286-292, 2000.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; BELGER, L.; PELLETIER, E.; Rouleau, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Res.**, 90,217-225, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat. Toxicol.**, v.74, p.53-69,2005.

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. **Environ. Res.**, v.101, p.74-80, 2006.

OLOJO, E.A.A.; OLURIN, K.B.; MBAKA, G.; OLUWEMIMO, A.D. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish, *Clarias gariepinus* exposed to lead. **Afr. J. Biotechnol.** , 4 (1), 117-122, 2005.

POOLE, A.R. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. **Biochem. J.**, v.236, p.1-14, 1986.

RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, È.; AKAISHI,F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.60, p.147-156, 2005.

RABITTO, I.S.; BASTOS, W.R.; RONALDO ALMEIDA, R.; ADILSON ANJOS, A.; HOLANDA, I.B.B; GALVÃO, R.C.F.; FILIPAK NETO, F.; MENEZES, M.L.; SANTOS, C. A. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environ. Int.**, 37, 56–65, 2011.

RÜDIGER, H.W. Biomonitoring in occupational medicine.In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F(eds.). **Toxicology**. San Diego: Academic Press; p.1027-39, 1999.

SAMPAIO, L.O.; DIETRICH, C.P.; GIANOTTI FILHO, V. Changes in sulfated mucopolysaccharide composition of mammalian tissues during growth and cancerization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 498, p.123-131, 1977.

SERPA, Ricardo Rodrigues. Gerenciamento de riscos ambientais. **Desenvolvimento e Meio ambiente**. Curitiba, n. 5, p. 101-107, 2002.

VELMURUGAN, B.; SELVANAYAGAM, M.; CENGIZ, E. I.; UNLU, E. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. **Environ. I. Toxicol. Pharmacol.**, 24, 286-291, 2007.

VILELA, L. M.; DEL CARLO, R. J.; SILVA J. C. P.; DA MATTA S. L. P.; RODRIGUESM, C.D., E REIS. A.M.S. Avaliação das fibras colágenas de meniscos

frescos e preservados em glicerina: estudo experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Pesq. Vet. Bras.**, 30 (4):321-327, abril, 2010.

WALTER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis Eds., 321p, 1997.

WOLKE, R. E. Piscine macrophages aggregates: a review **Annual Review of Fish Diseases** . v.2 ,91-108, 1992. *In*: Manera M et al. Macrophage aggregates. *In*: gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. **J. Fish Biol.**, 57 457-465, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria, 155: **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva; 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. v.1 e 2 , Geneva, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 214: **Human exposure assessment**, Geneva; 2000.

YASSI, A.; KJELLSTRÖM, T. **Conexiones entre la salud ambiental y la salud en el trabajo**. *In*: ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO. Madrid: OIT, v.II, p.53.2-53.52001.

ANEXO

ARTIGO PUBLICADO: RESULTADOS REFERENTES AO CAPÍTULO I DA TESE

RABITTO, I.S.; BASTOS, W.R.; RONALDO ALMEIDA, R.; ADILSON ANJOS, A.; HOLANDA, I.B.B; GALVÃO, R.C.F.; FILIPAK NETO, F.; MENEZES, M.L.; SANTOS, C. A. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environ. Int.**, 37, 56–65, 2011.



Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon

Inês da Silva Rabitto ^{a,*}, Wanderley Rodrigues Bastos ^b, Ronaldo Almeida ^b, Adilson Anjos ^e,
 Ígor Bruno Barbosa de Holanda ^b, Roberta Carolina Ferreira Galvão ^b, Francisco Filipak Neto ^a,
 Manoel Lima de Menezes ^c, Cid Aimbiré Moraes dos Santos ^d, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro ^a

^a Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^b Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, Wolfgang C. Pfeiffer Núcleos de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista. Av. Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, CEP: 17.033-360, Baurú, SP, Brazil

^d Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^e Departamento de Estatística, Setor de Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2010

Accepted 4 July 2010

Available online 29 July 2010

Keywords:

Mercury

DDT

Fish

Cichla monoculus

Bioaccumulation

Amazon

ABSTRACT

In order to investigate the potential risk of mercury and DDTs exposure to fish-eating human populations in Samuel Reservoir, not affected directly by gold-mining activities, the axial muscle of *Cichla monoculus* was analyzed. Twenty-nine and thirty adults individuals were collected respectively on February (rainy season) and August (dry season) 2007. The specimens were sacrificed by spinal section before sex identification, body weight and total length determination. For total mercury, DDT and DDE quantifications and cholinesterase activity samples of the axial muscle were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, and for histopathological studies gill and liver were fixed in ALFAC solution for 16 h. A value of 48.2% and 33% of the individuals, respectively from rainy and dry seasons, presented mercury concentrations higher than the maximum established for safe human consumption ($0.5\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) by World Health Organization. A positive correlation between body weight and Hg concentration was observed only in individuals from the rainy season, but no correlation was observed to DDT and DDE from both seasons. Differently from that observed to mercury, DDT levels presented a significant difference between both studied seasons, but no correlation was observed for both mercury and DDTs and sex. The levels of DDTs in muscle of *C. monoculus* are under the maximum established by FAO-Alimentarius CODEX and Swedish Food Regulation for human consumption. The histopathological and neurotoxic findings showed that the wild population of fish is affected by chronic exposure to mercury, meaning risk also to fish-eating populations. Finally, the results showed that *C. monoculus* is an important vehicle for human exposure to mercury and DDTs in Samuel Reservoir and that it is necessary a continuous biomonitoring of the levels of both pollutants in order to manage the risk of exposure to human populations.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In general, pollutants are toxic to humans and pollutant contaminated food has been associated with devastating effects to health. On this way, fishes are important vehicles of exposure to human populations through feeding, especially in populations where fishes are consumed daily as part of the diet. Recently, studies have been focused on quantitative estimates of risks versus benefits of fish intake for human health (Gladyshev et al., 2009; Jiang et al., 2010), as also reported by Foran et al. (2005) for methyl mercury in wild and farmed salmon. This establishes an important paradigm, since fish consumption provides many benefits for human health due to its high contents of essential polyunsaturated fatty acids of ω -3 family (EFA) (Gladyshev et al., 2009), which acts on prevention of cardiovascular diseases and neural disorders (Silvers and Scott, 2002).

shev et al., 2009), which acts on prevention of cardiovascular diseases and neural disorders (Silvers and Scott, 2002).

The neuronal toxic consequences of MeHg (monomethyl mercury) ingestion to humans are well-recognized since the 1950s (Amin-Zaki et al., 1979; Harada, 1995). Among the effects, risks of development of mental retardation, cerebral palsy, blindness and deafness have been reported mainly in children (Chevrier et al., 2009). According to Akagi et al. (1993) and Cordier et al. (2002) MeHg exposure to human population in Amazon is related with freshwater fish consumption. Also, Schneider et al. (2009) described that mercury is a major pollutant in the river systems of Amazon and fishes are considered the main source of protein and Hg for riverine human populations. According to Belger and Forsberg (2006) the high levels of mercury contamination in fish and human hair confirm the potential health risk for local fish-eating human populations.

Since the late 1980s gold-mining activities have been described as the most important source of mercury contamination in Amazon waters (Kehrig et al., 2008). Despite of that, several studies have

* Corresponding author. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Curitiba, PO Box 19031, ZIP CODE 81531990, PR, Brazil.
 Fax: +55 41 3361 1756.

E-mail address: israbitto@ufpr.br (I.S. Rabitto).

argued that the high Hg values may also be related to other human activities including biomass burning (Meech et al., 1997) and enhanced erosion of soil resulting from deforestation (Lechler et al., 2000). In the environment, the chemical forms of mercury are interchangeable, but the most toxic is the methylated one easily bioaccumulated by aquatic organisms through trophic exposure (Ramesh, 2007). Despite of a decrease of the levels of Hg discharge due to gold-mining activities in Brazilian Amazon over time, the contamination of soil and sediments still persists. As a consequence, high mercury concentrations in fishes and human hair were reported even far away from the areas impacted by gold-mining activities (Bastos et al., 2007; Dórea and Barbosa, 2007).

The organochloride pesticide DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane) was one of the first synthetic chemicals to be largely produced and rapidly and widely dispersed in the environment (Filipak Neto et al., 2008). DDT and its metabolites (DDE – dichlorodiphenyldichloroethylene and DDD – dichlorodiphenyldichloroethane) are highly persistent and tend to accumulate in fat tissues of animals including fishes (Oliveira Ribeiro et al., 2005; Miranda et al., 2008). This compound was banned in 59 countries including Brazil (D'Amato et al., 2007), but in Amazon is still used to control the malaria disease vector. DDT and metabolites are described as endocrine disruptors by Leaños-Castañeda et al. (2007) causing, among other biological disturbs, impaired male reproductive ability due to sex hormonal unbalance (Binelli and Provini, 2003). It has been estimated that over 90% of the DDT stored in the human population is derived from food, particularly from fat of animal origin such as fish (Chung et al., 2008).

Biomonitoring is the regular, systematic use of living organisms to evaluate changes in environment such as water quality (Sanchez et al., 2010; Van der Oost et al., 2003; Zhou et al., 2008). Biomarkers are biological responses to pollutants that can be measured and are very useful in biomonitoring applications (Walker, 1996).

The species of fish considered in the present study, *Cichla monoculus*, is a predator species commercially important due to its high preference in Amazon human diet (Kullander and Ferreira, 2006). On this way, the current work reports the mercury and DDT bioaccumulation in muscle of *C. monoculus* from the Samuel Reservoir, with the aim of discussing the need of risk assessment for fish-eating human population relating to the bioaccumulation of mercury and DDTs through contaminated fish consumption and evaluates possible effects in the fishes using biomarkers of exposure. According to the mercury bioaccumulation data, the animals were divided in three groups to investigate the relationship between the presences of the pollutants with histopathological damages observed in the gills and liver or neurotoxic disturbs through cholinesterase activity in brain and muscle.

2. Materials and methods

2.1. Studied area and fish sampling

The Samuel Reservoir is a hydroelectric dam built 28 years ago, presenting an area of approximately 634 km² and a maximum depth of 15–20 m (Nascimento, 2006). Two sites within the Samuel Reservoir (08°44'59"S and 63°26'05"W corresponding to Site 1; 08°51'47"S and 63°17'35"W corresponding to Site 2) were considered in the current study (Fig. 1). Twenty-nine and thirty specimens of *Cichla monoculus* were collected in 2007 respectively on February (rainy season) and August (dry season) totaling fifty-nine adult individuals between males and females. The individuals were transported alive to the laboratory, identified according to Santos et al. (1991), anesthetized with benzocaine (2% in water) and killed by spinal section before sex identification and body weight (g) and total length (cm) determination (Table 1). Muscle samples (approximately 15 g each) were stored in polyethylene bags at –20 °C until

chemical analysis of mercury at the Environmental Biogeochemistry Laboratory, University of Rondônia (Brazil) and DDT at University of São Paulo State. The immature specimens were not considered for comparisons between males and females.

2.2. Total mercury determination in muscle

The total mercury bioaccumulation was quantified by atomic absorption spectrophotometer coupled with cold vapor generation FIMS-400 (Flow Injection Mercury System-Perkin Elmer, Ueberlingen, Germany). For every 0.4 g of muscle sample (wet weight) 5 ml of acid mixture (H₂SO₄:HNO₃, 1:1) was added, for tissue digestion, in a digestion block, for 60 min (Tecnal-Mod.007A, Piracicaba, São Paulo, Brazil). After the digestion process, 4.0 ml of KMnO₄ solution (5%) was added in the digestion block, for another 30 min. After cooling to room temperature (25 °C), drops of 12% hydroxylamine chloride solution were added and the samples were transferred to volumetric flasks with 12 ml ultrapure water. All glassware was washed with 10% HNO₃ and rinsed with ultrapure water (Milli-Q Plus, Millipore, Bedford, MA, USA). The analytical quality was checked by standard deviation (\pm SD) from mean values of triplicates, by analysis of reagent blanks and with a detection limit of 0.01 $\mu\text{g l}^{-1}$. Analytical control and accuracy were assured by the use of internal standards prepared in the Biogeochemistry Laboratory at the University of Rondônia (AFPX 5130) against reference certified samples (Dogfish Muscle-DORM-2 National Research Council of Canada, Ottawa) and used in intercalibration exercises among Brazilian Laboratories (Table 2). Details of the sample digestion and analysis are described elsewhere (Bastos et al., 1998, 2006). The results were expressed as $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ wet weight.

2.3. DDT and DDE analyses: reagents and standards

All solvents and reagents used were of the highest purity commercially available and analytical reagent grade. Acetonitrile (J.R. Baker®), *n*-hexane (Proquimios®), and formic acid (P.A.) (Merck®) were used. Florisil (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was activated at 300 °C for 24 h before use. Dichlorodiphenyltrichloroethane (*p,p'*-DDT) and dichlorodiphenyldichloroethane (*p,p'*-DDE) from AccuStandard® (New Haven, USA) were used as the standard.

2.4. Analytical procedures

The analyses were performed according to AOAC (1997). Samples of the axial muscle of *C. monoculus* (5 g) were homogenized with ultrapure H₂O (5 ml) and mixed with 0.5 ml formic acid, 5 ml of sodium sulfate at 30%, and 30 ml of acetonitrile. The extraction of DDT was performed with a mixture of *n*-hexane: acetonitrile (20:30 v/v). The samples were stirred in a shaker for 10 min, paper filtered, and transferred to another filler, agitated twice for 30 s and dried over anhydrous sodium sulfate. The extract was evaporated at a temperature below 70 °C to nearly 10 ml, and 10 ml of hexane/dichloromethane (1:1) was added. The samples were transferred to a florisil column (3 g) and into an extraction filter.

2.5. Instrumentation

Capillary gas chromatography (CG) analysis was carried out in a Clarus 600 gas chromatograph (Perkin Elmer Inc.) equipped with an electron capture detector. Gas chromatography was performed on an Elite capillary column of 30 m, 0.25 mm ID, and 0.25 μm film thickness, with nitrogen as the carrier gas (1 ml min⁻¹). The temperature of the injector was 250 °C and the ECD detector 300 °C. The CG oven temperature was 250 °C for 6 min. The results were expressed as ng DDTs g⁻¹ wet weight.

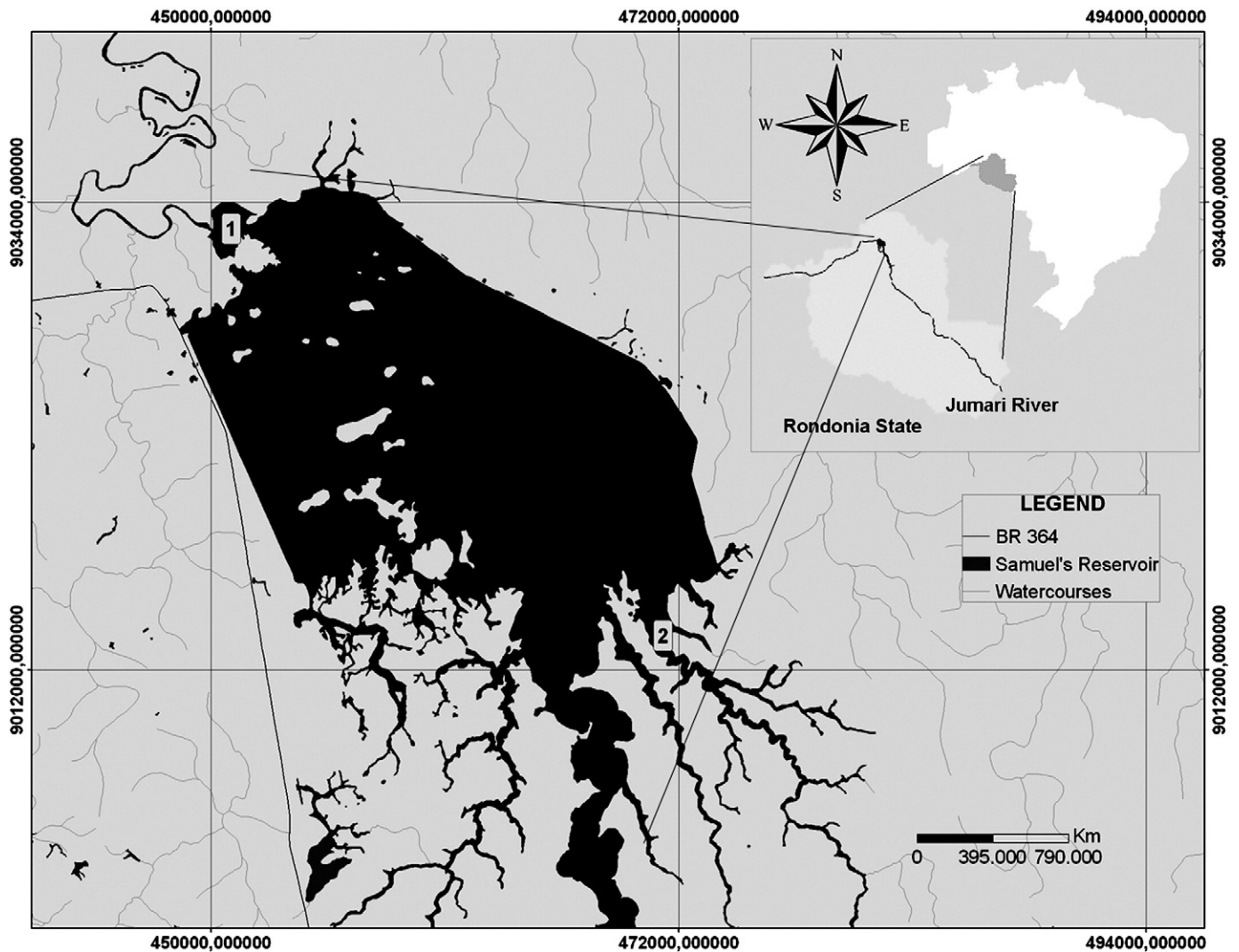


Fig. 1. Map of Samuel reservoir localization. Numbers 1 and 2 represent the studied sites, respectively at 08°44'59"S and 63°26'05"W, and at 08°51'47"S and 63°17'35"W, in Rondônia State, Brazil. The Jamari River is the main tributary of the Samuel hydroelectric reservoir and is not impacted by gold-mining activities (Adapted from Nascimento, 2006).

2.6. Histopathological procedures

Gills and liver samples were preserved in ALFAC fixative solution (70% ethanol, 4% formaldehyde and 5% glacial acetic acid) for 16 h, dehydrated in a graded series of ethanol baths and embedded in Paraplast Plus resin (Sigma®). Sections of 5 µm were stained in Haematoxylin and Eosin.

In order to analyze the relationship among concentration of mercury in muscle and alterations and lesions in liver and gills of *Cichla monoculus*, from the total of fifty-nine individuals used to evaluate the liver lesions, three groups were separated according to the bioaccumulation levels of mercury in muscle: Group A (24 individuals) with 0.10 to 0.35 µg Hg g⁻¹; Group B (17 individuals)

with 0.36 to 0.60 µg Hg g⁻¹ and Group C (18 individuals) with 0.61 to 1.60 µg Hg g⁻¹. Results were expressed as a prevalence of fishes with histopathological lesions, and gill and liver alteration indexes were determined according to Bernet et al. (1999). Briefly, this index is based on the sum of the score rankings and importance factors for each alteration considered in the tissue. The score ranking was based on the percentage of lesions, and the importance factor was determined for each lesion depending on the effects considered as minimal (1), moderate (2) and harsh and irreversible (3).

For scanning electron microscopy, gills samples were fixed in glutaraldehyde 3% in cacodilate buffer (0.1 M, pH 7.2–7.4) for minimal of 24 h, rinsed in the same buffer and dehydrated in ethanol series

Table 1
Biological parameters of *C. monoculus* collected at rainy and dry seasons.

	Rainy season			Dry season		
	n	Weight (kg)	Length (cm)	n	Weight (kg)	Length (cm)
Male	6	0.981 ± 0.541	39.1 ± 7.2	17	0.924 ± 0.636	36.7 ± 8.6
Female	21	0.879 ± 0.444	38.0 ± 5.9	13	0.616 ± 0.294	33.8 ± 5.5
Immature	2	0.292 ± 0.017	28.8 ± 0.8	–	–	–
Total	29	0.860 ± 0.487	38.0 ± 6.5	30	0.791 ± 0.539	35.0 ± 7.6

n (number of individuals).

Table 2
Results from quality control of Hg analysis.

Standard	Total Hg established	Total Hg obtained	Difference (obtained-established)
External laboratory DORM 2*	4.64 ± 0.26 µg g ⁻¹	4.68 ± 0.15 µg g ⁻¹	–9%
Internal laboratory AFPX5130**	14.42 ± 1.96 µg g ⁻¹	15.41 ± 0.6 µg g ⁻¹	–7%

* AFPX5130 refers to wet weight.

** DORM 2 refers to dry weight. Mean ± SD.

(Merck®) and liquid CO₂, mounted in stubs and metalized with gold before being analyzed in a JEOL JSM-6360LV.

2.7. Cholinesterase activity

Brain and muscle were sampled in order to investigate the activity of cholinesterase activity. The AChE activity was measured spectrophotometrically at 405 nm according to Ellman et al. (1961), with minor modifications for use in 96-well microplates by Silva de Assis (1998).

2.8. Statistical procedures

The mean total mercury concentration between the studied sites was compared using analysis of covariance (ANCOVA), with the weight as the covariate. When the weight covariable was not significant, one-way analysis of variance (ANOVA) was used. Pearson's correlation coefficient was utilized to compare the association between the variables, the biological parameter weight, and the concentration of Hg in the skeletal muscle. Parametric and nonparametric tests were used, and the means of the Hg concentrations within and among the dry and rainy seasons were analyzed by using the Wilcoxon test. Values were presented as mean ± standard deviation, based on the wet weight muscle samples. For each analysis, the normal distribution was verified. Statistical analyses were performed by using the Software R (2008) and the value of $p < 0.05$ was considered as statistical significant.

3. Results

3.1. Mercury bioaccumulation

The bioaccumulation of Hg in muscle of *C. monoculus* sampled at rainy and dry seasons ranged from 0.157 to 1.53 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ w.w., where 48% of the individuals from rainy season and 33% of the individuals from dry season presented levels of mercury higher than that established by the World Health Organization (WHO) for safe human consumption (0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Fig. 2). The average Hg bioaccumulation observed in the fishes from the rainy season was 0.575 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ w.w., whereas that from the dry season was 0.448 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ w.w. (Table 3).

A correlation analysis between the biometric parameter "weight" and Hg levels in the muscle indicated a significant positive correlation ($p < 0.01$, $r = 0.40$) (Fig. 3). The total length and Hg bioaccumulation presented no significant correlation when fishes from both studied seasons were considered together. However, a separate analysis showed a positive correlation during the rainy season ($p < 0.01$, $r = 0.57$), but not during the dry season ($p = 0.24$, $r = 0.21$). No significant difference was found between the mercury bioaccumulation in *C. monoculus* at both considered seasons. The total

Table 3

Total mercury ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ wet weight) and DDT and DDE (ng g^{-1} wet weight) bioaccumulation in muscle of *C. monoculus* from Samuel Reservoir during rainy and dry seasons.

		Rainy season	Range min–max	Dry season	Range min–max
Mercury	Male	0.513 ± 0.328	0.157–1.16	0.420 ± 0.179	0.157–0.728
	Female	0.613 ± 0.379	0.254–1.09	0.507 ± 0.261	0.273–1.10
	Immature	0.379 ± 0.020	0.349–0.39	–	–
	Mean	0.575 ± 0.343	0.212–1.53	0.448 ± 0.225	0.157–1.10
DDT	Male	1.58 ± 2.24	0.12–5.47	1.36 ± 0.85	0.02–2.72
	Female	1.09 ± 1.53	0.17–5.83	2.98 ± 2.88	0.15–8.46
	Immature	0.24 ± 0.20	0.04–0.43	–	–
	Mean	0.93 ± 1.64	0.04–5.83	1.77 ± 2.03	0.02–8.42
DDE	Male	4.52 ± 2.40	2.21–8.34	4.67 ± 3.76	0.20–12.61
	Female	4.38 ± 1.97	0.27–7.69	5.98 ± 2.88	0.36–9.68
	Immature	5.22 ± 0.08	5.14–5.29	–	–
	Mean	4.46 ± 2.97	0.27–8.34	5.25 ± 3.45	0.20–12.62
∑ DDTs	Mean	5.40 ± 2.92	0.63–13.81	7.03 ± 4.10	0.54–15.34

Mean ± Standard Deviation. **Rainy season** (n = 29), male (n = 06), females (n = 21) and immature (n = 2). **Dry season** (n = 30), male (n = 17), females (n = 13).

mercury bioaccumulation in the muscle did not present any correlation with sex, considering the two studied seasons in isolation or together.

3.2. DDT and DDE bioaccumulation

The total DDT (\sum DDTs, i.e., DDT + DDE) bioaccumulation in muscle of *C. monoculus* ranged from 0.54 to 15.34 ng DDTs g^{-1} w.w., with the maximum levels reaching 12.62 ng DDE g^{-1} and 8.42 ng DDT g^{-1} both in the dry season. In the rainy season the results were different, the maximum levels of DDE and DDT reached 8.34 ng g^{-1} and 5.83 ng g^{-1} , respectively (Table 3). The metabolite DDE was more persistent than the parental compound DDT, representing 82.8% (rainy season) and 74.8% (dry season) of the total DDTs. The metabolite DDE and the DDT were, respectively, detected in 100% and 86.2% of the individuals from the rainy season and in 96.7% and 80% of the fishes from the dry season (Table 3).

No significant difference was observed between the DDE tissue levels for both considered seasons, but the DDT levels indicated a significant difference (p -value = 0.03) for seasonality. Correlation analysis between the biometric parameter weight and DDE levels in the muscle indicated a significant negative correlation ($p < 0.001$, $r = -0.40$), particularly during the rainy season ($p < 0.014$, $r = 0.45$). Total length, sex, DDE and DDT levels presented no significant correlation.

3.3. Biomarkers

3.3.1. Morphological aspects

Liver and gills were considered in the current work to evaluate the histopathological alterations in *C. monoculus* from Samuel Reservoir. The Table 4 shows the

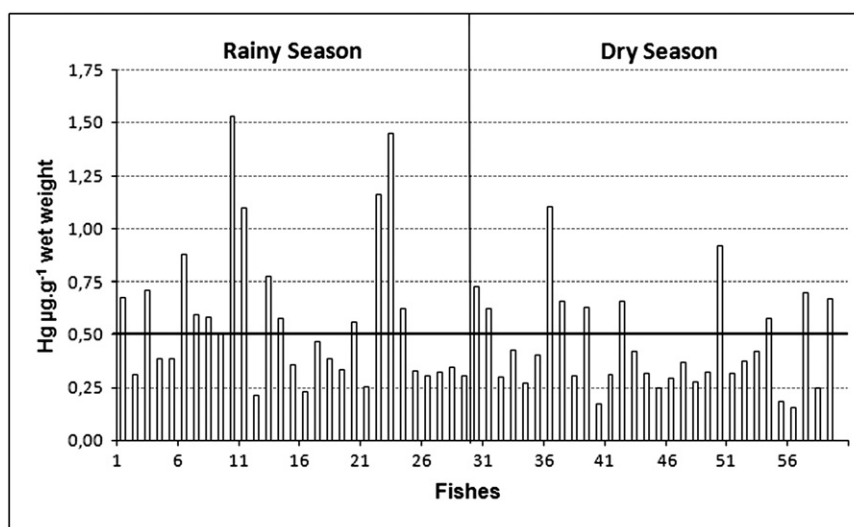


Fig. 2. Total mercury bioaccumulation in the muscle of *C. monoculus* from rainy (1–29) and dry seasons (30–59). The horizontal line indicates the maximum Hg concentration (0.5 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$) considered safe for human consumption according to the World Health Organization (WHO).

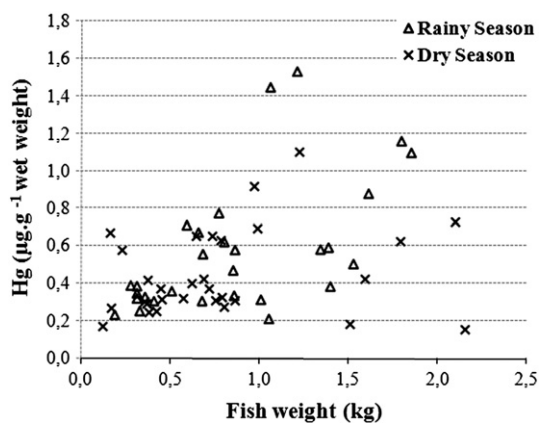


Fig. 3. Positive correlation between total mercury bioaccumulation in the muscle ($\mu\text{g g}^{-1}$) and body weight (kg) ($r=0.40$).

alterations and damages summarized as occurrence (%) in liver and gills according to the bioaccumulation level of mercury in muscle and the Bernet's index of lesion increased with these levels.

Gills present the primary and secondary lamellas as already described for teleosts. The secondary lamellas are laterally disposed on both sides of primary lamella and represent the surface area for gas exchange (Fig. 4A and B). Also, between the secondary lamellas there are chloride cells with an important role in the osmoregulation of fishes and microridges on surface of epithelial cells from primary lamella without a known function (Fig. 4b1). The incidence of cells being discharged from secondary lamellas surface were visible and common in the majority of individuals (Fig. 4b2). However, the most important lesions found in gills of *C. monoculus* were the hyperplasia with consequent secondary lamellas fusion (Fig. 4C–H).

In the few studies available concerning to bioaccumulation of mercury in muscle and liver of fish naturally exposed to mercury, the concentration in liver were always higher than that in muscle. In the current work the bioaccumulation of mercury and DDT's was determinate only in muscle. Liver of *C. monoculus* presented an organization similar to that described for the majority of teleosts, presenting a very homogeneous hepatic tissue with sinusoids and diffuse pancreatic tissue (Fig. 5A and B). In general, the most important alterations found in liver were the occurrence of inflammatory response, necrotic areas, cytoplasmatic vacuolization and cytoplasmatic inclusions (Fig. 6C and D). Also the occurrence of free melanomacrophages and melanomacrophage centers were observed (Fig. 7A).

Comparatively, individuals from Group C presented higher incidence of necrosis (Fig. 7B), free melanomacrophages and melanomacrophage centers (Fig. 7A) (Table 4) than the other groups, but the inflammatory response did not change among groups (Table 4). Despite of the cytoplasmatic vacuolization and the occurrence of cytoplasmatic inclusions did not show differences among groups, those findings were much more severe in the groups with higher levels of mercury in muscle (Figs. 5–7).

3.3.2. Cholinesterase activity

Despite of a tendency of reduction of cholinesterase activity measured in brain of *C. monoculus*, no significant effects were found among groups. Conversely, an unexpected significant increase in the cholinesterase activity occurred in muscle of individuals from the higher mercury concentration group (Fig. 8).

Table 4

Occurrence (%) of histopathological findings in liver and gill of *Cichla monoculus* from Samuel Reservoir chronically exposed to mercury ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ w.w.).

Histopathological changes	Group A	Group B	Group C
	(0.1–0.35)	(0.36–0.60)	(0.61–1.6)
<i>Liver</i>			
Necrosis	50	71	100
Inflammatory response	50	43	43
Cytoplasmatic vacuolization	50	43	71
Melanomacrophage center	33	71	100
Free melanomacrophage	50	100	100
<i>Gills</i>			
Endothelium hyperplasia	50	57	85
Endothelium hypertrophy	50	43	85
Aneurisms	16	–	–
Lamellar fusion	50	43	85
Change Index (Bernet's Index)	7.7	11.1	12.6

Group A n = 24, group B n = 17, group C n = 18.

4. Discussion

The complexity of the Amazon rivers system, due to the environmental changes brought about by annual flooding, hampers the understanding of mercury transfer and risk to biota, including human exposure. This is particularly important because mercury levels in muscle of fishes from Amazon are over the limit established by WHO as safe for human consumption (Dórea et al., 2006).

The present study showed that the concentration of mercury in the muscle of *C. monoculus*, ranged from 0.157 to 1.53 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ (w.w.), even though there have not been gold-mining activities in Jamari River, a tributary of Samuel reservoir. Furthermore, more than one-third of the individuals had mercury levels exceeding the safe limit for human consumption (WHO, 1990). Comparing these values with those of another study in the same river system (Reuther, 1994), the bioaccumulation of mercury in muscle of *C. monoculus* increased at minimum two-fold over the last sixteen years. Differently, a reduction in mercury levels has been observed over time in Tcurui Reservoir (Kehrig et al., 2008; Malm et al., 2004), suggesting that Samuel Reservoir is affected by other sources of mercury contamination, such as the transport over long distances, the remobilization from sediments and the re-emission from soils due to forest burning, increasing the bioavailability of the metal to biota. This hypothesis can be considered because the values reported in the current study are similar to those found for the same species in rivers historically affected by gold-mining activity such as the Madeira River (Bastos et al., 2007; Kehrig et al., 2008). Particularly, the deforestation and land-use changes such as forest conversion to pasture by slash and burning actually represent a very intense activity in Rondônia State, being potentially responsible for maintaining high levels of mercury in Samuel Reservoir (Bastos et al., 2006; Godoy et al., 2002; Lacerda, 1995; Lacerda et al., 2004; Roulet et al., 2000), although the possibility of indirect impacts from gold-mining activity must be better investigated. In addition, the recent projects of Brazilian government of construction of new reservoirs along Madeira River increase the necessity for a better control of mercury bioavailability to biota and human population in reservoirs.

Although the MeHg concentration has not been determined in the present study, this is the main chemical form present in the muscle and liver of fish naturally exposed to mercury (Kehrig et al., 2008), exceeding 70% of the total mercury (Akagi et al., 1995; Bowles et al., 2001; Durrieu et al., 2005; Horvat et al., 2003; Kehrig and Malm, 1999; Mason et al., 2000). According to Reuther (1994), the physicochemical conditions prevailing in tropical waters like Samuel Reservoir may favor mercury mobilization, methylation, and consequently the bioavailability. Then, it is necessary to prevent people from deleterious effects of contaminated fish consumption and to provide healthy diets. According to Gladyshev et al. (2009), a regular monitoring of the hazard quotients for food fish in wild conditions is very desirable. To protect the riverine populations the government agencies should advise this population about the risk of mercury toxicity associated with consumption of specific species and quantities of fish.

Fish consumption is the most significant source of MeHg exposure for the public (Rice et al., 2000) and contaminants such as mercury are in sufficiently high quantities in some fish so as to pose a potential risk to consumers (Burger and Gochfeld, 2009). Otherwise, this is also a very complex discussion because low-fat sources of animal protein that include the presence of essential polyunsaturated fatty acids of the ω -3 family (eicosapentaenoic acid) like fish provide many health benefits, and their importance in the diet has become clear among health-conscious population in the world (Burger and Gochfeld, 2009). On this way, the risk balance considering the risks and benefits of consuming different species of fish could be a new approach for the fish-eating riverine population in Amazon, especially in Samuel Reservoir. *C. monoculus* is long lived, widely distributed in Amazon basin and very acceptable in the human diets, so that it also represents

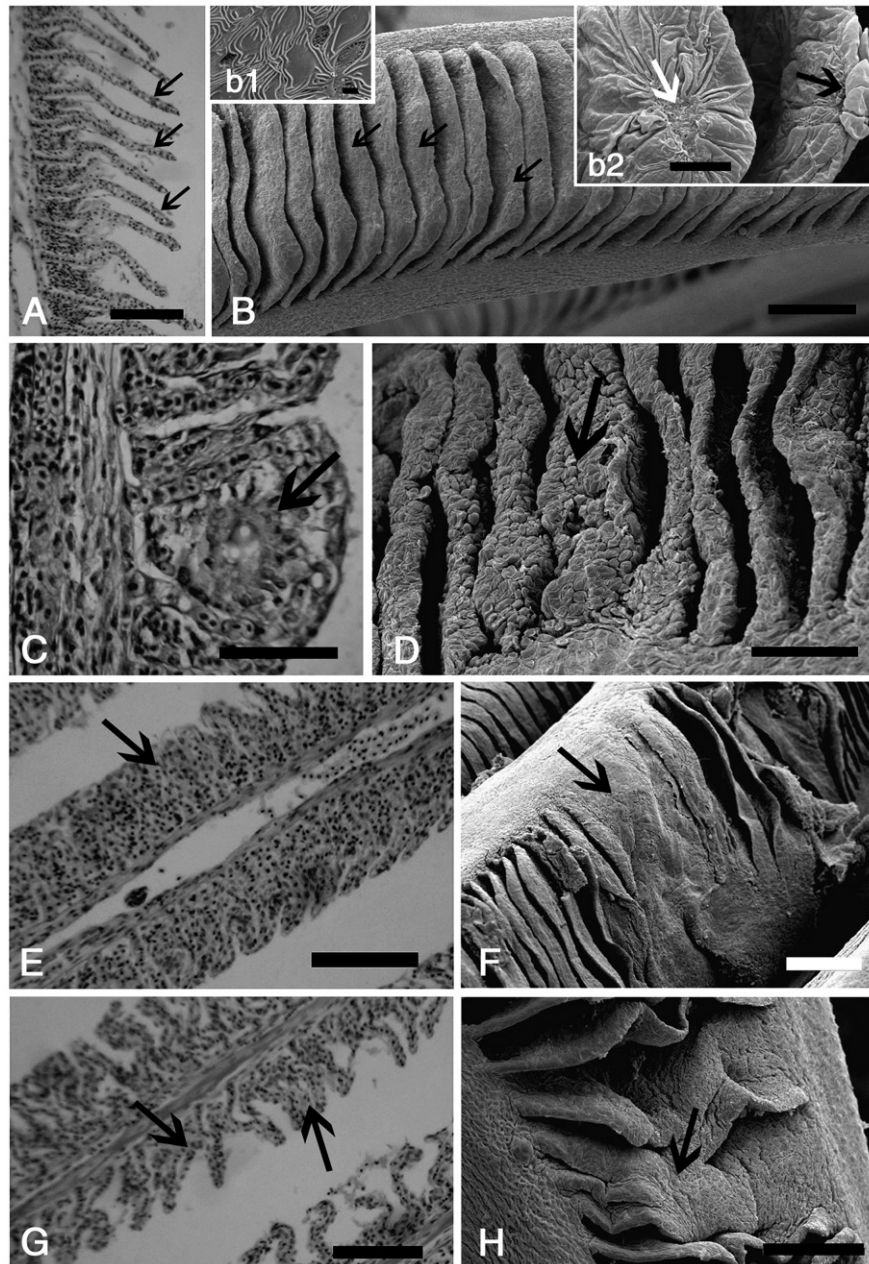


Fig. 4. Morphological damages in gills of *C. monoculus* chronically exposed to mercury. A. Normal aspect of gill. The arrows show the secondary lamellas. Scale bar = 100 μm . B. External view of secondary lamellas (arrows). Observe in b1 the microridges on epithelial cells surface and in b2 the extremity of secondary lamella. The black arrow shows the cell discharge from secondary lamella and the white arrow shows the healing after cell discharge. Scale bar = respectively 100, 10 and 2 μm . C and D. Note the tissue hyperplastic (arrows). Scale bar = 50 μm . E and F. The arrows show the secondary lamella fusion. Scale bar = 100 μm . G and H. Observe disarrange and a partial secondary lamellae fusion (arrows). Scale bar = 100 μm . For light microscopy haematoxylin and eosin stains were used.

a potential risk for health of riverine people. In addition, this species is useful for biological monitoring of environmental mercury contamination with specific interest of providing better and cleaner sources of fishes for human consumption.

DDTs also accumulate in fish and represent a risk to fish-eating population in Amazon. DDT and its metabolites are easily bioaccumulated in the food chain mainly as DDT, DDE or DDD. Regarding the distribution of DDT and its metabolites, Miranda et al. (2008) reported the presence of 100%, 70% and 50% of DDT, DDD and DDE, respectively, in the muscle of piscivorous fish *H. malabaricus*, from Southern Brazil, despite of the fact that DDT has not been regularly used in this region. In the current study, DDE and DDT were detected in more than 85% of *C. monoculus*, from Samuel Reservoir, but the concentrations were lower than the animal limit levels recommended for human

consumption by the Ministry of Public Health in Brazil and by Codex Alimentarius Commission of FAO-WHO (1997), indicating that the fishes were safe to consume concerning DDTs levels. The values are also under the recommended limits for protection of aquatic biota in Great Britain (500 ng g^{-1}) for DDT (GB 2763, 2005), established by the National Academy of Sciences and National Academy of Engineering (1972) (1 $\mu\text{g g}^{-1}$) and by the Swedish Food Regulations (1983) (5 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Chung et al., 2008). The regular use of DDT in the Amazon to control the vector of malaria disease must be the main source of DDT and metabolites to Amazon rivers system (D'Amato et al., 2002, 2007), including to Samuel Reservoir.

The present study provides more information about bioaccumulation of mercury and DDT in the tropical aquatic environment, which is still scarce for Amazon (Dalvie et al., 2004; Kumblad et al., 2001;

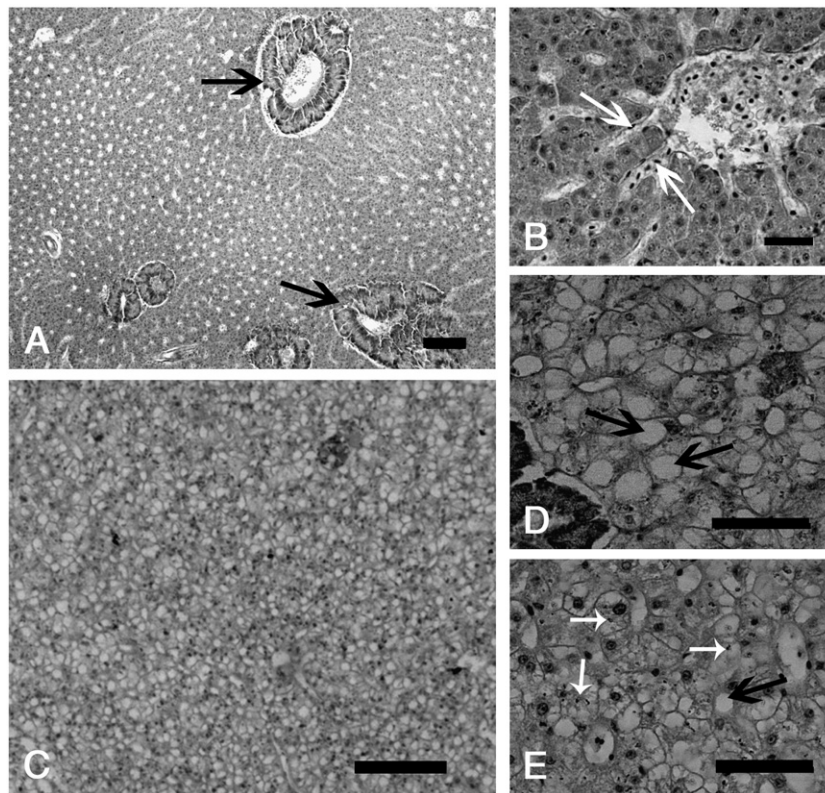


Fig. 5. Histopathological findings in liver of *C. monoculus* from group A (0.10 to $0.35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). A and B showed a normal aspect of the tissue. Observe the diffuse pancreatic tissue (black arrows) and the organization of sinusoids from central vessel (white arrows). Scale bar = 100 and 50 μm . C and D show the cytoplasmic vacuolization. Note in D the empty aspect of the cytoplasm (arrows). Scale bar = 50 μm . E. The hepatocytes presenting both vacuolization (black arrow) and granule inclusion (white arrow) within the cytoplasm. Scale bar = 50 μm . Haematoxylin and eosin stains.

Miranda et al., 2008; Wania and Mackay, 1993). The toxicity related to the association between DDT and mercury is still unclear, but recently Filipak Neto et al. (2008) described the toxicity of these contaminants in hepatocytes of *Hoplias malabaricus*. According to the authors, the association of both contaminants may interfere with the toxicity comparatively with the isolated exposure, leading to cellular malfunction. Then, data about the bioaccumulation of both contaminants and the combined effects of them are necessary to environmental risk assessment in Amazon, which may lead to the re-establishment of safe limit levels with respect to animal and human health.

Finally, the levels of DDT and mercury in the sediment, water, and fish are all likely to induce adverse biological effects to the

ecosystem or human health, via fish consumption. Recently, Grotto et al. (2010) showed that Hg exposure is associated with oxidative stress in fish-eating Amazonian communities. According to the authors, this may explain at least some of the Hg-induced neurological and cardiovascular dysfunctions. Elevated levels of Hg in fish have potential implications for the health of these fish-eating communities, despite of the nutritional benefits of fish consumption. Experimental studies have revealed the effects of mercury in fish and other vertebrates, but few have been concerned with natural and chronic exposure. In addition, the interpretations of the effects in wild animals are quite difficult mainly due to the presence of other pollutants and the interactions among them are still a challenge to ecotoxicologists.

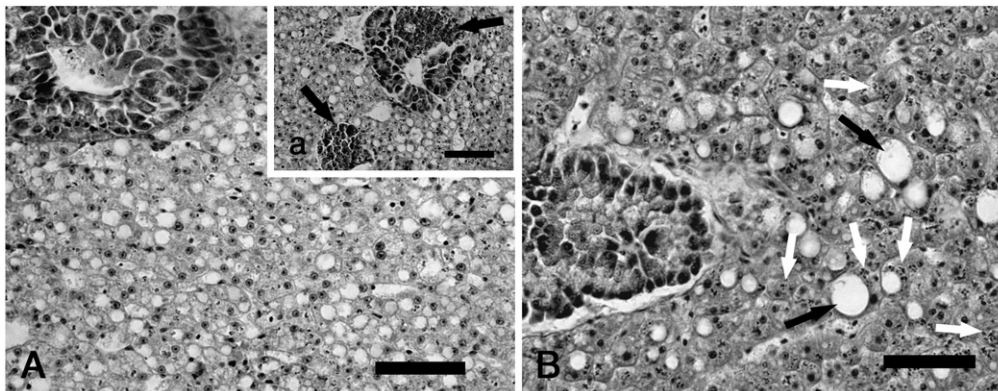


Fig. 6. Histopathological findings in liver of *C. monoculus* from group B (0.36 to $0.60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). A. Observe the increase in cytoplasmic vacuolization of hepatocytes. In detail (a) is observed the presence of melanomacrophage centers (arrows). B. Observe the vacuolization (black arrow) and granule deposits (white arrow) within cytoplasm. Scale bar = 50 μm . Haematoxylin and eosin stains.

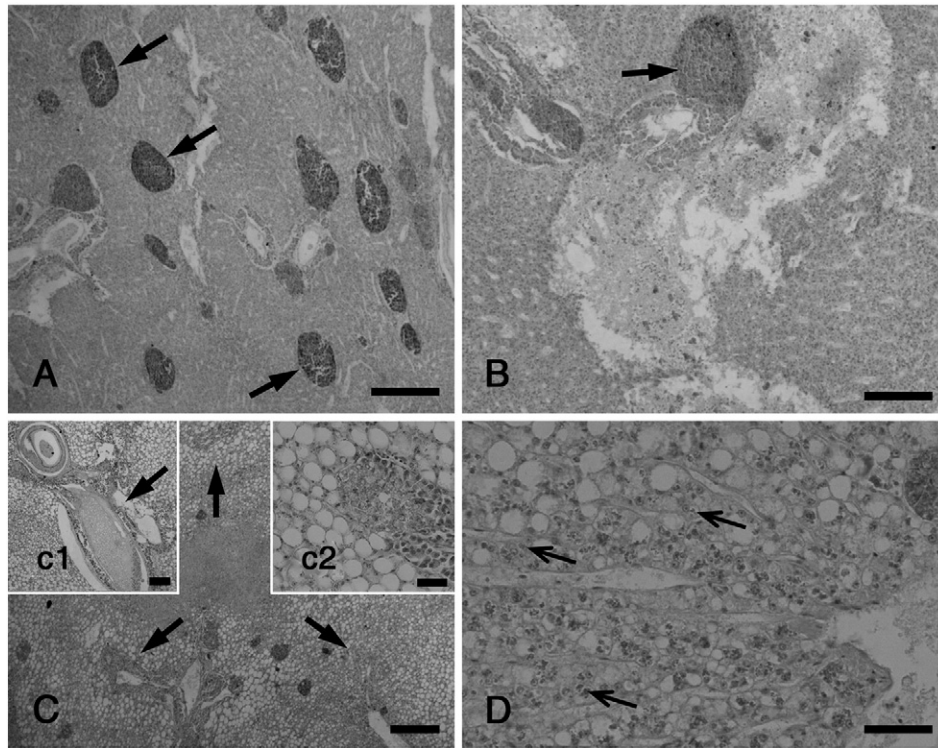


Fig. 7. Histopathological findings in liver of *C. monoculus* from group C (0.61 to $1.60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). A. Observe the high incidence of melanomacrophage centers (arrows). Scale bar = $100 \mu\text{m}$. B. Large extension of necrosis. Note the presence of melanomacrophage centers (arrow). Scale bar = $100 \mu\text{m}$. C. Individuals with high incidence of cytoplasmic vacuolization (arrows). A necrosis area is observed in c1 and c2 shows in detail the high cytoplasmic vacuolization of hepatocytes. Scale bar = $50 \mu\text{m}$. D. Note the high incidence of granule deposits in cytoplasm (arrows). Scale bar = $50 \mu\text{m}$. Haematoxylin and eosin stains.

Liver of fish has mercury levels higher than muscle in piscivorous fish *Hoplias malabaricus* from Samuel Reservoir (submitted data) and in *Anguilla anguilla* from Vacaré Lagoon, France (Oliveira Ribeiro et al., 2005), so that liver is an important target of chronic exposure to mercury. Indeed, histopathological investigation is interesting, because histological changes are often the result of the interaction of a large number of physiological processes, allowing the morphological differentiation between unexposed and compound-exposed animals and representing an important endpoint to establish damages in animals chronically exposed (Letcher et al., 2009). As described by Rabitto et al. (2005) the occurrence of free and melanomacrophage centers increasing with the levels of bioaccumulated mercury in muscle means that lesions like cell and tissue degeneration are present and may lead to tissue failure. On this way, the histological alterations described in both studied organs of *C. monoculus* chronically exposed to mercury showed morphological

evidences of the potential risk to the species, even to fish-eating populations in Amazon. According to Chevrier et al. (2009), Amazonian children aged 7–12 years from Brazil and French Guiana presented alterations on visual-spatial functions, and cognitive development may take longer and not be complete in the groups exposed to higher mercury levels, resulting in potentially serious long-term social consequences.

Mercury is known as a potent neurotoxic pollutant, and the cholinesterase activity disturbs evidenced with the bioaccumulation of mercury in muscle of *C. monoculus* corroborate this neurotoxicity even under chronic exposure. Then, additional efforts are deemed necessary to identify the main sources of mercury and DDT contamination in the Samuel Reservoir. This study would allow a more effective use of the resources, mitigation of the potential adverse impact of pollutants on the eco-environment and knowledge about the real risk to fish-eating Amazonian population.

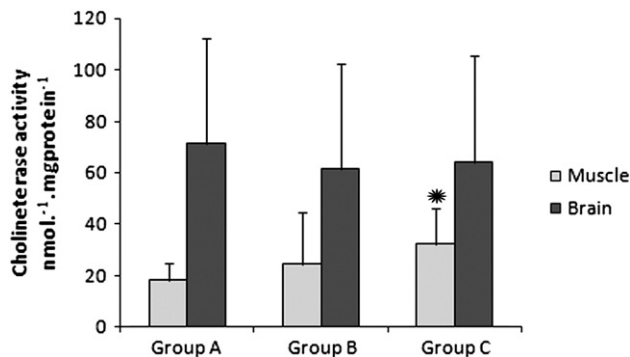


Fig. 8. Cholinesterase activity of the brain and muscle of *C. monoculus* from groups A (0.10 to $0.35 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), B (0.36 to $0.60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$) and C (0.61 to $1.60 \mu\text{g Hg g}^{-1}$), in nanomoles of choline. min^{-1} . mg of protein⁻¹. Mean (columns) and standard deviation (bars). * $p < 0.05$.

5. Conclusions

This study allowed an assessment of the environmental impacts of mercury and DDT in the Samuel hydroelectric reservoir (Rondonia State, Brazil), a tributary of the Madeira River and the risk for fish-eating human populations. Future research should investigate the processes responsible for the high mercury levels observed in the reservoir and the contribution of natural sources and biogeochemical processes. The species *C. monoculus* presents an ecological relevance for the local ecosystem and nutritional relevance for the riverine human population, since fish is the main source of protein for this population. On this way, the present study showed that fish, such as *C. monoculus*, is an important vehicle for human exposure to mercury and DDTs in Amazon, even in the Samuel Reservoir, which is not directly affected by the gold-mining activity, an important source of mercury in Amazon. Then, a continuous monitoring of the

levels of both pollutants in the biota is strongly recommended in order to control the risk of exposure to human population.

Acknowledgements

This work was partly supported by the National Research Council of Brazil–CNPq (projects 553269/2005–4 and 555543/2006–4). The authors thank for all logistic and technical support given by Roberto Keidi Miyai and the Regional Director Edgar Temporim Filho from ELETRONORTE Company of Rondônia.

References

- Akagi H, Malm O, Kinjo Y, Harada M, Branches F, Pfeiffer WC, et al. Methylmercury pollution in Amazon, Brazil. Proceedings of the international symposium on assessment of environmental pollution and health effects from methylmercury. Japan: World Health Organization; 1993.
- Akagi H, Malm O, Kinjo Y, Harada M, Branches FJP, Pfeiffer WC, et al. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. *Sci Total Environ* 1995;175:85–95.
- Amin-Zaki L, Majeed MA, Elhassani SB, Clarkson TW, Greenwood MR, Doherty RA. Prenatal methylmercury poisoning, clinical observations over five years. *Am J Dis Child* 1979;133:172–7.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. In: ANALYTICAL METHODS–Horacek J, Skládal, 1997. P. Anal. Chim. Acta.347:43.
- Bastos WR, Malm O, Pfeiffer WC, Cleary D. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon Brasil. *Ciênc Cult J Braz Assoc Adv Sci* 1998;50:255–60.
- Bastos WR, Gomes JPO, Oliveira RC, Almeida R, Nascimento EL, Bernardi JVE, et al. Mercury in the environmental and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. *Sci Total Environ* 2006;368:344–51.
- Bastos WR, Almeida R, Dórea JG, Barbosa AC. Annual flooding and fish-mercury bioaccumulation in the environmentally impacted Rio Madeira (Amazon). *Ecotoxicology* 2007;16:341–6.
- Belger L, Forsberg BR. Factors controlling Hg levels in two predatory fish species in the Negro river basin, Brazilian Amazon. *Sci Total Environ* 2006;367:451–9.
- Bernet D, Schimidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis* 1999;22:25–34.
- Binelli A, Proveni A. DDT install a problem in developed countries: the heavy pollution of Lake Maggiore. *Chemosphere* 2003;52:717–23.
- Bowles KC, Maher WA, Smith R. Bioaccumulation and biomagnification of mercury in Lake Murray, Papua New Guinea. *Can J Fish Sci* 2001;58(5):888–97.
- Burger J, Gochfeld M. Perceptions of the risks and benefits of fish consumption: individual choices to reduce risk and increase health benefits. *Environ Res* 2009;109:343–9.
- Chevrier C, Sullivan K, Cordier RS, Grandjean P. Qualitative assessment of visuospatial Amazonian children. *Neurotoxicology* 2009;30:37–46.
- Chung SWC, Kwong KP, Yau JCW. Dietary exposure to DDT of secondary students in Hong Kong. *Chemosphere* 2008;73:65–9.
- Cordier S, Gareil M, Mandereau L, Morcel H, Doineau P, Gosme-Seguret S. I Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environ Res* 2002;89:1–11.
- D'Amato C, Torres PM, Malm O. DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane): toxicity and environmental contamination – a review. *Quim Nova* 2002;25(6):995–1002.
- D'Amato C, Torres PM, Malm O. Determinated ΣDDT in commercial fishes samples from distinct Brazilian Amazon sites. *Oecol Bras* 2007;11:202–12.
- Dalvie MA, Myers JE, Thompson ML, Robins G, Omar S, Riebow J. Exploration of different methods for measuring DDT exposure among malaria vector workers in Limpopo Province South Africa. *Environ Res* 2004;96:20–7.
- Dórea JG, Barbosa AC. Anthropogenic impact of mercury accumulation in fish from the Rio Madeira and Rio Negro (Amazônia). *Biol Trace Elem Res* 2007;115:243–54.
- Dórea JG, Barbosa AC, Silva GS. Fish-mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. *Comp Biochem Physiol* 2006;142:275–83.
- Durrieu G, Maury-Brachet R, Boudou A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). *Ecotoxicol Environ Saf* 2005;60:315–23.
- Ellman GL, Courtney KO, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88–95.
- FAO–WHO. Codex maximum residue limits for pesticides. Rome: FAO; 1997.
- Filipak Neto F, Zanata SM, Silva de Assis HC, Nakao LS, Randi MAF, Oliveira-Ribeiro CA. Toxic effects of DDT and methylmercury in the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. *Toxicol In Vitro* 2008;22:1705–13.
- Foran JA, Good DH, Carpenter DO, Hamilton MC, Knuth BA, Schwager SJ. Quantitative analysis of the benefits and risks of consuming farmed and wild salmon. *J Nutr* 2005;135:2639–43.
- GB 2763. Maximum residue limits for pesticides in food; 2005.
- Gladyshev MI, Sushchik NN, Anishchenko OV, Makhutova ON, Kalachova GS, Gribovskaya IV. Benefit-risk ratio of food fish intake as the source of essential fatty acids vs. heavy metals: a case study of Siberian grayling from the Yenisei River. *Food Chem* 2009;115:545–50.
- Godoy JM, Padovani CR, Guimarães JRD, Pereira JCA, Vieira LM, Carvalho ZL. Evaluation of the situation of the River Taquari, pantanal, Brazil, through Pb-210 geochronology of floodplain lake sediments. *J Braz Chem Soc* 2002;13:71–7.
- Grotto D, Valentini J, Fillion M, Passos CJS, Garcia SC, Mergler Donna, et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Sci Total Environ* 2010;408:806–11.
- Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 1995;25:1–24.
- Horvat M, Nolde N, Fajon V, Jereb V, Logar M, Lojen S, et al. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted area in the province Guizhou, China. *Sci Total Environ* 2003;304:231–56.
- Jiang CB, Yeh CY, Lee HC, Chen MJ, Hung FY, Fang SS, et al. Mercury concentration in meconium and risk assessment of fish consumption among pregnant women in Taiwan. *Sci Total Environ* 2010;408:518–23.
- Kehrig HA, Malm O. Methylmercury in fish as a tool for understanding the Amazon mercury contamination. *Appl Organomet Chem* 1999;13:689–96.
- Kehrig HA, Howard BM, Malm O. Methylmercury in a predatory fish (*Cichla spp.*) inhabiting the Brazilian Amazon. *Environ Pollut* 2008;154:68–76.
- Kullander SO, Ferreira EJG. A review of the South American cichlid genus *Cichla* with descriptions of nine new species (Teleostei:Cichlidae). *Ichthyol Explor Freshw* 2006;17(4):289–398.
- Kumblad L, Olsson K, Koutny V, Berg H. Distribution of DDT residues in fish from the Songkhla Lake, Thailand. *Environ Pollut* 2001;112:193–200.
- Lacerda LD. Amazon mercury emissions. *Nature* 1995;374:20–1.
- Lacerda LD, Ribeiro MG, Souza M. The effects of land use change on mercury distribution in soils of Alta Floresta, southern Amazon. *Environ Pollut* 2004;129:247–55.
- Leaños-Castañeda O, Kraak VGD, Canul RR, Gold G. Endocrine disruption mechanism of o, p'-DDT in mature male tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;221:158–67.
- Lechler PJ, Miller JR, Lacerda DL, Vinson D, Bonzongo JC, Lyons WB, et al. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *Sci Total Environ* 2000;260:87–96.
- Letcher RJ, Bustnes JO, Dietz R, Jenssen Bjørn M, Jørgensen EH, Sonne Christian, et al. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Sci Total Environ* 2009;10:30–8 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv>.
- Malm O, Palermo EFA, Santos HSB, Rebelo MF, Kehrig HA, Oliveira RB, et al. Transport and cycling of mercury in Tucuruí reservoir, Amazon, Brazil: 20 years after fulfillment. *RMZ – Mater Geoenviron* 2004;51:1195–8.
- Mason RP, Laporte JM, Andres S. Factors controlling the bioaccumulation of mercury, methylmercury, arsenic, selenium and cadmium by freshwater invertebrates and fish. *Arch Environ Contam Toxicol* 2000;38(3):283–97.
- Meech JA, Veiga MM, Tromans D. Emission and stability of mercury in the Amazon. *Can Metall Q* 1997;36(4):231–9.
- Miranda AL, Roche H, Randi MAF, Menezes ML, Oliveira Ribeiro CA. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: histopathological, physiological, and immunological findings. *Environ Int* 2008;34:939–49.
- Nascimento EL. Concentração de mercúrio no plâncton e fatores ecológicos no Reservatório da U.H.E. – Samuel – Amazônia Ocidental (Rondônia / Brasil) – Dissertação – Mestrado em desenvolvimento Regional e Meio Ambiente - Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR; 2006.
- National Academy of Sciences & National academy of Engineering. Section III: Freshwater Aquatic Life and Wildlife, Water Quality Criteria. Ecology and Research Serve Environment. Washington, DC: National Academy of Sciences & National Academy of engineering; 1972. p. 62.
- Oliveira Ribeiro CA, Vollaire Y, Sanchez-Chardi A, Roche H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PHA and heavy metals in the Eel (*Anguilla Anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquat toxicol* 2005;74:53–69.
- R Development Core Team. R. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2008. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rabitto IS, Alves Costa JRM, Silva de Assis HC, Pelletier É, Akaishi FM, Anjos A, et al. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol Environ Saf* 2005;60:147–56.
- Ramesh CG. In: Gupta Ramesh C, editor. Veterinary toxicology basic and clinical principles; 2007. p. 442–8. DVM, MVSC, PHD, DABT, FACT.
- Reuther R. Mercury accumulation in sediment and fish from rivers affected by alluvial gold mining in the Brazilian Madeira river basin, Amazon. *Environ Monit Assess* 1994;32:239–58.
- Rice G, Swartout J, Mahaffey K, Schoeny R. Derivation of US EPA's oral reference dose (RfD) for methylmercury. *Drug Chem Toxicol* 2000;23:41–54.
- Roulet M, Lucotte M, Canuel R, Farella N, Courcelles M, Guimarães JRD. Increase in mercury contamination recorded in lacustrine sediments following deforestation in the central Amazon. *Chem Geol* 2000;165:243–66.
- Sanchez W, Piccini B, Maillot-Maréchal E, Porcher JM. Comparison of two reference systems for biomarker data analysis in a freshwater biomonitoring context. *Environ Int* 2010;36:377–82.
- Santos GM, Ferreira EJG, Jegu M. Catálogo dos Peixes do Rio Jamari, Rondônia. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, Manaus, Amazonas. Book; 1991. 123 pp.
- Schneider L, Belger L, Burgerc J, Vogta RC. Mercury bioaccumulation in four tissues of *Podocnemis erythrocephala* (Podocnemididae: Testudines) as a function of water parameters. *Sci Total Environ* 2009;407:1048–54.

- Silva de Assis, H.C., 1998. Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen. Thesis. Berlin Technical University, Germany. p.99.
- Silvers KM, Scott KM. Fish consumption and self-reported physical and mental health status. *Public Health Nutr* 2002;5:427–31.
- Swedish Food Regulations. Foreign substances in food. SLVFS:I. Stockholm: National Food Administration; 1983.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003;13: 57-149.
- Walker CH. Principles of ecotoxicology. London: Taylor and Francis; 1996.
- Wania F, Mackay D. Global fraction and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. *Ambio* 1993;22:10–8.
- WHO. Methylmercury. *Environ. Health Crit.* 101. International Program on Chemical Safety; 1990 (in Geneve).
- Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 2008;606(14):135–50.