

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 17/03/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ESTRATÉGIAS BIOANALÍTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO EM *ARAPAIMA GIGAS* E
SERRASALMUS RHOMBEUS DO RIO MADEIRA/BACIA AMAZÔNICA

JOÃO VITOR DE QUEIROZ

Tese apresentada como parte das exigências
para obtenção do Título de Doutor em
Zootecnia pelo Programa de Pós-graduação
em Zootecnia da FMVZ – UNESP Campus
de Botucatu

BOTUCATU/SP

MARÇO DE 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ESTRATÉGIAS BIOANALÍTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO EM *ARAPAIMA GIGAS* E
SERRASALMUS RHOMBEUS DO RIO MADEIRA/BACIA AMAZÔNICA

JOÃO VITOR DE QUEIROZ
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

BOTUCATU/SP

MARÇO DE 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO -
BOTUCATU (SP)

- Q3e Queiroz, João Vitor de, 1989-
Estratégias bioanalíticas para caracterização de biomarcadores de
exposição ao mercúrio em *Arapaima gigas* e *Serrasalmus rhombeus* do rio
Madeira/Bacia Amazônica / João Vitor de Queiroz. - Botucatu : [s.n.],
2017
viii, 89 f. : fots. color., ils., grafs. color.,
tabs.
- Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botu-
catu - 2017
Orientador: Pedro de Magalhães Padilha
Inclui bibliografia
1. Peixe. 2. Mercúrio. 3. Proteínas. 4. Proteômica. I. Padilha,
Pedro de Magalhães. II. Universidade Esta-dual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho" (Câmpus de Bo-tucatu). Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. III. Título.

AUXÍLIOS FINANCEIROS

Projeto regulamentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL e desenvolvido no âmbito do Programa P&D da Energia Sustentável do Brasil S.A.

P&D: 6631-0001/2012

Contrato Jirau 004/13



FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

Processos: 2010/51332-5 e 2013/21297-1



CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Processo: FCT 270/11



CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Processo: 472388/2011-8



FUNDIBIO – Fundação do Instituto de Biociências



PROPG – Pró-Reitoria de Pós-Graduação



Dedico este trabalho aos meus pais Francisco e Regina. Aos meus irmãos Francisco e Pedro. Companheiros inseparáveis em todos os momentos de minha vida. Vocês são os grandes responsáveis pelo meu sucesso, luta e dedicação. Vocês merecem todo o meu respeito, carinho, amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado forças, coragem e saúde para buscar e realizar meus sonhos. Aos meus pais, Francisco e Regina, por serem meus principais incentivadores, por me darem condições para que eu pudesse estudar e por me apoiarem em tudo. Aos meus irmãos Francisco e Pedro por estarem sempre comigo. Amo vocês! Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim. Vocês são meus alicerces verdadeiros, meus amigos e companheiros para qualquer hora e lugar. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado a lugar algum! Ao Bernardo Rios de Queiroz, que não sabe o quanto eu o amo e a importância que ele tem sobre mim e minhas conquistas. Aos meus professores que me incentivaram muito, me inspiraram, me fizeram acreditar mais em mim. Agradeço! A todos meus grandes amigos que conquistei durante minha vida. A companhia de vocês tornou meus dias melhores e mais bonitos! A Laís, minha companheira, meu amor. Ao meu orientador Pedro de Magalhães Padilha pela dedicação, paciência, bondade, amizade e respeito. Por ter confiado em mim e no meu potencial. Agradeço a oportunidade. Pessoa que aprendi a admirar muito e me espelhar. A meus colegas e amigos de laboratório: Cilene, Bruna, Camila, José e Vânia, pela companhia, ajuda e por fazerem dos meus dias um grande aprendizado. Obrigado! A Sindy, minha leal, amada e fiel escudeira. A UNESP, minha Universidade, minha casa que amo. Agradeço por ter me acolhido e por ter me dado recursos para o meu crescimento profissional. Espero um dia retribuir tudo o que esta Instituição me ajudou a conquistar.

Sumário

CAPÍTULO I	VIII
Considerações Iniciais	9
Histórico do Mercúrio.....	12
Formas do Mercúrio	16
Mercúrio Metálico	16
Mercúrio Inorgânico	17
Mercúrio Orgânico.....	17
Ciclo Hidrobiogeoquímico do Mercúrio	18
Emissão e Deposição de Mercúrio na Bacia do Rio Madeira	21
Métodos de Detecção de Mercúrio	23
Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite.....	24
Espectrometria de Massas.....	28
Espécies Estudadas	30
Família Arapaimatidae.....	30
Pirarucu.....	30
Família Serrasalmidae	31
Piranha Preta	32
Referências Bibliográficas.....	34
CAPÍTULO II	40
Abstract.....	42
1. Introduction.....	43
2. Material and methods.....	45
2.1. Reagents, standard solutions and samples	45
2.3. Apparatus.....	46
2.4. Preparation of the analytical curve	47
2.5. Analytical procedures	47
3. Results and discussion	48
3.1. Optimization of the graphite furnace heating program.....	48
3.2. Attainment of the analytical curve.....	50
3.3. Application of the proposed method.....	50
4. Conclusions.....	52
Acknowledgements.....	53
Fig. 1.	54

Pyrolysis and atomization temperature optimized for thermal stabilization of mercury in slurries of fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4.	54
Fig. 2.	54
Transient atomic absorption (AA) and background (BG) signals obtained for mercury atomization in slurries of fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4.	54
Table 1.	55
Graphite furnace heating program optimised for mercury determination in from slurries of tissue samples (muscle and liver), slurries of certified reference material (DORM-4 and DOLT-4) as also mercury aqueous standard solutions.	55
Table 2.	55
Results obtained in the determination of total mercury in muscle and liver tissue samples from Brazilian Amazon fish.	55
References.....	56
CAPÍTULO III.....	60
Resumo	61
Abstract.....	62
Introdução	63
Material e Métodos	64
Método de coleta das espécies	64
Obtenção dos pellets protéicos	65
Separações eletroforéticas	66
Determinação de mercúrio total.....	66
Caracterização das proteínas por ESI MS/MS.....	66
Resultados e discussão.....	67
Eletroforese bidimensional	67
Determinação de mercúrio total.....	68
Proteínas identificadas por ESI MS/MS	71
Conclusão	82
Referências	83
CAPÍTULO IV	88
Implicações	89

CAPÍTULO I

Considerações Iniciais

Na bacia amazônica e em seus rios vivem aproximadamente 3 mil espécies diferentes de peixes. Somente no rio Madeira, que nasce nos Andes bolivianos e percorre mais de três mil quilômetros até a foz do rio Amazonas, vivem cerca de mil espécies. Essa riqueza faz do Madeira o rio, entre os já estudados, com a maior biodiversidade de peixes do planeta. O rio apresenta uma vazão de mais de 40 milhões de litros de água por segundo no período chuvoso (Queiroz et al., 2013).

Um dos aspectos mais marcantes da bacia amazônica é a elevada riqueza da ictiofauna, que inclui cerca de 3 mil espécies de variados tamanhos, hábitos, formas e cores. Quanto ao tamanho, há desde espécies pequenas, como as piabas (a maioria pertencente a família *Characidae*), até os maiores, como o pirarucu e a piraíba ou filhote. A maioria dos peixes siluriformes (peixes caracterizados pelo corpo sem escamas e revestido por pele nua ou placas ósseas), bagre ou peixe-liso é formado por espécies que empreendem migrações longas por meio do canal principal do sistema Solimões-Amazonas. Os principais representantes desse grupo são o surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*), caparari (*P. tigrinum*), dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), piramutaba (*B. vaillantii*) e piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) (Queiroz et al., 2013).

A bacia do rio Madeira é a única que ocupa uma extensão duas vezes superior a qualquer outra bacia na região amazônica, cobrindo uma área de 1.380.000 km², distribuída em territórios do Brasil, Bolívia e Peru. A complexidade dessa bacia congrega corpos d'água de origens distintas: os rios Mamoré e Beni, que drenam os Andes bolivianos, e o rio Madre de Dios, que drena os Andes peruanos e deságua no rio Beni; o rio Guaporé, cujos formadores se localizam nas terras antigas do escudo central brasileiro e, a parte baixa do rio Madeira, que percorre as terras rebaixadas da bacia sedimentar, onde se concentram as várzeas do rio Madeira (Cáuper, 2006).

O período de chuvas inicia-se normalmente no mês de outubro, intensificando-se nos meses de novembro e dezembro. O mesmo se estende até o mês de maio, podendo se prolongar eventualmente até o mês de junho. O período mais chuvoso concentra-se entre os meses de janeiro a março. Este período é

conhecido como inverno amazônico, caracterizado por ser quente e chuvoso (Parente, 1996). A vazante do rio inicia-se entre o final do mês de maio ou início de junho e o período de baixa vazão estende-se até o mês de novembro. A amplitude média da flutuação do nível do rio é de 10,8 a 12,4 m, mas entre secas e cheias extremas pode oscilar entre 15,4 e 21,8 m, com valores de vazão entre 2.322 e 47.236 m³ s⁻¹ calculadas a partir do histórico das cotas medidas no Porto do Cai n'Água, em Porto Velho, entre 1967 e 2005 (Cardoso et al., 2008).

A formação de grandes represas autentica papel relevante no desenvolvimento econômico e social de um país. Nos dias atuais, cerca de metade dos rios de todo o mundo apresentam ao menos uma grande represa e aproximadamente um terço dos países dependem de usinas hidrelétricas para gerar mais da metade da sua energia. Estima-se que existam cerca de 45.000 grandes represas em todo o mundo, sendo que as maiores são a do Amazonas, do Congo e do Mekong. O Brasil já apresenta mais de 500 hidrelétricas espalhadas por todo o país, o que pode parecer muito em números, mas que na verdade é equivalente a apenas 24% de todo o potencial hidroenergético do país. Todavia, mudanças bruscas no ecossistema podem influenciar na disseminação de doenças não endêmicas até o momento, e causar efeitos adversos na saúde das comunidades locais devido a fragmentação social causada pela implantação das grandes represas (Bastos, 2009).

A implantação de complexos hidrelétricos na bacia do rio Madeira, tem motivado diversos debates científicos sobre a biodisponibilidade e remobilização de espécies de mercúrio nos reservatórios amazônicos. Estudos realizados em diversos reservatórios do Brasil, concluíram que os compostos de mercúrio associados ao material particulado em suspensão, plâncton e/ou sedimentos, apresentam-se preferivelmente na sua forma inorgânica. Essa forma ocorre principalmente no início dos reservatórios, ou seja, a montante, enquanto que a forma orgânica vai aumentando sua porcentagem de forma crescente, atingindo valores maiores próximos as barragens nas áreas mais profundas (Bastos, 2004).

Devido ao fato de que a poluição química e biológica do rio Madeira se tornou um dos principais problemas socioambientais daquela região, o rio acabou se

tornando um laboratório natural de pesquisas, cujo estudo poderá se tornar referência para a Amazônia brasileira.

Por essa região ter sido vítima de exploração da garimpagem do ouro na década de 80 até meados da década de 90, a contaminação pelo mercúrio que marcou a região volta a ser discutida devido aos passivos ambientais deixados resultantes da atividade de garimpagem e principalmente pelo potencial de contaminação que estes passivos representam para a sociedade. Com a construção e implantação do Complexo Hidrelétrico Jirau na bacia do rio Madeira, serão feitas alterações ambientais, o que poderá alterar a dinâmica do mercúrio nessa região ambiental (Queiroz, 2013).

Devido a garimpagem do ouro na Amazônia, foram atribuídos os altos teores de mercúrio encontrados em peixes, sedimentos e solos; no entanto; estudos recentes mostraram que foram encontradas altas concentrações de mercúrio em compartimentos bióticos e abióticos sem fontes antrópicas, ou seja, em regiões que não foram exploradas pelo garimpo do ouro ou qualquer outro tipo de exploração feita pelo homem. Portanto, podemos sugerir que independente da fonte de contaminação, a elucidação dos mecanismos de toxicidade do mercúrio é de fundamental importância para a região amazônica (Bastos, 2009). Sendo assim, o desenvolvimento de biomarcadores de proteínas relacionadas ao mercúrio, poderão indicar com antecedência os possíveis riscos de contaminação do pescado e a exposição humana, devido as mudanças ocorridas na qualidade da água nos reservatórios, podendo evitar que a população ribeirinha seja influenciada direta ou indiretamente pelos empreendimentos hidrelétricos na região amazônica.

“A metaloproteômica – área científica proposta recentemente – integra estudos analíticos e bioquímicos, contemplando o fracionamento e a caracterização de proteínas associadas a metais. Esta nova área do conhecimento científico tem contribuído para o esclarecimento dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos” (Dolbec, 2001). A identificação de biomarcadores de toxicidade do mercúrio utilizando a metaloproteômica está associada as proteínas transportadoras desse elemento que possam apresentar aumento ou diminuição de

expressão frente as alterações das características limnológicas e disponibilidades das espécies mercuriais no ambiente. Dessa forma, informações importantes poderão ser obtidas em relação a elucidação dos mecanismos de absorção desse metal tóxico pela biota aquática e pelos seres humanos. A construção e implementação do Aproveitamento Hidrelétrico Jirau (AHE JIRAU) na bacia do rio Madeira poderá alterar a dinâmica do mercúrio nesse compartimento ambiental devido a alteração ambiental do local onde o empreendimento foi instalado (Cáuper, 2006).

Trabalhos relataram que na última década, as concentrações de mercúrio total nas águas superficiais dos rios amazônicos (Tapajós, Amazonas, Negro e Madeira) variaram entre 02 e 12 ng/L e o teor de mercúrio total no sedimento nestes mesmos rios permaneceu entre 100 e 400 µg/kg. Estas concentrações de mercúrio estão dentro dos níveis considerados naturais dos rios amazônicos. No entanto, possíveis transformações e processos de remobilização de espécies mercuriais até então indisponíveis, podem alterar a forma química dessas espécies, tornando-as lábeis para o meio aquático (Akagi et al., 1995).

Conclusão

Sabe-se que o mercúrio, seja orgânico ou inorgânico, apresenta toxicidade para a fauna, flora e seres humanos. No entanto, ainda falta muito para elucidar todas as rotas metabólicas desse metal potencialmente tóxico no organismo, bem como sua interação com enzimas, tecidos e/ou proteínas e como o mesmo tem a característica de bioacumular nos seres vivos. Por esses motivos, a descoberta de um biomarcador facilitará muito o monitoramento desse elemento, não só em peixes, mas também em espécies terrestres e no próprio ser humano. Algumas proteínas como a parvalbumina (encontrada nesse estudo) e a ubiquitina, por terem sido encontradas em outros estudos realizados (Braga et al., 2015; Vieira et al., 2015), apresentam características para serem utilizadas como possíveis biomarcadores, não só quantidade de mercúrio ligado a elas, mas também pela frequência com que foram encontradas. As proteínas e enzimas encontradas e caracterizadas nesse estudo, também devem ser consideradas, já que foi quantificado mercúrio ligado a elas e, além disso, muitas apresentam grupos cisteína, grupo carboxílico, amino terminais e ligação com metais divalentes, como por exemplo, o zinco e o cálcio. Portanto, é indispensável a continuidade desse trabalho metaloproteômico, para validar essas proteínas como biomarcadores e monitorar o mercúrio nas regiões onde esse metal está presente.

Referências

- BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ZARA, L. F.; ROCHA, J. C.; SANTOS A. Programa de Monitoramento Hidro biogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. Brasil, Tectebel Energia, 2009.
- BASU, P.; MORRIS, P. E.; HAAR, J. L.; WANI, M. A.; LINGREL, J. B.; GAENSLER, K. M.; LLOYD, J. A.. KLF2 is essential for primitive erythropoiesis and regulates the human and murine embryonic beta-like globin genes in vivo. **Blood**, United States, v. 106, n. 7, p. 2566–2571, 2005. DOI:10.1182/blood-2005-02-0674.
- BERBEL, P.; MARCO, P.; CEREZO, J. R.; FELIPE, J. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the neocortex of hypothyroid adult rats. **Neuroscience Letters**, United Kingdom, v. 204, p. 65-68, 1996.
- BRAGA, C. P.; BITTARELLO, A.C.; PADILHA, C.C.; LEITE, A.L.; MORAES, P.M.; BUZALAF, M.A.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. **Talanta**, Brazil, v. 132, p. 239–244, 2015.
- CAMPBELL, L. M.; OSANO, O.; HECKY, R. E.; DIXON, D. G. Mercury in fish from three rift valley lakes (Turkana, Naivasha and Baringo), Kenya, East Africa. **Environmental Pollution**, London, v. 125, n. 2, p. 281-286, 2003.
- CHEVALIER, C.; QUERREC, F. L.; CHEVALIER, P. R. C.; QUERREC, F. L.; RAYMON, P. Sugar levels regulate encoding protein S28 the expression of ribosomal protein genes and ubiquitin-fused protein S27a in maize primary root tips. **Plant Science**, United States, v. 117, p. 95-105, 1996.
- D. JOSEPH-MCCARTHY, D.; LOLIS, E. A.; KOMIVES, G. A. PETSKEO. Crystal structure of the K12M/G15: a triosephosphate isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site. **Biochemistry**, v. 33, p. 2815-2823, 1994.
- DECKER, R. H.; KANG, H. H.; LEACH, F. R.; HENDERSON, L. M. A purificação e propriedades da oxidase de 3-hidroxiantranico. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 236, p. 3076-82, 1961.
- FAIBANE, A. M.; WILLIAMS, D. R. **The principle of bio-inorganic chemistry**. London: The Chemical Society, 1981. (Chemical Society Monographs for Teachers, 3). 31
- GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, Brazil, n. 69, p. 1-15, 2006.
- GOLDMAN, A. D.; BEATTY, J. T.; LANDWEBER, L. F. The TIM Barrel Architecture Facilitated the Early Evolution of Protein-Mediated Metabolism.

Journal of Molecular Evolucion, United States, v. 82, n. 1, p. 17-26, 2016. DOI:10.1007/s00239-015-9722-8.

GUNNING, P.; PONTE, P.; OKAYAMA, H.; ENGEL, J.; BLAU, H.; KEDES, L. Isolation and characterization of full-length cDNA clones for human α -, β -, and γ -actin mRNAs: skeletal but not cytoplasmic actins have an amino-terminal cysteine that is subsequently removed. **Molecular and Cellular Biology**, United Kingdom, v. 3, p. 787-795, 1983.

HUSSAIN, S.; RODGERS, D. A.; DUHART, H. M.; ALI, S.F. Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. **Journal of Environmental Science Health**, v. 32, n. 3, p. 395-409, 1997.

IKIGURA, J. D.; AKAGI, H. Methylmercury production and distribution in aquatic systems. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 234, p. 109-118, 1999.

JONSSON, H.; SCHIEDEK, D.; GOKSOYR, A. Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. **Aquatic Toxicology**, Canada, v. 78, p. 42-48, 2006.

JUNG, H. S.; PARK, N-G. Perovskite solar cells: From materials to devices. **Small**, Netherlands, v. 11, p. 10-25, 2015.

KIM, A. Y.; LIM, B.; CHOI, J.; KIM, J. A TFG-TEC oncoproteína induz a activação transcricional do gene da enolase β -humano através de modificação da cromatina da região promotora. **Molecular Carcinogenesis**, Cidade, v. 23, p. 302, 2015.

KREMNEVA, E.; MAKKONEN, M. H.; SKWAREK-MARUSZEWSKA, A.; GATEVA, G.; MICHELOT, A.; DOMINGUEZ, R.; LAPPALAINEN, P. Cofilin-2 controls actin filament length in muscle sarcomeres. **Developmental Cell**, Cidade, v. 31, p. 215-226, 2014. Escrever o nome da Revista por extenso

LADENSTEIN, O.; WENDEL, R. A. A estrutura refinada da glutationa peroxidase selenoenzyme com resolução de 0,2 nm". **European Journal of Biochemistry**, Germany, v. 133, n. 1, p. 51-69, 1983.

MCCALL, K. A.; HUANG, C.; FIERKE, C. A. Function and Mechanism of zinc metalloenzymes. **Journal of Nutrition**, United States, v. 130, p. 5147S-1446S, 2000.

MEILI, M. The coupling of Hg and organic matter in the biogeochemical cycle – a mechanistic model for the boreal forest zone. **Water, Air and Soil Pollution**, China, v. 56, p. 333-347, 1991.

MORAES, P. M.; SANTOS, F. A.; PADILHA, C. C. F.; VIEIRA, J. C. S.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. **Biological Trace Element Research**, Brazil, v. 150, n. 1/3, p. 195-199, 2012.

Moraes, P. M.; SANTOS, F. A.; CAVECCI, B.; PADILHA, C. C. F.; VIEIRA, J. C. S.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, P. M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. **Food Chemistry**, Brazil, v. 141, n. 3, p. 2614-2617, 2013.

OGAWA, H., GOMI, T., TAKUSAGAWA, F., FUJIOKA, M. Structure, function and physiological role of glycine N-methyltransferase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, India, v. 30, n. 1, p. 13-26, 1998. DOI: 10.1016/S1357-2725(97)00105-2.

OLIVERO, J.; SOLANO, B. Mercury in environmental samples from a waterbody contaminated by gold mining in Colombia, South America. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 217, n. 1-2, p. 83-89, 1998.

PAHL, P.; BERGER, R.; HART, I.; CHAE, H. Z.; RHEE, S. G.; PATTERSON, D. Localization of TDPX1, a human homologue of the yeast thioredoxin-dependent peroxide reductase gene (TPX), to chromosome 13q12. **Genomics**, Germany, v. 26, n. 3, p. 602–606, 1995. DOI: 10.1016/0888-7543(95)80183-M.

PALMER, J. L.; ABELES, R. H. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. **J. Biol. Chem.**, Cidade, v. 254, p. 1217–1226, 1979.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical Society**, United Kingdom, v. 85, p. 3533-3539, 1963.

PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; SALOMONS, W.; MALM, O. Environment fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. **Environmental Reviews**, Brazil, v. 1, p. 26-37, 1993.

PU, L.; IGBAVBOA, U.; MADEIRA, W. G.; ROTH, J. B.; KIER, A. B.; SPENER, F.; SCHROEDER, F. A expressão de proteínas de ligação de ácidos graxos é alterado de cérebro envelhecido do rato. **Molecular and Cellular Biochemistry**, United States, v. 198, n. ½, p. 69-78, 1999. DOI: 10.1023/A:1006946027619.

ROLAND, M. **Annotations to Finnegans Wake**. United States, 2016.

ROMANOWSKI, S. M. M.; MANGRICH, A. S.; NEVES, A. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não-simétricos N,O-doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**, Brazil, v. 24, p. 592-598, 2001.

TOMANEK, L. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. **Physiological and Biochemical Zoology**, United States, v. 81, p. 709–717, 2008.

TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. **Journal of Molecular Biology**, Turkey, v. 283, p. 489-506, 1998.

UniProt, 2016. Universal Protein Resource (UniProt). 2016. Available at: <http://www.uniprot.org/> [Accessed July 17, 2016].

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; MONTEIRO, P. J. C. Aspectos biológicos de peixes amazônicos IV: Padrões eletroforéticos de hemoglobinas de 22 espécies coletadas na ilha da Marchantaria (Manaus - AM). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 16, p. 125-134, 1986.

VIEIRA, J. C. S. CAVECCI, B.; QUEIROZ, J. V.; BRAGA, C. P.; PADILHA, C. C.; LEITE, A. L.; FIGUEIREDO, W. S.; BUZALAF, M. A.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Brazil, v. 69, n. 4, p. 422-430, 2015.

WALLIMANN, T.; HEMMER, W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Canada, v. 133/135, p. 193–220, 1994. DOI:10.1007/BF01267955.

WALLIMANN, T.; WYSS, M.; BRDICZKA D.; NICOLAY, K., EPPENBERGER, H. M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. **The Biochemical Journal**, United Kingdom, v. 281, n. 1, p. 21-40, 1992. DOI: 10.1042/bj2810021.

WASKO, M. M., FARAJ, S. Why should I share? Examining social capital and knowledge contribution in electronic networks of practice. **MIS Quarterly**, Germany, v. 29, n. 1, p. 35-57, 2005.

ZGIBY, S. M., THOMSON, G. J.; QAMAR, S.; BERRY A. Exploring substrate binding and discrimination in fructose1, 6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases. **Eur. J. Biochem**, Netherlands, v. 267, n. 6, p. 1858–1868, 2000. DOI:10.1046/j.1432-1327.2000.01191.

ZONG, N. C.; LI, H.; LAM, M. P.; JIMENEZ, R. C.; KIM, C. S.; DENG, N.; KIM, A. K.; CHOI, J. H.; ZELAYA, I.; LIEM, D.; MEYER, D.; ODEBERG, J.; FANG, C.; LU, H. J.; XU, T.; WEISS, J.; DUAN, H.; UHLEN, M.; YATES, J. R.;

APWEILER, R.; GE, J.; HERMJAKOB, H.; PING, P. A integração da biologia proteoma cardíaca e medicina por uma base de conhecimento especializado. **Circulation Research**, Japan, v. 113, n. 9, p. 1043-1053, 2013.