

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIENCIAS, LETRAS E CIENCIAS
EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SP.

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

LEIDE DAIANA DE CASTRO

Bióloga

VARIAÇÕES BIOQUÍMICAS EM *Pterygoplichthys anisitsi* E
***Oreochromis niloticus* (Pisces: Teleostei)**
APÓS EXPOSIÇÃO A CLORETO DE MERCÚRIO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociencias,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista para obtenção do título de Mestre em Biologia
Animal.

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO ALVES DE ALMEIDA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ

Março – 2009

Castro, Leide Daiana de.

Variações bioquímicas em *Pterygoplichthys anisitsi* e *Oreochromis niloticus* (Pisces: Teleostei) após exposição a cloreto de mercúrio / Leide Daiana de Castro. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

70 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida

Co-orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Peixe - Efeito da poluição da água. 2. Água - Poluição. 3. Contaminação ambiental. 4. Poluição ambiental. 5. Cascudo (Peixe) 6. Tilápia (Peixe) 7. Cloreto de mercúrio (Metal) I. Almeida, Eduardo Alves de. II. Bonilla-Rodriguez, Gustavo Orlando. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU -574.2

DATA DA DEFESA: 30/03/09

Banca Examinadora

TITULARES:

PROF. DR. EDUARDO ALVES DE ALMEIDA (ORIENTADOR)
UNESP/SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

PROF. DR. ALTAIR BENEDITO MOREIRA
UNESP/SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

PROF. DR. HAMILTON CABRAL
USP/RIBEIRÃO PRETO – SP

SUPLENTES:

PROF^a. DR^a. LIDIA MARIA DE ALMEIDA PLICAS
UNESP/SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

PROF^a. DR^a. PATRICIA PERES POLIZELLI
UNIRP/SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

DEDICATÓRIA

A minha mãe e meu irmão por tudo que fizeram por mim.

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus que sempre me iluminou nas horas em que mais precisei.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP de São José do Rio Preto, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, ao Departamento de Química e Ciências Ambientais e ao Biotério.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, pela paciência e pela disposição de sempre estar me ajudando.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, por ter me aceitado inicialmente como estagiária em seu laboratório, local onde tudo começou.

À prof^a Dr^a Cláudia Regina Bonini Domingos pela concessão do laboratório de Hemoglobinopatias.

Ao meu cunhado Dawit, pela ajuda na realização das análises estatísticas dos meus resultados.

Ao Carlos do Biotério, pela grande ajuda que me ofereceu durante o meu trabalho.

Ao CAUNESP de Jaboticabal pela doação dos peixes cascudos e a empresa Tilápias do Brasil, por nos ceder as tilápias.

À minha família, que sempre me ensinaram lições de dignidade, honestidade e perseverança.

Ao meu namorado Denys, que sempre esteve ao meu lado me dando todo o apoio e amor, fundamentais para a conclusão desse trabalho.

As amigas e colegas de laboratório Aline, Lilian e Camila.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. A poluição das águas e a bioacumulação.....	12
1.2. O fenômeno da biomagnificação e o destino dos metais pesados.....	13
1.3. Fontes emissoras de mercúrio e sua transformação no meio ambiente.....	14
1.4. Mecanismo de toxicidade.....	15
1.5. Os organismos bioindicadores e biomarcadores bioquímicos.....	17
1.6. <i>Pterygoplichthys anisitsi</i> – Generalidades.....	20
1.7. <i>Oreochromis niloticus</i> – Generalidades.....	21
1.8. Consumo de peixes contaminados por mercúrio.....	22
1.9. Efeitos da intoxicação por mercúrio em humanos.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODO.....	28
3.1. Coleta e manutenção dos animais.....	28
3.1.1. Procedimento para exposição dos resíduos.....	28
3.1.2. Disposição dos resíduos.....	31
3.2. Coleta de sangue.....	31
3.3. Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	31
3.4. Atividade enzimática – esterases (AChE e CbE).....	33
3.5. Análises das enzimas Catalase (CAT) e Glutathione S Transferase (GST).....	33
3.6. Análise da Glutathione Peroxidase (GPx).....	34
3.7. Análise da Peroxidação Lipídica (PL).....	34
3.8. Quantificação de proteínas.....	35
3.9. Análises estatísticas dos resultados.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Catalase (CAT).....	35
4.2. Glutathione Peroxidase (GPx).....	37
4.3. Acetilcolinesterase (AChE).....	39
4.4. Carboxilesterase (CbE).....	41
4.5. Inibição <i>in vitro</i> (AChE e CbE).....	43
4.6. Peroxidação Lipídica (PL).....	46
4.7. Glutathione S Transferase (GST).....	49
4.8. Parâmetros Hematológicos - <i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	52
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1 – Atividade da catalase em cascudos <i>P. anisitsi</i>	36
Figura 2 – Atividade da enzima catalase em <i>O. niloticus</i>	36
Figura 3 – Atividade da GPx em fígado de cascudos <i>P.anisitsi</i> expostos a cloreto de mercúrio.....	38
Figura 4 – Atividade da GPx em fígado de tilápias <i>O. niloticus</i>	38
Figura 5 – Atividade da AChE em cascudos.....	39
Figura 6 – Atividade da AChE no fígado de tilápias <i>O. niloticus</i>	40
Figura 7 – Atividade da CbE em cascudos <i>P. anisitsi</i>	42
Figura 8 – Atividade da enzima CbE em <i>O. niloticus</i>	42
Figura 9 – Atividade da AChE <i>in vitro</i> em cascudos.....	44
Figura 10 – O gráfico representa a atividade da CbE <i>in vitro</i> em cascudos.....	44
Figura 11 – Atividade da AChE <i>in vitro</i> em tilápias.....	45
Figura 12 – Atividade da enzima CbE <i>in vitro</i> em tilápias.....	45
Figura 13 – Níveis de peroxidação lipídica em cascudos.....	47
Figura 14 – Níveis de peroxidação lipídica em fígado de tilápias.....	48
Figura 15 – Atividade da enzima GST no fígado de cascudos.....	50
Figura 16 – Atividade da GST em <i>O. Niloticus</i>	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Limites ambientais para a exposição ao mercúrio.....	23
Tabela 2. Locais contaminados por mercúrio.....	24
Tabela 3. Dados hematológicos dos cascudos usados no experimento de exposição a mercúrio.....	53

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1 – Vista lateral de <i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	30
Foto 2 – Vista lateral de <i>Oreochromis niloticus</i>	30
Foto 3 – Aspectos do fígado de <i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	30
Foto 4 – Aspectos do fígado de <i>Oreochromis niloticus</i>	30

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AChE = acetilcolinesterase
CAT = catalase
CbE = carboxilesterase
CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média
Cd = cádmio
Cr = cromo
CH₃Hg⁺ = metilmercúrio
(CH₃)₂Hg = dimetilmercúrio
-COOH = grupo carboxila
CONH₂ = amida
CDNB = 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
EROS = espécies reativas de oxigênio
EDTA = ácido etileno-triaminotetraacético
GPx = glutationa peroxidase
GST = glutationa S-transferase
GSSG = glutationa oxidada
GR = glutationa redutase
GSH = glutationa reduzida
GSH = glutationa
HCl = ácido clorídrico
Hg = mercúrio
HgCl₂ = cloreto de mercúrio
Hg⁰ = vapor de mercúrio
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
HO. = radical hidroxila
MDA = peroxidação malondialdeído
MAO-B = monoamina oxidase
NH₂ = amina
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaOH = hidróxido de sódio
O₂^{•-} = radical superóxido
PO₄ = fosfato
PL = peroxidação lipídica
-SH = grupo tiol ou sulfidríla
SDS = dodecil sulfato de sódio
TBA = ácido tiobarbitúrico
T2C = tempo dois controle
T10C = tempo dez controle

T2T= tempo dois teste
T10T=tempo dez teste
VCM = volume corpuscular médio
Zn = zinco

RESUMO

Parâmetros enzimáticos (CAT, GPx, GST, AChE e CbE), níveis de peroxidação lipídica, teste de inibição *in vitro* da AChE e CbE foram analisados no fígado de *Pterygoplichtys anisitsi* e *Oreochromis niloticus* expostos a 100 µg/L de cloreto de mercúrio por dois e dez dias. Variáveis hematológicas (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM) em *P. anisitsi* foram avaliados adicionalmente. A atividade da AChE em *P. anisitsi* e *O. niloticus* não apresentou diferenças significativas, mas *in vitro* esta enzima apresentou um decréscimo em altas concentrações testadas (0,01 e 0,1 mM). O HgCl₂ ocasionou um decréscimo da CbE em peixes expostos por dois dias (P<0,05). Com relação aos parâmetros hematológicos, ocorreu uma diminuição nos índices de eritrócitos em cascudos após dois e dez dias. Em *P. anisitsi* foi observado um decréscimo na atividade enzimática da GST após dez dias de tratamento, enquanto que, em *O. niloticus* observou-se um aumento na GST após dez dias de exposição. Os níveis de peroxidação lipídica também aumentaram em tilápias expostas por dez dias. O presente estudo teve a finalidade de nos fornecer informações sobre a aplicabilidade dos métodos enzimáticos e variáveis hematológicas para fins de biomonitoramento de metais tóxicos, em mananciais, utilizando organismos bioindicadores.

Palavras-chave: poluição da água, contaminação ambiental, *Pterygoplichtys anisitsi*, *Oreochromis niloticus*, mercúrio.

ABSTRACT

Enzymatic activities (CAT, GST, GPx AChE and CbE), lipid peroxidation levels, and *in vitro* inhibition tests were analyzed in the liver of the *Pterygoplichtys anisitsi* and *Oreochromis niloticus* exposed to 100 µg/L of mercury chloride (HgCl₂) for two and ten days. Haematological variables (erythrocyte, hemoglobin, hematocrit, MCV and MCHC) were evaluated additionally in *P. anisitsi*. AChE activity was not affected in *P. anisitsi* and *O. niloticus* exposed to mercury chloride but a decreased at the highest concentrations tested (0,01 and 0,1 mM) was found *in vitro*. CbE activity was decreased in fishes exposed to mercury for two days (P<0,05). With respect to the haematological parameters, decrease in the erythrocyte was observed after two days and ten days. In *P. anisitsi* GST was decreased after ten days exposure, while this enzyme was higher in *O. niloticus* exposed to HgCl₂ for the same period; lipid peroxidation levels was also increased after ten exposure days in *O. niloticus*, indicating the involvement of oxidative stress in HgCl₂ toxicity. The present study aimed to supply data about potential use of the enzymatic methods and haematological variables as biomarkers of the presence of mercury contamination in biomonitoring studies.

Key words: pollution of water, environmental contamination, *Pterygoplichtys anisitsi*, *Oreochromis niloticus*, mercury.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A poluição das águas e a bioacumulação

O modelo de desenvolvimento estabelecido desde a Revolução Industrial, no final do século XIX, baseado no lucro imediato sem o devido planejamento das ações humanas, é o principal fator de agressões ambientais. A crescente demanda e diversificação no uso dos recursos hídricos, gerados principalmente pela intensificação industrial, contribuíram consideravelmente para o aumento da poluição dos mananciais em decorrência da negligência em relação ao tratamento das águas industriais antes de lançá-las nos corpos d' água (POLUIÇÃO DAS ÁGUAS, 2006). Como os sistemas aquáticos são os principais receptores finais da emissão de lixos industriais e urbanos, o objetivo fundamental da ecotoxicologia consiste na avaliação de riscos para organismos aquáticos e populações humanas, por meio do uso de bioindicadores para a investigação dos efeitos e mecanismos tóxicos de agentes contaminantes (RIBEIRO, *et al.*, 2006).

O constante despejo de poluentes nos afluentes dos mananciais possibilita a formação de um processo denominado bioacumulação, que é o fenômeno no qual os organismos vivos retêm em seus sistemas biológicos determinadas substâncias tóxicas, sem conseguir eliminá-las na mesma velocidade da ingestão e incorporação (MAGOSSO & BONACELLA, 2003).

O presente trabalho direciona-se para a problemática dos efeitos do descarte de resíduos de metais tóxicos sobre o ecossistema, particularmente, o lançamento de mercúrio em águas naturais. É de extrema urgência que nos conscientizemos dos mecanismos que provocam a degradação ambiental, para então, implantarmos um sistema de monitoramento confiável e precoce, no intuito de frear os impactos biológicos desencadeados por ações antropogênicas, mantendo dessa forma, as emissões dentro dos padrões permitidos, ou até sugerir uma revisão desses padrões.

1.2 O fenômeno da biomagnificação e o destino dos metais pesados

De acordo com Baird (2002), algumas substâncias possuem o efeito da biomagnificação, ou seja, suas concentrações aumentam progressivamente no decorrer da cadeia alimentar. Um exemplo de metal tóxico com alta capacidade de provocar esse processo é o mercúrio. Ainda segundo Baird (2002), em ostras e mexilhões, o nível de mercúrio e cádmio encontrados em seus organismos pode apresentar taxas cem vezes superiores às águas nas quais habitam. Em outro estudo que mostra o processo de biomagnificação, avaliando a presença de mercúrio em várias espécies de peixes com procedência de ambientes contaminados, observou-se que níveis do metal em peixes vegetarianos eram de 6,64 µg/L; em peixes que se alimentavam de invertebrados, esses níveis subiam para 12,4 µg/L; peixes onívoros apresentavam valores de 26,6 µg/L e por fim, peixes piscívoros 40,2 µg/L (BOENING, 2000; OLIVERO *et al.*, 1997; WHO, 1989). No Brasil, a Portaria 685, de 1998, da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece limites máximos de contaminantes químicos em alimentos, registrando para o mercúrio os valores de 0,5 mg/kg (0,5 µg/L) para peixes e produtos da pesca e 1,0 mg/kg (1 µg/L) para peixes predadores.

Metais tóxicos como Hg, Cd, Zn e Cr chegam aos sistemas aquáticos como consequência das ações antropogênicas, como atividades industriais e a agricultura, que utiliza compostos orgânicos de mercúrio como fungicidas e praguicidas. Em 1965, o consumo mundial para tais propósitos foi de 2.100 toneladas. Deste total, o Japão consumiu 1.600 toneladas de compostos orgânicos de mercúrio como fungicidas (QUEIROZ, 1995). De acordo com a UNEP (2002), o cloreto de mercúrio é utilizado como praguicida para tratamento de sementes, em países como Índia e Guiné. No Brasil, o Ministério da Agricultura proibiu o uso de fungicidas alquilmercuriais (metil e etil) (AZEVEDO, 2003).

O acúmulo de metais pode promover danos oxidativos devido ao aumento da concentração celular de várias espécies reativas de oxigênio (EROS), como o peróxido de hidrogênio, radical ânion superóxido e radical hidroxil, além de redução da capacidade antioxidante celular em organismos expostos (ATLI *et al.*, 2006). Como resultado do contato com o solo, compostos de mercúrio são degradados, e este elemento permanece retido sob a forma insolúvel mediante a fixação dos grupos de enxofre das argilas e da matéria orgânica, em plantas de cultivos (BAIRD, 2002).

1.3 Fontes emissoras de mercúrio e sua transformação no meio ambiente

O conceito de “poluente global” pode ser aplicado ao mercúrio, pois este possui como característica marcante, relacionado aos outros metais, a capacidade de ser emitido ou reemitido para a atmosfera, particularmente, na forma de vapor de mercúrio (Hg^0). Por apresentar propriedades como baixa reatividade e baixa solubilidade na presença de umidade, o Hg^0 evidencia um tempo de permanência na atmosfera da ordem de meses ou até anos, permitindo, dessa maneira, a sua distribuição e deposição no ambiente em proporções globais (JORNAL DA UNICAMP, 2006; AZEVEDO, 2003).

As fontes de mercúrio possuem duas origens principais, as naturais e antropogênicas. As fontes naturais mais significativas de mercúrio são a desgaseificação da crosta terrestre, emissões vulcânicas e volatilização das superfícies das águas e dos solos (AZEVEDO, 2003). As fontes antrópicas são provenientes de baterias, lâmpadas fluorescentes, termômetros, garimpo do ouro e mineração da prata, queima de carvão, incineração de resíduos domésticos e hospitalares, produção de desinfetantes (cloro-soda), amálgamas odontológicos, entre outros (KOJADINOVI, *et al.*, 2006; UNEP 2002). No decorrer do século XX, todas estas fontes de origem antrópica foram apontadas como as responsáveis pela elevação significativa das concentrações desse metal poluente no ecossistema, e

estima-se que a emissão anual total de mercúrio no ambiente, proveniente destas fontes exceda 10.000 toneladas (BAIRD, 2002).

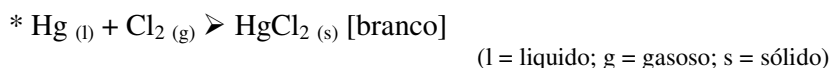
Quando chega ao ambiente, o mercúrio inorgânico pode ser metilado por dois mecanismos: biológico, por microrganismos, e químico. A maior fração de íons Hg^{2+} encontra-se fixado a partículas suspensas em águas naturais. Uma vez presente nos sedimentos dos rios ou lagos, especialmente sob condições anaeróbias, estes íons sofrem o processo de metilação, ou seja, transformação por ação de bactérias bênticas a metilmercúrio e posteriormente a dimetilmercúrio, ganhando lipossolubilidade, uma condição essencial para atravessar com facilidade as membranas biológicas, e dessa forma depositar-se nos tecidos de um organismo. Tanto o metilmercúrio quanto o dimetilmercúrio, são formados a partir de Hg^{2+} , por microrganismos que produzem uma coenzima denominada metilcobalamina, capaz de transferir o grupo metila, dando origem ao metilmercúrio CH_3Hg^+ e ao dimetilmercúrio $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. (BALDI, 1997; QUEIROZ, 1995). A metilação química do mercúrio pode ocorrer de várias maneiras, como por exemplo, o que ocorre com o material húmico, no qual os ácidos fúlvico e húmico do solo doam grupos metila para o Hg^{2+} , formando CH_3Hg^+ . O mercúrio também pode ser metilado no intestino e muco de peixes, e no intestino de ratos e humanos (AZEVEDO, 2003; QUEIROZ, 1995).

1.4 Mecanismo de toxicidade

A forma metilada, metilmercúrio, possui a propriedade de acumular-se nos organismos ao longo da cadeia alimentar, sendo absorvida eficientemente pelo trato gastrointestinal de alguns animais e humanos, podendo atravessar tanto a barreira hematoencefálica quanto a barreira placentária, o que representa um risco duplo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; CHANG, 1996). Uma vez no cérebro, os compostos de mercúrio

podem interromper a função de proteínas, que contém os grupos tiólicos (-SH), como foi observado na isoenzima monoamina oxidase (MAO-B), a qual é predominante no cérebro; esses compostos interagem com grupos -SH, levando a uma eventual morte celular e perdas de funções neurológicas (STAMLER *et al.*, 2006).

Outra forma, HgCl₂, é uma espécie reativa particulada, solúvel em água, corrosiva e muito tóxica, que se origina da seguinte reação química:



De acordo com Azevedo (2003), o cloreto de mercúrio foi empregado como catalisador na indústria química, sendo parcialmente eliminado nos efluentes líquidos industriais. Como exemplo, temos o HgCl₂ que catalisava a síntese de acetaldeído, e, a fabricação de uma tonelada do produto, liberava de 30 a 100 g de mercúrio no ambiente. Atualmente não há indicação desse uso. Outros compostos de mercúrio são utilizados como catalisador na produção de poliuretano e outros polímeros, em países como Finlândia, Austrália e Irlanda (UNEP, 2002).

Segundo Ercal *et al.*, 2001, o mercúrio pode produzir depleção dos principais sistemas antioxidantes celulares, principalmente das enzimas que contém grupos tióis que podem sofrer alteração, dessa forma, a atividade enzimática pode ser comprometida, levando ao acúmulo e geração das espécies reativas de oxigênio (EROS), como os radicais hidroxil (HO[•]), os radicais superóxido (O₂^{•-}) ou o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Danos celulares induzidos por metais tóxicos estão geralmente associados com a formação de EROS (LEONARD *et al.*, 2004; VERLECAR *et al.*, 2007).

* O Hg²⁺ pode se complexar com íons cloreto dependendo do pH e da concentração de cloreto.

Do ponto de vista bioquímico, a atividade enzimática é afetada devido à forte afinidade dos íons metálicos pelo enxofre. Dessa forma, os grupos tiólicos, - SH, que ocorrem comumente nas enzimas, unem-se com extrema rapidez aos grupamentos iônicos dos metais tóxicos ingeridos ou a moléculas contendo tais metais. A enzima não atua com normalidade, em consequência da ligação metal-enxofre resultante que afeta a sua função parcial ou completa, resultando em injúrias moleculares e/ou celulares (FARINA *et al.*, 2003). Além de combinar-se com grupos tiólicos, o mercúrio é também capaz de ligar-se a outros grupamentos químicos de relevância biológica, na seguinte ordem decrescente de afinidade: sulfidril (SH) > amida (CONH₂) > amina (NH₂) > carboxila (COOH) > fosfato (PO₄) (HAYES, 1983). Tais interações podem resultar em alterações da atividade de enzimas e da estrutura de proteínas e membranas (NORSETH, 1967).

Para proteger contra os efeitos deletérios das EROS, as células possuem sistemas de defesa antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, que podem ser considerados como biomarcadores bioquímicos. O uso de diversos biomarcadores enzimáticos e suas respostas tem sido estudado em animais expostos a contaminantes metálicos, tanto em pesquisa de campo quanto de laboratório, como indicativos da qualidade do ambiente (ATLI, 2007).

1.5 Os organismos bioindicadores e biomarcadores bioquímicos

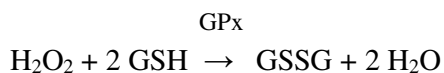
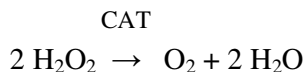
Os bioindicadores são definidos como organismos ou comunidades que respondem à poluição ambiental por meio de diversas alterações como, morfofisiológicas, anatômicas, bioquímicas, genéticas, comportamentais e também queda da quantidade e variabilidade das espécies. Tais organismos podem ser utilizados como instrumentos ecológicos para a avaliação da saúde e qualidade ambiental, integridade ecológica e preservação de ecossistemas terrestres e aquáticos. Estudos para a identificação de bioindicadores da poluição de água têm sido amplamente efetuados em sistemas animais, particularmente em peixes (FATIMA & AHMAD, 2005).

O trabalho realizado por Bonilla-Rodriguez (1989) utilizando o molusco gastrópode *Ampullaria canaliculata*, mostrou resultados em seu uso como organismo bioindicador, por apresentar capacidade de acúmulo dos metais tóxicos, cádmio e chumbo, quando submetidos a esses poluentes.

A utilização de organismos bioindicadores oferece uma forma eficaz para a avaliação das condições do meio em que habitamos. O uso de vertebrados pode apresentar vantagens significativas nas investigações ecotoxicológicas, como a detecção de riscos imediatos para a população humana e seus efeitos tóxicos em nível molecular, em um indivíduo ou comunidade, além de atender outras demandas, tais como: as respostas são facilmente avaliadas; facilidade na manipulação e tratamento; os efeitos da avaliação são quantificáveis; as respostas podem ser analisadas estatisticamente.

Estes animais podem ser expostos, em laboratório, por períodos determinados e doses variáveis de poluentes, objetivando o estudo de biomarcadores bioquímicos que indiquem os efeitos causados pelos contaminantes e que possam ser utilizados em estudo de campo como indicativo da presença de poluentes relacionados ao ambiente. Analisando-se múltiplos biomarcadores, pode-se também obter importantes informações a respeito da exposição dos organismos aos contaminantes. Geralmente, um estresse ocasionado por poluentes ativa uma cascata de respostas biológicas, as quais, em teoria, podem ser consideradas cada uma como um biomarcador (ALMEIDA, 2003). Dentre os sistemas enzimáticos e não enzimáticos que podemos considerar como biomarcadores, estão as enzimas catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S transferase (GST), esterases (AChE e CbE) e níveis de peroxidação lipídica, objetos deste estudo.

A CAT e a GPx são os principais componentes de defesa antioxidante, que protegem os animais do estresse oxidativo, por converter o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água, sendo que, a GPx utiliza a glutatona reduzida (GSH) como doadora de elétrons para a redução do H₂O₂, além de outros peróxidos orgânicos (ALMEIDA *et al.*, 2007).



Os xenobióticos podem ser biotransformados no fígado de acordo com mecanismos que podem ser subdivididos em fases I, II e III (COMMANDEUR *et al.*, 1995). Na fase I, ocorre alteração (oxidação, redução ou hidrólise) da molécula original, a qual será então conjugada na fase II e catabolizada na fase III. Durante o processo de biotransformação de xenobióticos, ocorre a produção de compostos que devem ser ligados a moléculas endógenas por meio de reações de conjugação. Uma das enzimas importantes neste processo é a glutatona *S*-transferase (GST), a qual catalisa reações de conjugação da GSH com uma grande variedade de xenobióticos, dando continuidade ao processo de detoxificação na fase II (PATHIRATNE, 2008). Este mecanismo bioquímico de defesa serve para aumentar a hidrossolubilidade dos produtos na fase III e, dessa maneira, facilitar a sua excreção (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A acetilcolinesterase é uma enzima que está envolvida na transmissão sináptica dos impulsos nervosos (RANK *et al.*, 2007). De acordo com Almeida (2003), poluentes como organofosforados e inseticidas do tipo carbamatos, inibem a atividade desta enzima, ligando-se ao sítio catalítico da mesma. As carboxilesterases representam um grupo

heterogêneo de isoenzimas que catalizam a hidrólise de uma ampla gama de ésteres de xenobióticos, amidos e tioésteres (WILCZEK *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 1997).

A peroxidação lipídica é um exemplo de lesão biológica (PEREIRA, 1996) que pode ser induzida por espécies reativas de oxigênio (EROS), levando a formação de produtos altamente reativos, como os hidroperóxidos que causam danos à membrana celular (ALMEIDA, *et al.*, 2003; TORRES & NETO, 2007).

1.6 *Pterygoplichthys anisitsi* – Generalidades

Os loricariídeos correspondem a uma família de Siluriformes neotropicais distribuídos pelas águas doces da América do Sul e parte da América Central, com alguns casos de tolerância a biótopos salobros. Os membros dessa família apresentam corpo recoberto por escudos dérmicos e a boca ventral em forma de ventosa. São conhecidas no grupo mais de 600 espécies, agrupadas em cerca de 70 gêneros e seis subfamílias. A família Loricariidae abrange aproximadamente 24% de todos os Siluriformes descritos, acima de 2.200 espécies ao total (ARAÚJO, 1994).

Pterygoplichthys anisitsi, o cascudo-cinza, é muito comum na bacia do Rio Preto, afluente do Rio Turvo, localizado na região noroeste do estado de São Paulo. Este loricariídeo neotropical de grande porte, alcança cerca de 50 cm de comprimento total e peso de até 1Kg. O macho desempenha cuidado parental ao construir sua toca e proteger a desova e as fases iniciais das larvas (GARUTTI & GARUTTI, 2000).

De acordo com Cruz & Langeani (2000), os machos de cascudo-cinza iniciam a construção dos ninhos ou reformas de ninhos remanescentes de estações reprodutivas anteriores, normalmente após o período de chuvas contínuas e regulares (dezembro a janeiro). O processo de construção das locas e deposição de ovos pode durar de 1 a 2 dias. Os ninhos de *P. anisitsi* tem a forma de galeria quase cilíndrica, 82 cm de comprimento e 17 a 22 cm de largura, com uma abertura única, e são construídos nos barrancos dos rios.

Alguns loricariídeos eclodem em um estágio muito precoce, assemelhando-se aos adultos. Todavia em *Pterygoplichthys anisitsi*, as larvas, apesar de eclodirem em um estágio menos avançado, permanecem na boca por um período que as possibilita atingir certo grau de desenvolvimento.

O comportamento territorial exibido pelos machos de *P. anisitsi* no decorrer da estação reprodutiva, indica que a espécie possui uma organização de dominância baseada no tamanho dos indivíduos. Os machos maiores asseguravam para si, ao menos no início da estação, a exclusividade na utilização de recursos, tais como parceira sexual e sítio para a desova e proteção da prole (CRUZ & LANGEANI, 2000).

1.7 *Oreochromis niloticus* – Generalidades

Oreochromis niloticus, conhecida como tilápia do Nilo, é uma espécie nativa da África, bastante agressiva e de hábito alimentar onívoro. A tilápia representa hoje um grande problema com a sua introdução, pois se reproduzem precocemente, competindo por espaço e alimento com espécies nativas, podendo até utilizá-las como presas. Pertencente à família Cichlidae (SANTOS, 1977) apresenta coloração cinza azulada, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas (GALLI & TORLONI, 1984). Possui crescimento rápido, atingindo comprimento máximo, publicado, de 60 cm e peso máximo de aproximadamente 4,3 Kg. A característica principal que distingue *Oreochromis niloticus* é a presença de listras verticais por todo comprimento da nadadeira caudal (COSTA-PIERCE, 2003).

As espécies pertencentes ao gênero *Oreochromis* proliferam-se rapidamente, podendo iniciar a reprodução a partir do quarto mês de idade. O macho é quem constrói o ninho, cujo tamanho varia de acordo com o espaço disponível em seu habitat, geralmente o diâmetro pode variar de 20 a 90 cm e a profundidade é de 5 cm. Após a corte, os ovos são depositados no ninho e logo em seguida são fecundados pelo macho. Posteriormente à

fecundação, a fêmea recolhe os ovos na boca, para incubação, eclosão e proteção das larvas. O número de alevinos produzidos depende do tamanho da fêmea e varia de 100 a 500 (GALLI & TORLONI, 1984).

1.8 Consumo de peixes contaminados por mercúrio

As populações ribeirinhas da região do Tapajós, no Estado do Pará, utilizam o pescado como fonte principal de alimentação. Pesquisas demonstraram que os peixes da região apresentaram teores de mercúrio acima do recomendável para o consumo humano, estabelecendo nessa população um grupo de risco de contaminação ambiental pelo mercúrio (FALCÓ *et al.*, 2006). Os estudos nas comunidades foram baseados em amostras de cabelo, local em que a concentração média de mercúrio total apresentou um resultado acima do limite de tolerância biológica, de 10 µg/g, estabelecido pelo *International Programme of Chemical Safety*. Os níveis totais de mercúrio nas amostras de cabelo variaram entre 2,9 a 71,5µg/g (PINHEIRO *et al.*, 2000). A tabela 1 ilustra os valores limites ambientais para a exposição de mercúrio.

Análises realizadas na água e no solo em determinados pontos da região do mangue de Cubatão, também apresentaram valores de concentração de mercúrio além dos níveis permitidos. Os estudos evidenciaram concentrações de 0,01 e acima de 0,06 µg/L. Apesar do nível de mercúrio estar abaixo do limite máximo, as características do mangue favoreceram a sua disponibilidade, elevando o risco de contaminação (BERNARDES, 2002). A tabela 2 mostra outros exemplos de locais contaminados por mercúrio.

A exposição a longo prazo à forma orgânica do mercúrio - o metilmercúrio - pode resultar em efeitos tóxicos irreversíveis no sistema nervoso central. É indispensável a monitoração das concentrações das espécies químicas orgânica e inorgânica desse metal associados a medidas de prevenção e controle ambiental, visando minimizar ou evitar o surgimento de doenças em comunidades expostas a esse risco.

Tabela 1: Limites ambientais para a exposição ao mercúrio

Compartimento	Limite	Fonte
Ar urbano	< 15 µg/m ³ (24 horas de exposição)	Goyer (1986); Organização Mundial da Saúde
Água		
Potável	1,0 µg/L (valor guia)	Brasil. Portaria 56 MS; OPS (1985)
Fluvial	0,2 µg/L	Galvão e Corey (1987)
Marítima	0,3 µg/L	Galvão e Corey (1987)
Alimentos – peixes		
Peixes carnívoros	1 µg/L	Legislação brasileira, Portaria 685, 27/08/1998
Peixes não carnívoros	0,5 µg/L	ANVISA
Pescados fluviais	< 200 µg/kg	Galvão e Corey (1987)
Pescados marítimos (exceto grandes peixes carnívoros)	< 150 µg/kg	Galvão e Corey (1987)

Fonte: Azevedo (2003)

Tabela 2: Locais contaminados por mercúrio.

Estado	Cidade/Rio	Contaminação	Concentração	Fonte	Referência
SP	Mogi-Guaçu (Rio)	Peixes carnívoros	Limite máx. p/consumo humano	Indústrias de curtumes	Boldrini., 1983
PB	Recife/Rio Botafogo	Águas	Limite máx.	Fábrica de cloro-soda	Meyer <i>et al.</i> , 1998
SP	Cubatão/Rio Cubatão	Sedimentos	1,8 – 21,4 µg/L Hg	Indústrias Carbocloro	Greenpeace 1998
Rondônia	Rios	Águas	0,1 – 8,6 µg/L	Região de mineração	Pfeiffer <i>et al.</i> , 1988
Pará	Rio Tapajós	Peixes	500 µg/g	-----	Pinheiro <i>et al.</i> , 2000
SP	Baía de São Vicente	Águas Peixes (10%)	1,66 – 2,14 µg/L 170 – 860 µg/Kg	Efluentes do pólo industrial de Cubatão	Ferreira <i>et al.</i> , 1979

Fonte: Azevedo (2003)

1.9 Efeitos da intoxicação por mercúrio em humanos

O mercúrio e seus compostos podem causar diversos danos à saúde, tanto em situações de exposição aguda (a curto prazo) quanto crônica (a longo prazo) (AZEVEDO, 2003). Do ponto de vista ecotoxicológico, é importante lembrar que na natureza, o mercúrio se apresenta em três categorias químicas distintas: (1) mercúrio inorgânico elementar, vapor ou líquido; (2) sais ou minerais inorgânicos; e (3) mercúrio orgânico. O contato com qualquer forma mercurial pode produzir toxicidade sistêmica (GRAEME & POLLACK, 1998).

As intoxicações agudas descritas na literatura estão vinculadas às altas concentrações de vapores de mercúrio formadas após aquecimento que induzem o aparecimento de efeitos nocivos nos sistemas nervoso, digestivo, respiratório e renal (WHO, 1991). São também evidentes, em exposições a altas concentrações de vapores de mercúrio, alguns sintomas que podem surgir em poucas horas: efeitos associados ao sistema nervoso central, como tremores, instabilidade emocional, irritabilidade e nervosismo, perda da memória, fraqueza muscular e alucinações (HSDB, 2000; WHO, 1991).

Os sais de mercúrio inorgânico são corrosivos, seu contato com membranas mucosas produz efeito inflamatório, vesicular e necrótico. Dessa forma, a ingestão de sal inorgânico de mercúrio como o cloreto de mercúrio (HgCl_2), produz aspecto cinza escuro na boca, faringe e intestino (HAMMOND, 1980).

O rim é o órgão alvo na intoxicação aguda pelo íon mercúrio. Ocorre extensa necrose de células epiteliais e do túbulo contornado proximal. Elevadas concentrações de mercúrio presente no filtrado glomerular podem danificar as funções dos túbulos, gerando perda de grandes quantidades de moléculas essenciais para o organismo, como a glicose e aminoácidos (AZEVEDO, 2003). Segundo Azevedo (2003), dentre os diferentes compostos de mercúrio, o cloreto de mercúrio é o que se revela especialmente nefrotóxico.

A intoxicação crônica resulta da exposição permanente e por períodos prolongados a pequenas quantidades de mercúrio. Podem ser encontradas em pessoas que trabalham em atividades que utilizam o mercúrio orgânico ou inorgânico, como em garimpos (AZEVEDO, 2003).

O sistema nervoso central (SNC) é especialmente atingido na intoxicação crônica por mercúrio elementar (FRIBERG & VOSTAL, 1972). Os sinais clínicos relatados são mudança comportamental, tremor, distúrbios sensoriais e dificuldades auditivas e visuais (VASSALLO *et al.*, 1996). Em trabalhadores da indústria de termômetros, expostos a baixas concentrações de vapores de mercúrio, foram detectados alterações psiconeurológicas, que se manifestavam por ansiedade, depressão, deficiência de memória e perturbações na coordenação motora (MILLER *et al.*, 1975). Soleo *et al.*, (1990) também observaram sinais de depressão e alterações de personalidades em trabalhadores expostos a pequenas concentrações de mercúrio inorgânico.

A exposição crônica ao mercúrio metálico pode levar ao surgimento de distúrbios na função reprodutora feminina. Sikorski *et al.*, (1987) em pesquisas com mulheres expostas ao mercúrio elementar em razão de sua atividade, encontraram relação positiva significativa entre os níveis de mercúrio no cabelo e a ocorrência de insucesso na reprodução, como aborto espontâneo, natimortos e malformação congênita.

As toxicidades do metilmercúrio e do etilmercúrio (alquilmercuriais) se devem principalmente por: serem absorvidos completamente pelo trato gastrointestinal, sendo lentamente eliminados; cruzarem a barreira hematoencefálica e agirem no SNC; cruzarem a barreira placentária e se acumularem no feto, além de serem eliminados no leite materno (HSDB, 2000).

Em todas as espécies estudadas, inclusive no homem, o órgão alvo da ação do metilmercúrio é o sistema nervoso central (AZEVEDO, 2003). A sintomatologia das

intoxicações a curto e longo prazo para o metil e o etilmercúrio são similares e de natureza sensomotora, e se manifestam por alterações visuais, como redução do campo visual e cegueira (SABELAISH & HILMI, 1976), alterações do olfato e paladar, além de provocar distúrbios emocionais, tremores musculares e perturbações no movimento. Em caso de exposição grave podem ocorrer paralisia e morte (KLAASEN, 1986).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve o objetivo de fornecer informações sobre a aplicabilidade de métodos enzimáticos em alguns sistemas bioquímicos, candidatos a biomarcadores de contaminação, para fins de biomonitoramento ambiental.

Com a finalidade de avaliar a toxicidade do mercúrio por meio de análises bioquímicas dos peixes submetidos ao metal, e relacioná-los ao seu respectivo controle (T2C x T2T; T10C x T10T), algumas hipóteses foram testadas:

- Verificar se o HgCl_2 causa inibição de esterases na concentração utilizada;
- Analisar se o HgCl_2 causa estresse oxidativo, evidenciado por alterações nos níveis de antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica;
- Verificar se o HgCl_2 causa inibição ou indução da GST e da GPx devido as suas funções de decompor o H_2O_2 formado durante o estresse oxidativo;
- Analisar se o HgCl_2 causa mudanças na atividade da CAT na concentração e tempo utilizados;
- Verificar se o HgCl_2 causa alterações na contagem celular sanguínea de peixes cascudos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Coleta e Manutenção dos animais

Foram adquiridos no campus da UNESP de Jaboticabal (CAUNESP) 24 exemplares de *P. anisitsi*, com peso médio de $74,67 \pm 2,89$ gramas e comprimento médio de $16,25 \pm 0,17$ centímetros. Vinte e quatro espécimes de *O. niloticus* foram cedidas pela empresa Tilápias do Brasil com peso médio de $75,5 \pm 3,37$ gramas e comprimento médio de $13,0 \pm 0,24$ centímetros.

Os peixes permaneceram em aquários de 100 litros, divididos em quatro grupos: dois controles e dois testes, sendo seis exemplares para cada grupo. Os aquários foram mantidos em temperatura ambiente e, durante o experimento, os animais foram alimentados com ração comercial. Antes de iniciar o experimento, os animais permaneceram em um período de adaptação de sete dias.

3.1.1 Procedimento para exposição dos resíduos

Os efeitos do contaminante foram avaliados, separadamente, por meio da exposição de peixes das espécies *Pterygoplichthys anisitsi* e *Oreochromis niloticus* (fotos 1 e 2) a 100 $\mu\text{g/L}$ de cloreto de mercúrio por dois e dez dias, e somente o fígado (fotos 3 e 4), foi retirado para as análises bioquímicas.

Após o período de adaptação de sete dias, dois grupos de peixes (teste) foram submetidos a solução estoque do metal (cloreto de mercúrio) em concentrações de 100 $\mu\text{g/L}$ adicionados diretamente à água, enquanto que o grupo controle não foi submetido a nenhum tipo de tratamento.

Após dois dias de exposição, foram retirados de cada um dos quatro aquários três peixes, sendo ao todo seis controles e seis testes, os quais foram medidos o comprimento e pesados em balança digital. Os animais foram anestesiados em baldes plásticos contendo

2mL de fenoxietanol/L de água e posteriormente o fígado foi removido, por meio de um corte na região ventral, com o auxílio de uma tesoura de tamanho médio. Transcorridos dez dias, o restante dos peixes foram mortos utilizando-se o mesmo método descrito anteriormente.



Foto 1: Vista lateral de *Pterygoplichthys anisitsi*



Foto 2: Vista lateral de *Oreochromis niloticus*

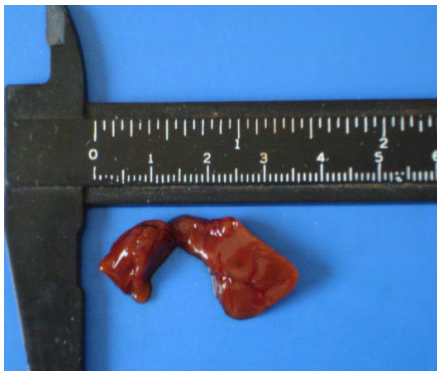


Foto 3: Aspectos do fígado de *Pterygoplichthys anisitsi*

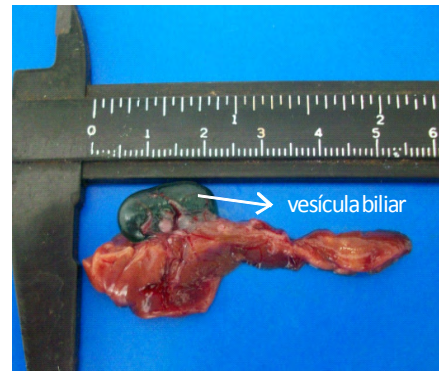


Foto 4: Aspectos do fígado de *Oreochromis niloticus*

3.1.2 Disposição dos resíduos

Após o experimento, a água contaminada foi alcalinizada com NaOH (até pH 10,0) para neutralização do mercúrio, e então passada em filtro de carvão ativado para retenção do contaminante remanescente, seguindo assim as normas internacionais de descarte para este resíduo. As carcaças dos animais foram encaminhadas para a coleta do lixo biológico da UNESP.

3.2 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi feita somente em *Pterygoplichthys anisitsi*. Através de punção cardíaca, após os peixes serem anestesiados, foram colhidas alíquotas de 2 mL de sangue, com o auxílio de seringas contendo o anticoagulante heparina comercial. O sangue destinou-se à determinação da concentração de hemoglobina, do hematócrito e eritrócitos.

3.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos

A metodologia baseou-se na realização de hemograma do grupo de peixes cascudos controles e expostos a cloreto de mercúrio, como um trabalho complementar. Para isso, foram feitos a contagem de eritrócitos (glóbulos vermelhos - GV) em câmara de Neubauer, após diluição, e a determinação do hematócrito pelo método do microhematócrito, (GOLDENFARB *et al.*, 1971). A concentração de hemoglobina total foi determinada pelo método da cianometahemoglobina descrito por Collier (1944). Em posse de tais resultados foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), segundo Wintrobe (1934). Tais índices associados a contagem de eritrócitos (GV), determinação do hematócrito e concentração de hemoglobina, constituem o hemograma.

Para calcular os índices hematimétricos como o VCM e CHCM, foram aplicadas as seguintes fórmulas:

▪ **Volume Corpuscular Médio (VCM)**

$$\text{VCM (fL)} = \text{Ht} \div \text{GV} \times 10$$

Onde: fL= fentolitros

Ht= hematócrito*

GV= glóbulos vermelhos

▪ **Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)**

$$\text{CHCM (g/dL)} = \text{Hb} \div \text{Ht} \times 100$$

Onde: g/dL= gramas por decilitro

Hb= hemoglobina

Ht= hematócrito

Para o cálculo da **Taxa de Hemoglobina** usada na fórmula anterior:

$$\text{Hb (g/dL)} = \text{F} \times \text{A} \times 540 \times 64,500 \div 44,0 \times \text{d} \times 10$$

Onde: Hb= hemoglobina

g/dL= gramas por decilitro

F = fator de diluição = 250

A= 540 = absorvância da solução em 540 nm

64,500 = massa molecular da hemoglobina

44,0 = coeficiente de extinção milimolar da hemoglobina

d = 1 cm (equivale a cubeta)

* O hematócrito corresponde ao volume ocupado pelos eritrócitos contidos numa certa quantidade de sangue total, e é dado em porcentagem.

3.4 Atividade enzimática – esterases (AChE e CbE)

As atividades das duas esterases (AChE, e CbE) foram medidas e caracterizadas seguindo a metodologia descrita por Ellman *et al.* (1961). Foram pesados aproximadamente 100mg do fígado e diluídos em quatro vezes o volume do tampão Tris 100mmol/L pH 8.0 a 4°C e então homogeneizados.

Posteriormente à homogeneização do tecido, o material foi centrifugado por 30 minutos a 9.168g a 4°C. Após o processo, foi retirada uma alíquota do material sobrenadante e congelado a uma temperatura de -80°C para análises posteriores. Acetilcolina e feniltioacetato foram usados como substrato para as atividades da acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE), respectivamente.

Para testar a toxicidade *in vitro* do HgCl₂ da atividade das esterases, extratos de amostras controle de fígado foram unidas em um pool, e então separadas em 12 alíquotas de 100µL. A cada 3 alíquotas foram adicionados HgCl₂ nas seguintes concentrações: 0 (controle); 0.1; 0.01 e 0.001mmol/L (concentração final). Após a adição do HgCl₂, as amostras foram incubadas a 30°C por 30 minutos e então medidas as atividades da AChE e CbE. Os dados estão expressos como médias ± desvio padrão em porcentagem.

3.5 Enzima Catalase (CAT) e Glutathione S Transferase (GST)

A atividade da CAT foi medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, por meio do decréscimo de absorbância em 240nm, a 30°C.

A atividade da GST foi medida pelo método de Keen *et al.*, (1976). A amostra foi adicionada em um meio de reação contendo 100mmol/L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 100mmol/L de GSH, e o aumento de absorbância foi acompanhado a 340nm.

3.6 Análise da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi medida pela técnica descrita por Sies *et al.* (1979). Este método se baseia na medida do decréscimo de absorvância, promovido durante a redução da glutathiona oxidada (GSSG), catalisada pela glutathiona redutase (GR), em presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). O meio de reação continha tampão fosfato de potássio 0,1M, ácido etilenotriaminotetraacético (EDTA) 5mmol/L, pH 7,0, NADPH 20mmol/L, GR 0,1U/mL e glutathiona reduzida 0,1mol/L. O decréscimo na absorvância foi registrado no comprimento de onda de 340nm, à 30°C.

3.7 Análise de peroxidação lipídica

A técnica para a avaliação da peroxidação lipídica foi descrita por Hong *et al.* (2000), e baseia-se na avaliação do produto de peroxidação malondialdeído (MDA) por espectrofotometria. Cerca de 75mg de fígado foram homogeneizados em 300µL de solução de sacarose 250mmol/L. Em seguida foram adicionados 50µL de uma solução de detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 150µL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2 M, e as amostras foram então incubadas por 30 minutos à 90°C. A esta temperatura, o MDA reage com o TBA formando um composto com forte absorção em 535nm. Em seguida as amostras contendo o complexo MDA-TBA extraídas com 1 mL de n-butanol, centrifugadas a 825g por 3 minutos e o sobrenadante foi diretamente medido em espectrofotômetro à 532nm. A quantificação do composto foi baseada em uma curva padrão de MDA preparada da mesma forma, com concentrações conhecidas do composto.

3.8 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) que utiliza albumina bovina como padrão. As leituras das atividades enzimáticas e também níveis de peroxidação lipídica foram feitas por espectrofotometria.

3.9 Análises estatísticas dos resultados

Os dados foram expressos como Média \pm DP. Análises estatísticas foram apresentadas usando teste t-Student's da SigmaStat, versão 3.10, com valores de $P < 0,05$ considerados estatisticamente significantes. A avaliação dos efeitos tóxicos foi baseada em métodos comparativos com o respectivo grupo controle.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Catalase (CAT)

As figuras 1 e 2 mostram a atividade da catalase em *P. anisitsi* e *O. niloticus*, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas em ambas espécies, sugerindo que a CAT não é afetada pela concentração de mercúrio utilizada neste experimento. Verlecar *et al.* (2007) realizou um estudo com o mexilhão *Perna viridis*, submetido, simultaneamente a mercúrio e calor durante sete dias, e relatou que não ocorreram diferenças significativas na atividade da catalase, nas brânquias, em relação ao grupo controle.

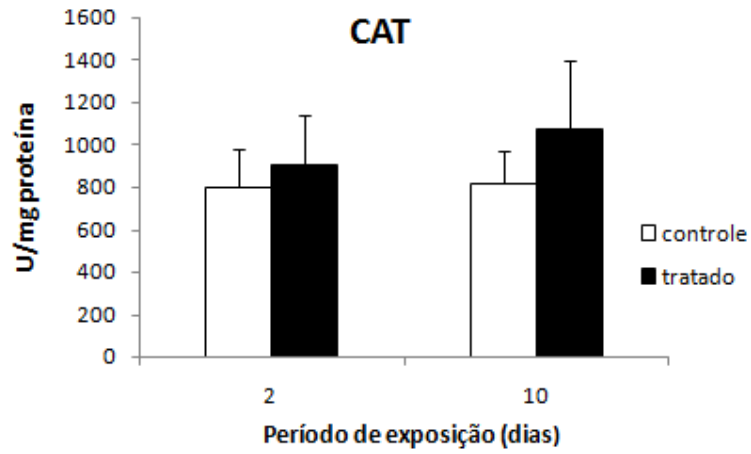


Figura 1 – Atividade da catalase em cascudos *P. anisitsi* expostos a cloreto de mercúrio.

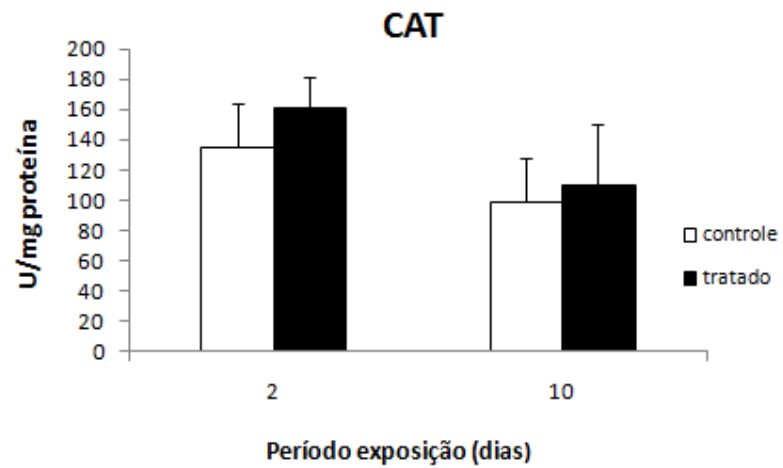


Figura 2 – Atividade da enzima catalase em *O. Niloticus* expostos a cloreto de mercúrio.

A CAT participa da detoxificação de H₂O₂, convertendo-o a oxigênio e água, reduzindo dessa forma os riscos de lesões oxidativas provenientes das EROS (PEREIRA, 1996). Em outro estudo Verlecar *et al.*, (2008), mostrou que a atividade da CAT em glândulas digestivas de mexilhões, foi quase similar ao controle durante os primeiros 10 dias de exposição a mercúrio, e foi observado um aumento após 15 dias de exposição.

Em estudo com grupos de *O. niloticus*, expostos a diversos metais, observou-se que a atividade da enzima, foi inibida quando exposta a zinco, sofreu indução na exposição a cádmio e ainda não sofreu mudança significativa quando exposta a cobre. (ATLI & CANLI, 2007). Estes autores concluíram que mesmo antes do metal exibir um significativo acúmulo no fígado, ele pode ocasionar estresse oxidativo.

Em cascudos e tilápias a atividade da CAT não sofreu alteração, sugerindo que a concentração ou tempo de exposição testados, não afeta a enzima.

4.2 Glutathione Peroxidase (GPx)

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da GPx em grupos de cascudos (figura 3) e tilápias (figura 4). Elia *et al.* (2002) em seu trabalho com o peixe *Ictalurus melas*, relatou que em peixes expostos a diferentes concentrações de mercúrio, a atividade enzimática da GPx não sofreu alterações estatisticamente significativas. Verlecar *et al.*, (2007), mostrou que em mexilhões *Perna viridis* expostos a mercúrio, a atividade da GPx foi similar ao grupo controle estudado durante 10 dias de exposição, porém após 15 dias, a atividade da enzima aumentou devido a produção contínua de radicais livres.

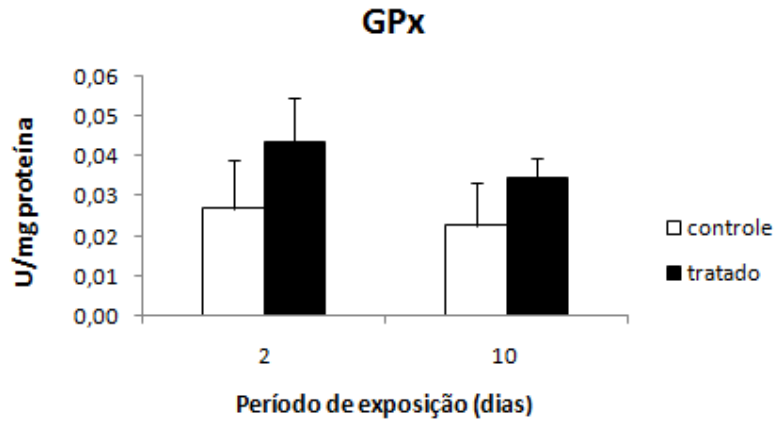


Figura 3 – Atividade da GPx em fígado de cascudos *P. anisitsi* expostos a cloreto de mercúrio.

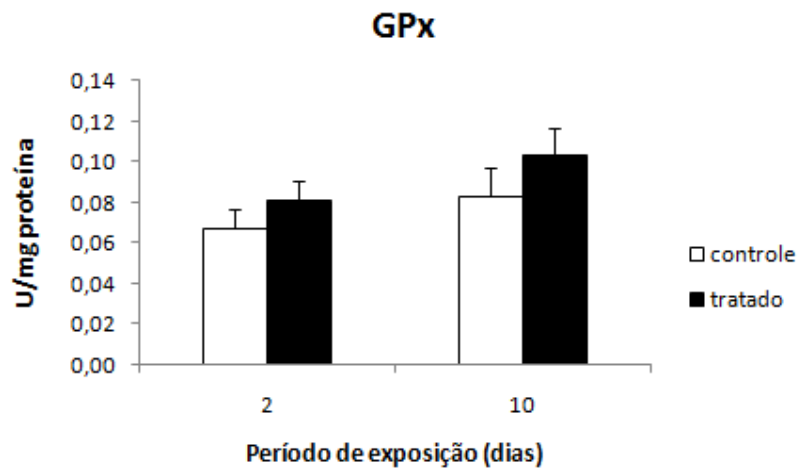


Figura 4 – Atividade da GPx em fígado de tilápias *O. niloticus* expostas a cloreto de mercúrio.

A glutationa peroxidase protege os organismos contra o estresse oxidativo, catalizando a redução de hidroperóxidos a água e peróxido orgânico e de peróxido orgânico a alcóois, usando a glutationa reduzida (GSH) como doadora de elétrons (VERLECAR *et al.*, 2007). A ausência de diferenças significativas na atividade da GPx pode ser relatada por aumento da tolerância dos animais diante a exposição do contaminante ou pela ação de outros mecanismos de defesa antioxidantes.

Em *P. anisitsi* e *O. niloticus*, a atividade da GPx não sofreu alteração, isso pode ser devido a ativação de outros sistemas antioxidantes a fim de proteger o organismo da exposição do contaminante testado.

4.3 Acetilcolinesterase (AChE)

Tanto em cascudos (figura 5), como em tilápias (figura 6), não foram encontradas diferenças significativas na atividade enzimática da acetilcolinesterase.

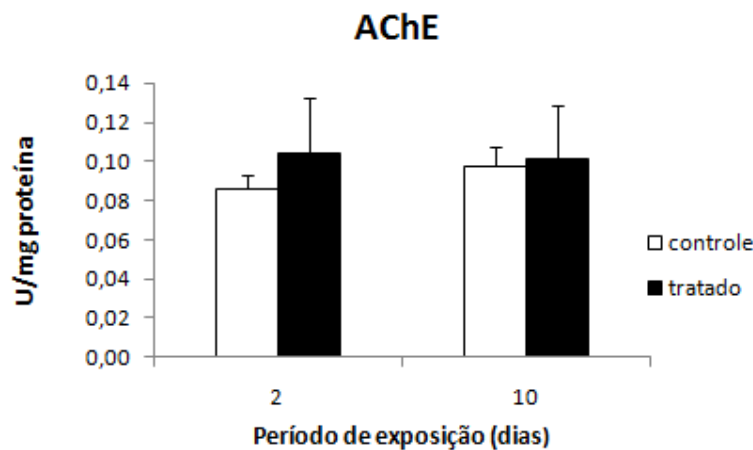


Figura 5 – Atividade da AChE no fígado de cascudos expostos a HgCl₂.

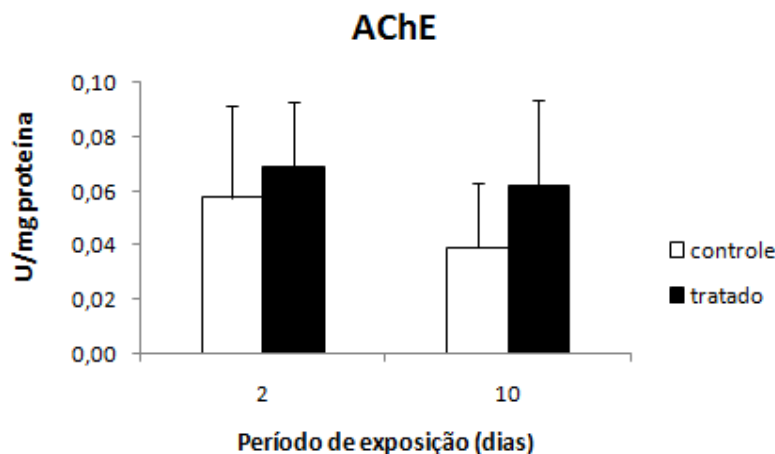


Figura 6 – Atividade da AChE no fígado de tilápias *O. niloticus* expostas a HgCl₂.

Acredita-se que colinesterases sejam sensíveis a exposição por mercúrio; diferentes organismos expostos a concentrações subletais do metal mostraram um decréscimo significativo na atividade de colinesterases em diversos órgãos (EL-DEMERDASH, 2001; DEVI & FINGERMAM, 1995). No entanto a indução de colinesterases pela exposição ao mercúrio também têm sido observada (SANZ & REPETTO, 1995).

Alguns estudos já demonstraram que a exposição aguda por metais, ocasiona aumentos significativos na atividade da AChE. Guill *et al.* (1991), observou um aumento significativo da atividade da AChE em peixes expostos a cádmio. Bairy *et al.* (2006) observou também um aumento significativo na atividade desta enzima em mexilhões *Perna perna* expostos a cádmio e chumbo.

Estudos mostram que a acetilcolinesterase pode ser utilizada como biomarcador de contaminação ambiental ocasionados por uma ampla variedade de contaminantes químicos (KOPECKA *et al.*, 2006; SCHIEDEK *et al.*, 2006), tais como, metais tóxicos,

hidrocarbonetos, detergentes e principalmente pesticidas organofosforados e carbamatos (MACHREKI-AJMI *et al.*, 2007).

Em mexilhões (*Mytilus edulis*) coletados em áreas contendo agentes tóxicos, como metais tóxicos, entre outros, a atividade da AChE revelou-se induzida (RANK *et al.*, 2007). Os autores concluíram que em bivalves a atividade da AChE também pode ser alterada por fatores abióticos como temperatura e salinidade.

Embora a literatura citada apresente os efeitos de metais sobre colinesterases, neste trabalho, não foram observadas as alterações enzimáticas que retratam a literatura, possivelmente pela ação de outros mecanismos de defesa, porém, estudos mais detalhados referentes a tempo de exposição ou diferentes concentrações, devem ser realizados para uma melhor determinação dos reais efeitos do cloreto de mercúrio na atividade da enzima acetilcolinesterase.

4.4 Carboxilesterase (CbE)

A habilidade de um organismo de se adaptar a um ambiente alterado por contaminação química depende principalmente dos mecanismos efetivos de detoxificação de vários componentes endógenos e exógenos. Entre as enzimas responsáveis por neutralizar xenobióticos estão as carboxilesterases (TOUNG *et al.*, 1990; WILCZEK *et al.*, 2003).

Em relação à atividade da CbE, notamos que houve uma inibição significativa em peixes cascudos expostos por dois dias ao mercúrio (figura 7). A figura 8 mostra que em tilápias não foram observadas diferenças significativas na atividade da CbE. Esses resultados mostram que diferentes organismos respondem a contaminação de maneira distinta, devido a diferenças no metabolismo de uma espécie para outra.

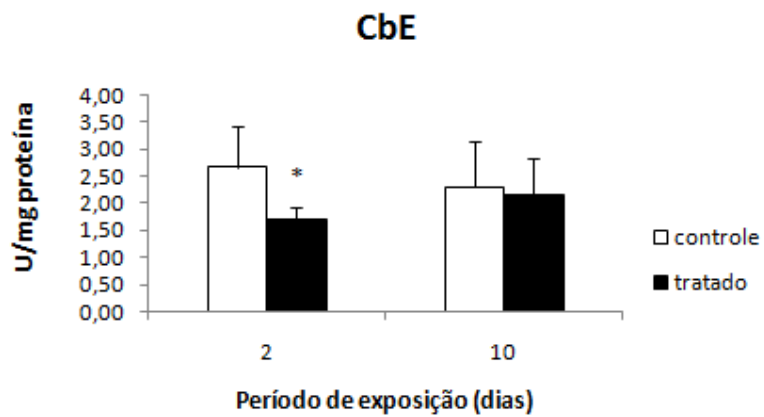


Figura 7 – Atividade da CbE em cascudos *P. anisitsi*.
* indica diferenças estatísticas para $P < 0,05$ pelo teste t.

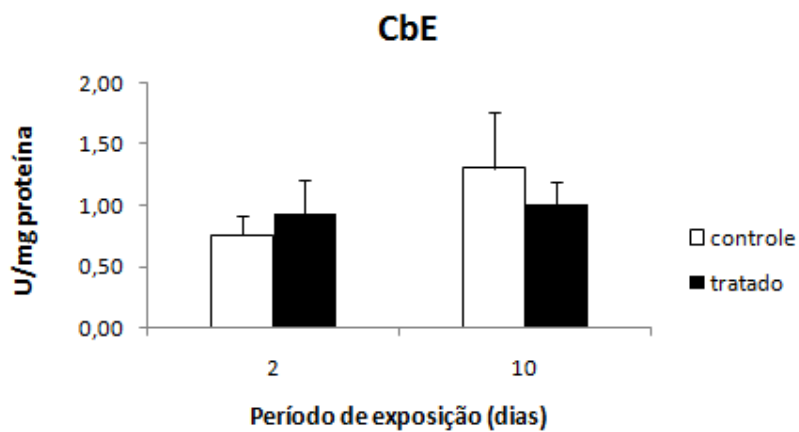


Figura 8 – Atividade da enzima CbE em tilápias *O. niloticus*.

Huang *et al.*, (1997) analisou fígados de peixes da espécie *Lepisosteus oculatus* coletados em rios poluídos com múltiplos contaminantes, inclusive metais, e observou um decréscimo significativo na atividade da CbE. Este resultado é mais um indicativo de que a exposição a compostos tóxicos como metais pode afetar de forma significativa a atividade de esterases em organismos aquáticos.

De acordo com Frasco *et al.*, (2007), metais são capazes de ligar-se a cadeias laterais de grupamentos de histidina e metionina. Além de outros grupamentos, as enzimas carboxilesterases, possuem grupos de histidina em seu sitio catalítico (WHEELLOCK *et al.*, 2008). Em cascudos a inibição da atividade da CbE pode ser devido a interação do mercúrio com o grupamento de histidina, no sitio ativo da enzima, uma vez, que ocorre a participação dessa enzima no processo de detoxificação de xenobióticos. A CbE pode ser considerada um biomarcador de contaminação ambiental por metal mercúrio, quando utilizado o organismo *P. anisitsi*.

4.5 Inibição *in vitro* AChE e CbE

Em relação a inibição *in vitro* das enzimas AChE e CbE, evidenciou-se que a AChE em cascudos (figura 9) foi bastante afetada nas concentrações de 0,01mM e 0,1mM, entretanto, o mesmo não ocorreu com a CbE (figura 10). Porém, a incubação com a maior concentração levou a uma tendência para a inibição com relação ao controle ($P=0,077$ pelo teste estatístico t, não atingindo o nível de significância para $P<0,05$) na CbE na concentração de 0,1mM. Em tilápias não foram observadas mudanças significativas (figuras 11 e 12).

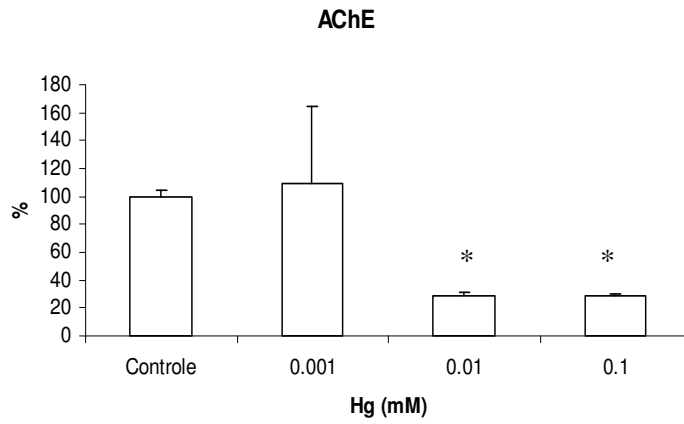


Figura 9 – Atividade da AChE *in vitro* em cascosos.
 * indica diferença estatística pelo teste t, considerando $P < 0,05$.

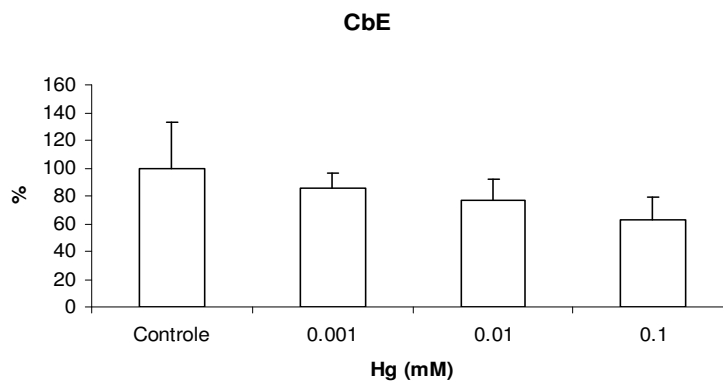


Figura 10 – Atividade da CbE *in vitro* em cascosos.

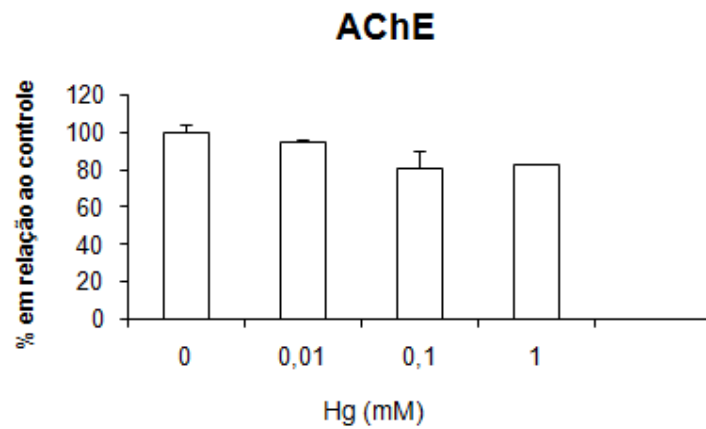


Figura 11 – Atividade da AChE *in vitro* em tilápias.

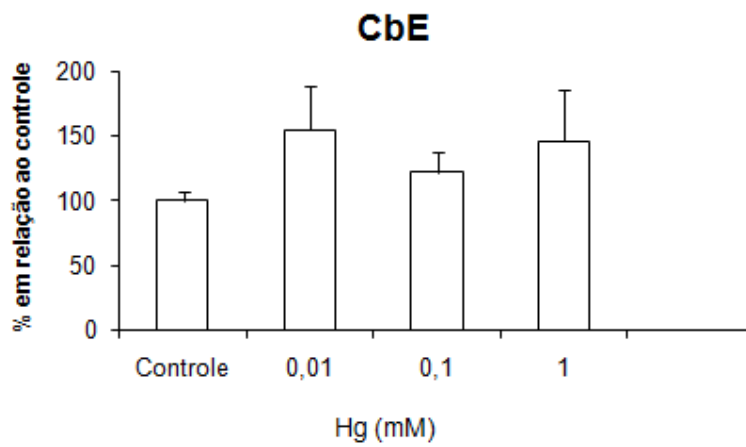


Figura 12 – Atividade da enzima CbE *in vitro* em tilápias.

Estudos *in vitro* mostram que o mercúrio não inibe a AChE diretamente em seu sítio ativo. Um modelo proposto para a inibição da AChE por mercúrio é o mesmo utilizado para o efeito do mercúrio em proteínas. A habilidade do HgCl_2 de romper as pontes dissulfetos ($\text{R-S-Cl} + \text{Cl-Hg-S-R}$) (BROWN & EDWARDS, 1969) de proteínas promove um distúrbio em sua estrutura terciária e, conseqüentemente, ocorre a inativação da enzima, visto que, as pontes dissulfetos (S-S) são essenciais para a manutenção dessa estrutura (FRASCO *et al.*, 2007).

Os mecanismos de inibição propostos para a acetilcolinesterase, também dependem da presença ou ausência de cisteínas livres, que varia de acordo com a espécie. Resíduos de cisteína contêm grupos tiólicos que interagem com íons metálicos, levando a uma inibição da enzima (KREIMER *et al.*, 1994; STEINBERG & SILMAN, 1990). Frasco *et al.*, (2007) estudaram a atividade da acetilcolinesterase na raia do Pacífico *Torpedo californica* exposta a cloreto de mercúrio, estes autores observaram que o metal inibiu a enzima, devido a ligação do íon mercúrio com o grupamento tiol da cisteína (Cys231) presente neste organismo, levando-na a uma inativação irreversível.

No presente estudo foi observado que, a enzima AChE mostrou-se susceptível ao Hg *in vitro* em cascudos, fato que não foi observado em tilápias sob as mesmas concentrações testadas, indicando que a inibição de colinesterases por mercúrio, depende fortemente das espécies, pelo fato de que a presença ou ausência de grupos tióis das cisteínas variam de um organismo para o outro.

4.6 Peroxidação lipídica (PL)

Não ocorreram diferenças significativas na peroxidação lipídica em cascudos (figura 13). Em tilápias, observou-se um aumento significativo na peroxidação lipídica em peixes expostos a 10 dias de tratamento (figura 14), sugerindo que os animais estavam sob efeito

de estresse oxidativo, em consequência do aumento de espécies reativas de oxigênio produzidas durante a exposição do mercúrio. A particularidade de cada animal pode influenciar no modo como ele responde quando submetido a determinados estressores, isto pode explicar as diferenças nos níveis de PL em cascudos e tilápias. Verlecar *et al.*, (2007) mostrou que a exposição de mercúrio associado à alta temperatura causou aumentos significativos na peroxidação lipídica em mexilhões *Perna viridis*. Esses autores atribuíram tal aumento devido a produção de EROS.

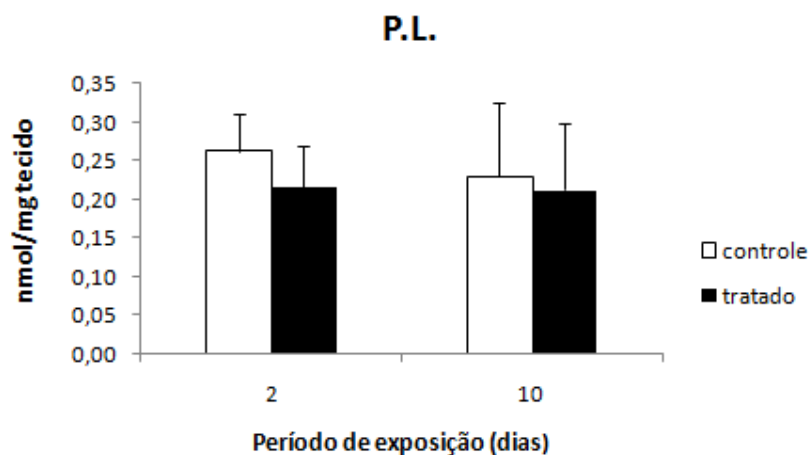


Figura 13 – O gráfico mostra os níveis de peroxidação lipídica em fígado de cascudos.

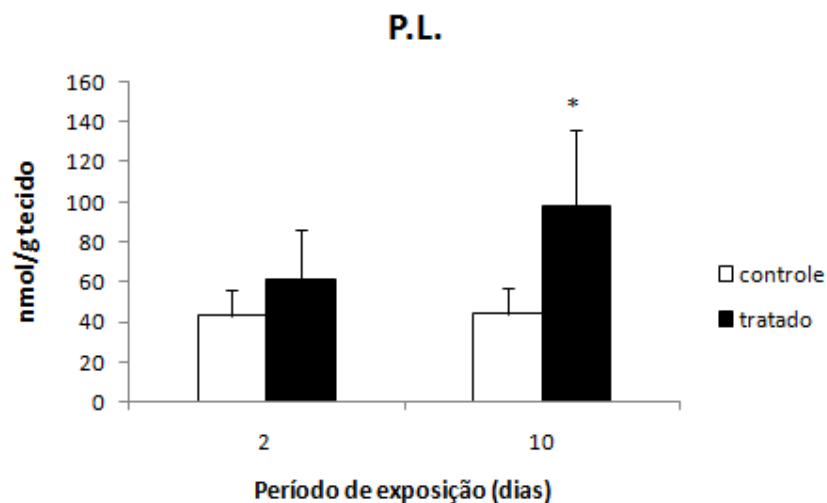


Figura 14 – O gráfico mostra os níveis de peroxidação lipídica em fígado de tilápias. * indica diferenças estatísticas para $P < 0,05$ pelo teste t.

Almeida *et al.*, (2003) mostraram em estudos, que mexilhões *Perna perna* transplantado em local poluído com altos níveis de metais, apresentaram aumento nos níveis de peroxidação lipídica comparados a animais controles de um local de referência. Neste mesmo contexto, a exposição de peixes por cloreto de mercúrio (0,20 mg/L) por 30 dias resultou em um significativo aumento na peroxidação lipídica em fígado, cérebro e músculo (STOHS & BAGCHI, 1994).

Lund *et al.*, (1993), demonstraram que a administração de cloreto de mercúrio (1,5 ou 2,25 mg/Kg) em ratos, resultou em aumento na formação de peróxido de hidrogênio, depleção na glutatona e peroxidação lipídica na mitocôndria do rim, além de induzir alterações na homeostase do cálcio. Resultados indicam que o $HgCl_2$ é responsável por aumentar o cálcio intracelular, por causar despolarização da membrana e assim promover um influxo de cálcio extracelular.

O mercúrio, assim como cádmio e chumbo, provoca alterações em diversos sistemas antioxidantes celulares, principalmente os que contém grupos tióis (-SH), possibilitando assim maior número de lesões. A maior produção de radicais livres pode induzir a peroxidação lipídica, que é um exemplo de lesão biológica que pode resultar na condição conhecida por estresse oxidativo (AZEVEDO, 2003).

4.7 Glutathione S Transferase (GST)

Os níveis da atividade da GST em *P. anisitsi* expostos a 10 dias diminuíram de maneira significativa em relação ao controle (figura 15), sugerindo uma menor capacidade de detoxificação nos fígados desses peixes. Em *O. niloticus* expostos a 10 dias de tratamento, a atividade da GST aumentou significativamente em relação ao controle (figura 16). Essa alta atividade pode estar relacionada a uma maior capacidade de detoxificação nos fígados das tilápias, quando comparados aos cascudos. Esses resultados corroboram com a literatura. O trabalho de Salomão *et al.*, (2007), mostra que das espécies de peixes estudadas pelos autores, para a avaliação de estresse ambiental, o fígado de corvina foi o que apresentou menor capacidade antioxidante, quando comparado com os fígados das outras espécies. Em trabalho publicado por Pathiratne *et al.*, (2008) com a tilápia do nilo (*O. niloticus*) os autores mostraram através da análise do fígado dos peixes coletados em local poluído por metais, que a atividade da GST havia aumentado significativamente em relação a peixes coletados em local de referência, porém, peixes coletados em períodos diferentes e outro local também contaminado por metais e outros contaminantes tóxicos, mostraram um decréscimo da atividade da GST em relação ao controle.

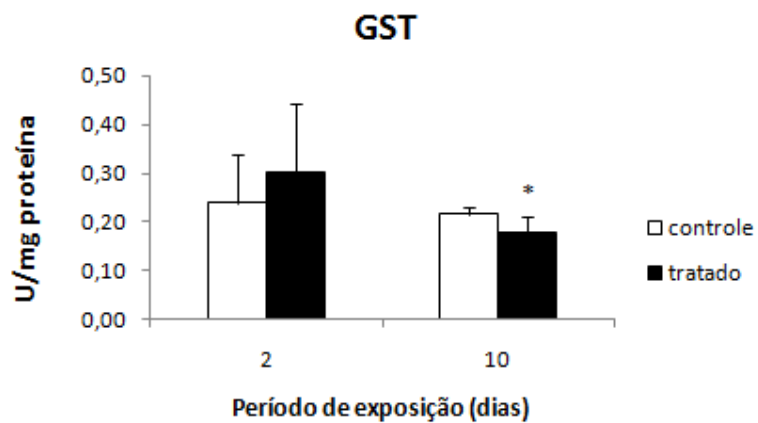


Figura 15 – Atividade da enzima GST no fígado de cascudos. * indica diferenças estatísticas para $P < 0,05$ pelo teste t.

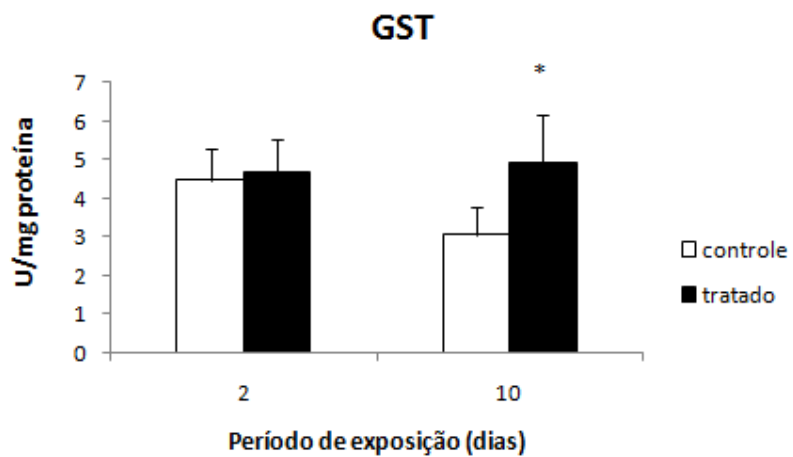


Figura 16 – Atividade da enzima GST no fígado de tilápias. * indica diferenças estatísticas para $P < 0,05$ pelo teste t.

Quando o organismo entra em contato com compostos xenobióticos, seja por via alimentar, por inalação ou acidentalmente, ocorre uma reação de conjugação do grupo tiol da glutatona (GSH), com os grupos eletrofílicos desses xenobióticos, no processo de detoxificação. Essa reação catalizada pela GST, ocorre no processo de detoxificação da fase II, e dessa forma os produtos da reação se tornam mais hidrossolúveis, menos tóxico e de fácil excreção (TORRES *et al.*, 2004).

Elia *et al.*, (2003) expôs peixes (*Ictalurus melas*) a quatro concentrações diferentes de mercúrio e observou que houve um aumento significativo da atividade desta enzima em todas as concentrações utilizadas. Estes autores concluíram que a glutatona S-transferase é um importante componente na proteção contra o estresse oxidativo, podendo ser utilizada como indicador de contaminantes no ambiente aquático. Canesi *et al.*, (1998) mostrou que a exposição a mercúrio aumenta a atividade da GST em brânquias de mexilhões. De acordo com o autor, metais pesados induzem isoformas de GST, que também pode exercer atividade de peroxidase.

Neste estudo, o aumento da GST durante a exposição do cloreto de mercúrio pode representar o único sistema de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo ativado após 10 dias de exposição, também evidenciado pelo aumento dos níveis de peroxidação lipídica nestes animais após 10 dias, visto que existem evidências que esta enzima possui a atividade de peroxidase (FIANDER & SCHNEIDER, 1999; VEAL *et al.*, 2002; PRABHU *et al.*, 2001; COLLINSON & GRANT, 2003; AMICARELLI *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005) com a função de decompor o peróxido de hidrogênio produzido. O aumento na atividade da GST em brânquias foi proposto como resposta ao estresse oxidativo quando a atividade de outras enzimas antioxidantes estão baixas (POWER & SHEEHAN, 1996; SHEEHAN & POWER, 1999; MANDUZIO *et al.*, 2004). Ambos os peixes mostraram alterações na atividade enzimática da GST, porém diferentes organismos respondem de diversas maneiras

quando entram em contato com contaminantes tóxicos, como o observado neste trabalho, onde em cascudos observou-se um decréscimo da atividade da GST, enquanto que, em tilápias, foi observada uma alta atividade.

4.8 Parâmetros hematológicos – *Pterygoplichtys anisitsi*

Os valores médios e a amplitude de variação da contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM em *P. anisitsi* estão relacionados na tabela 3.

Diferenças significativas foram encontradas em grupos de peixes com dois e dez dias de tratamento com cloreto de mercúrio, tais como, número significativamente menor de eritrócitos em relação ao grupo controle, o que sugere a ocorrência de anemia nos peixes. Tavares-Dias *et al.*, (1999) caracterizam como surgimento de anemia em peixes, a redução na concentração de hemoglobina e/ou redução do número de hematócrito e eritrócitos.

Tabela 3. Dados hematológicos dos cascudos usados no experimento de exposição a mercúrio. Hb=hemoglobina; Ht=hematócrito; VCM=volume corpuscular médio; CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média; AV=amplitude de variação. * indica diferença estatística (P<0,05) pelo teste t.

Tempo (dias)	Eritrócitos (10⁶/μL)	AV	Hb (g/dL)	AV	Ht (%)	AV	VCM (fL)	AV	CHCM (g/dL)	AV
Tempo 2 (Controle)	1,25±0,18	1,06±1,42	6,82±1,16	5,79±8,09	30,33±4,16	27±35	243,17±13,49	228,34±254,71	22,49±2,28	19,96±24,40
Tempo 2 (Tratado)	0,59±0,40*	0,17±0,97	4,0±2,45	1,90±6,70	17,0±11,0	6±28	324,21±136,87	175,25±444,44	27,73±14,05	12,14±39,41
Tempo 10 (Controle)	1,99±0,41	1,61±2,44	5,15±1,10	4,10±6,30	33,33±3,05	30±36	170,41±26,91	139,34±186,33	15,40±2,70	13,66±18,52
Tempo 10 (Tratado)	1,17±0,55*	0,78±1,56	4,99±1,59	3,15±5,93	23,0±2,82	21±25	214,74±77,06	160,25±269,23	19,30±6,08	15,0±23,06

Exames hematológicos realizados em traíras e carás, habitantes de áreas de garimpo na Amazônia, revelaram que essas espécies tiveram uma diminuição no número de eritrócitos devido aos elevados níveis de mercúrio encontrados em seus tecidos, levando esses animais a uma anemia do tipo regenerativa, devido a presença de células jovens (CASTILHOS *et al.*, 2004).

Gioda *et al.* (2007) em estudo com peixes *Leporinus obtusidens*, observaram que, em animais expostos a zinco e cobre durante 45 dias, ocorreu um decréscimo nos índices de hematócrito, hemoglobina e números de eritrócitos em relação ao controle. De acordo com a literatura, o hematócrito é um bom indicador dos efeitos adversos ambientais aos quais os peixes estão sujeitos, pois é o índice do eritrograma com menor coeficiente de variação observado em *O. niloticus* (TAVARES-DIAS & FAUSTINO, 1998).

No estudo hematológico com *P. anisitsi*, os valores normais da taxa de hemoglobina, eritrócitos, hematócrito, VCM e CHCM foram semelhantes a peixes encontrados na literatura, tais como as espécies de *Ramdia quelen*, o bagre sul americano (TAVARES-DIAS *et al.*, 2002; MABILIA & SOUZA, 2006), *Leporinus macrocephalus*, o piaçu (MARTINS *et al.*, 2004) e *Tilapia rendalli* (TAVARES-DIAS & MORAES, 2003).

Baixos índices de eritrócitos observados em cascudos revelam que os peixes estavam com anemia, provavelmente, do tipo regenerativa, quando expostos por dois e dez dias, devido a presença de um discreto aumento nesses níveis aos 10 dias de exposição, indicando uma possível regeneração das células, visto que, os peixes eram considerados jovens. A princípio o mercúrio agiu na medula dos peixes destruindo suas células sanguíneas, mas como se tratavam de indivíduos jovens ocorreu uma discreta regeneração nas células que poderia ser melhor notada caso o tempo de exposição fosse maior.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- A enzima catalase e glutathione peroxidase não são sensíveis a essa concentração ou ao tempo de exposição testados em ambas espécies de peixes estudadas.
- A atividade da enzima acetilcolinesterase em cascudos e tilápias não apresentou alterações significativas, porém estudos mais detalhados como diferentes tempos de exposição ou concentração podem ser necessários para concluir se o uso desta enzima como biomarcador de contaminação por cloreto de mercúrio é adequado.
- Já a análise *in vitro* da acetilcolinesterase em cascudos, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM, confirmou o que alguns estudos anteriores mostraram, ou seja, que esta enzima pode ser inibida por metais.
- A sensibilidade da enzima carboxilesterase analisada em fígado de cascudo, exposto por dois dias, mostrou que ela pode ser considerada como um biomarcador de contaminação ambiental por mercúrio.
- A glutathione S transferase mostrou ser o melhor sistema antioxidante em cascudos e tilápias, expostas por dez dias a cloreto de mercúrio; o decréscimo desta enzima observado em cascudos, mostra que o metal é capaz de inibir sua atividade, já o aumento da atividade em tilápias, sugere que o organismo estava sob efeito do estresse oxidativo, também evidenciado pelo aumento nos níveis de peroxidação lipídica, e que consequentemente a GST foi acionada de modo a protegê-lo contra possíveis danos.
- O aumento nos níveis de peroxidação lipídica em tilápias, expostas por dez dias, é um forte indício de que ocorreu a formação de radicais livres durante a exposição, acarretando em estresse oxidativo.

- Em relação ao exame hematológico realizado em cascudos, o decréscimo nos índices de eritrócitos em peixes expostos por dois e dez dias, revelou que tais índices são muito importantes e essenciais para avaliar o impacto da contaminação ambiental por metais e seus reflexos na saúde.

A particularidade de cada espécie, como os peixes cascudos que aparentam serem menos ativos ou os peixes tilápias que são mais ativos, e, dessa forma, apresentam diferentes metabolismos, entre outros fatores tais como alimentação, pH, temperatura, concentração de amônia na água, taxa de oxigênio, idade e sexo, fazem com que suas respostas biológicas sejam diversificadas, o que pode explicar as diferenças nas atividades enzimáticas observadas de um organismo para o outro.

De modo geral *Pterygoplichtys anisitsi* e *Oreochromis niloticus* podem ser utilizados como organismos bioindicadores, devido ao fato de que, estes peixes são bastante resistentes, uma vez que durante todo o trabalho o índice de mortalidade foi nulo, considerando que foi utilizada uma concentração de mercúrio 100 vezes superior ao limite ambiental, visto que, tal limite é de 1,0µg/L, de acordo com o Ministério da Saúde.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E. A. **Avaliação de variações bioquímicas em moluscos bivalves em resposta ao estresse ambiental.** Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Química da Universidade de São Paulo; São Paulo, 2003.
- ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; LOUREIRO, A. P. M.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. DNA and lipid damage in the brown mussel *Perna perna* from a contaminated site. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, vol. 71, p. 270-275, 2003.
- ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; DAFRE, A. L.; GOMES, O. F.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **J. of Experimental Marine Biol. and Ecol.**, vol. 318, p. 21– 30, 2005.
- ALMEIDA, E. A., MARQUES, S. A., KLITZKE, C. F., BAINY, A. C. D., MEDEIROS, M. H. G., DI MASCIO, P. DNA damage levels in the digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochem. and Physiol. Part C: Toxicol. & Pharm.**, vol. 135, p. 295-303, 2007.
- AMICARELLI, F.; FALONE, S.; CATTANI, F.; ALAMANOU, M. T.; BONFIGLI, A.; ZARIVI, O.; MIRANDA, M.; RAGNELLI, A. M.; DI ILIO, C. Amphibian transition to the oxidant terrestrial environment affects the expression of glutathione S-transferases isoenzymatic pattern. **Biochem. Biophys. Acta**, vol. 1691, p. 181– 192, 2004.
- ARAÚJO, R. B. Aspectos ontogenéticos de *Liposarcus* sp da região de São José do Rio Preto, SP (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae). **Relatório para bolsa de Iniciação Científica** apresentada ao programa de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista; São José do Rio Preto, 1994.
- ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochem. and Physiol. Part C**, vol. 145, p. 282-287, 2007.

- ATLI, G.; ALPTEKIN, Ö.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochem. and Physiol. Part C: Toxicol. & Pharm.**, vol. 143, n. 2, p. 218-224, 2006.
- AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio**. 1ª edição, editora RiMa; São Carlos, 2003 e editora Inter Tox; São Paulo, 2003.
- BAINY, A. C. D.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P.; ALMEIDA, E. A. **Biotemas**, vol. 19, p. 35-39, 2006.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2ª edição, editora Bookman; Porto Alegre, 2002.
- BALDI, F. Microbial transformation of mercury species and their importance in the biogeochemical cycle of mercury. **Met. Ions Biol. Syst.**, vol. 34, p. 213-257, 1997.
- BERNARDES, J. Mangue de Cubatão apresenta índices elevados de mercúrio. **Ag. Usp de notícias**, São Paulo, 27 de agosto de 2002, n. 1035/02.
- BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. Grune & Straton, p. 342, 1975.
- BOENING, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, vol. 40, p. 1335-1351, 2000.
- BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. **Acumulação de Metais Tóxicos em Glândula Digestiva-Gônada de *Ampullaria canaliculata* (Gastrópoda: Prosobranchia) e Efeitos sobre a Delta-Aminolevulinato Desidratase**. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, 1989.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochem.**, vol. 72, p. 248-254, 1976.

- BROWN, P. R.; EDWARDS, J. O. Reaction of disulfides with mercuric ions. **Biochemistry**, vol. 8, p. 1200-1202, 1969.
- CANESI, L.; VIARENGO, A.; LEONZIO, C.; FILIPPELLI, M.; GALLO, G. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquatic Toxicol.**, vol. 46, p. 67-76, 1999.
- CASTILHOS, Z. C., PEREIRA DA SILVA, L. C. C.; ALMOSNY, N.; RODRIGUES-FILHO, S.; RODRIGUES, A. P. C. VILLAS-BÔAS, R.; VEIGA, M.; BEINHOFF, C. Parâmetros bioquímicos e hematológicos em peixes amazônicos de ecossistemas aquáticos e afetados por atividade de garimpo. **Comunicação Técnica elaborada para o VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia** – Florianópolis - SC. 17 a 20 de outubro de 2004.
- CHANG, L. W. **Toxicology of metals**. Editora Lewis Publishers; Boca Raton: CRC, 1996.
- COLLINSON, E. J.; GRANT, C. M. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. **J. Biol. Chem.**, vol. 278, p. 22492–22497, 2003.
- COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Med. Association J.**, vol. 50, p. 550-552, 1944
- COMMANDEUR, J. N. M; STIJNTJES, G. J.; VERMEULEN, N. P. E. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. **Pharmacol. Rev.**, vol 47, p. 271-330, 1995.
- COSTA-PIERCE, B. A. Rapid evolution of the established feral tilapia (*Oreochromis* spp.): the need to incorporate invasion science into regulatory structures. **Biol. Inv. Magazine**, vol. 5, p. 71-84, 2003.

- CRUZ, A. L.; LANGEANI, F. Comportamento reprodutivo do cascudo *Liposarcus anisitsi* (Eigenmann & Kennedy, 1903) (Ostariophysi: Loricariidae: Hypostominae) em cativeiro. **Comun. Mus. Cienc. Tecnol. PUCRS, Ser. Zool.**, vol. 13, p. 109-115, 2000.
- DEVI, M.; FINGERMAN, M. Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*, by mercury, cadmium, and lead. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, vol. 55, p. 746-750, 1995.
- EL-DEMERDASH, F. M. Effects of selenium and Mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver, and blood of rats. **J. Environ. Sci Health**, vol. 36B, p. 489-499, 2001.
- ELIA, A. C.; GALARINI, R.; TATICCHI, M. I.; DÖRR, A. J. M.; MANTILACCI, L. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicol. and Environ. Safety**, vol. 55, p. 162-167, 2003.
- ELLMAN, G.; COUTNEY, K.; ANDERS, V.; FEATHERSTONE, R. **Biochem. Pharmacol.**, vol. 7, p. 88-95, 1961.
- 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.**, vol. 1, n. 6, p. 529-539, 2001.
- FALCÓ, G.; LLOBET, J. M.; BOCIO, A.; DOMINGO, J. L. Daily Intake of Arsenic, Cadmium, Mercury and Lead by Consumption of Edible Marine Species. **J. of Ag. in the Food Chem.**, Catalônia, vol. 54, n. 16, p. 6106- 6112, 2006.
- FARINA, M.; BRANDÃO, R.; LARA, F. S.; SOARES, F. A. A.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. T. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver, kidney and brain. **Toxicol. Letters**, vol. 139, n. 20, p. 55-66, 2003.

- FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Sci. of the Total Environ.**, vol. 346, n. 1-3, p. 256-273, 2005.
- FIANDER, H.; SCHNEIDER, H. Compounds that induce isoforms of glutathione S-transferase with properties of a critical enzyme defense against oxidative stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, vol. 262, p. 591– 595, 1999.
- FRASCO, M. F.; COLLETIER, J. P.; WEIK, M.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L.; STOJAN, J.; FOURNIER, D. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. **The Febs J.**, vol. 274, p. 1849-1861, 2007.
- FRIBERG, L.; VOSTAL, J. **Mercury in the environment: an toxicological Appraisal.** Cleveland: CRC Press., Inc., 1972.
- GALLI, L. F.; TORLONI, C. E. C. **Criação de peixes.** Editora Nobel, 2ª edição; São Paulo, 1984.
- GARUTTI, V.; GARUTTI, M. L. F. Migração lateral de *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes, Loricariidae) no Rio Preto, Bacia do alto Paraná, Brasil. **Iheringia, Ser. Zool.**, vol. 88, p. 25-32, 2000.
- GIODA, C. R.; LISSNER, L. A.; PRETTO A.; ROCHA, J. B. T. DA; SCHETINGER M. R. C.; NETO, J. R; MORSCH, V. M; LORO, V. L. Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere**, vol. 69, p. 170–175, 2007.
- GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E., *et al.* Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American J. of Clinical Pathol.**, vol. 56, p. 35-39, 1971.
- GUILL, T. S.; TEWARI, H.; PANDE, J. **Comp. Biochem. Physiol**, vol. 100(C), p. 501-505, 1991.

GRAEME, A. K.; POLLACK, C.V. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. **The J. of Emergency Med.**, vol. 16, n. 1, p. 45-56, 1998.

WHEELOCK, C. E.; PHILLIPS, B. M.; ANDERSON, B. S.; MILLER, J. L.; MILLER, M. J.; HAMMOCK, B. D. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). **Reviews of Environ. Contam. and Toxicol.**, p. 117-178, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ª edição, editora Oxford; New York, 1999.

HAMMOND, D. P. Metals. In: HANENSON, I. B. (Ed.). **Quick ref. to clinical Toxicol.** Philadelphia, Toronto: J. B. Lippincott Co., p. 164-167, 1980.

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

HONG, Y. L.; YEH, S. L.; CHANG, C. Y.; HU, M. L. **Clin. Biochem.**, vol. 33, n. 8, p. 619-625, 2000.

HSDB – HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK. Mercury. In: TOMES CPS SYSTEM. **Toxicol., occupational med. and environ. series**. Englewood: Micromedex, 2000. CD-ROM.

HUANG, T. L.; OBIH, P. O.; JAISWAL, R.; HARTLEY, W. R.; THIYAGARAJAH, A. Evaluation of Liver and Brain Esterases in the Spotted Gar Fish (*Lepisosteus oculatus*) as Biomarkers of Effect in the Lower Mississippi River Basin. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, vol. 58, p. 688-695, 1997.

JORNAL DA UNICAMP. Disponível em:
<<http://www.unicamp.br/unicamp/unicamphoje/ju/fevereiro2005/ju278pag04.htm>>.
Acesso em 03 de junho de 2006.

- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. **J. Biol. Chem.**, vol. 244, p. 3714-3721, 1976.
- 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**. 7ª edição (trad.), editorial Médica Panamericana; Buenos Aires, 1986.
- KOJADINOVIC, J.; POTIER, M.; CORRE, M. L.; COSSON, R. P.; BUSTAMANTE, P. Mercury content in commercial pelagic fish and its risk assessment in the Western Indian Ocean. **Sci. of the Total Environ.**, vol. 366, n. 2-3, p. 688-700, 2006.
- KOPECKA, J.; LEHTONEN, K.K.; BAR`SIEN`E, J.; BROEG, K.; VUORINEN, P. J.; GERCKEN, J.; PEMPKOWIAK, J. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdańsk (southern Baltic). **Mar. Pollut. Bull.**, vol. 53, p. 406-421, 2006.
- KREIMER, D. I.; DOLGINOVA, E. A.; RAVES, M.; SUSSMAN, J. L.; SILMAN, I.; WEINER, L. A metastable state of *Torpedo californica* acetylcholinesterase generated by modification with organomercuriais. **Biochemistry**, vol. 33, p. 14407-14418, 1994.
- LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.**, vol. 37, p. 1921-1942, 2004.
- LUND, B. O.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, vol. 45, p. 2017-2024, 1993.
- MABILIA, R. G.; SOUZA, S. M. G. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Ramdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Sci. Biol. Sci.** Vol. 28, n. 2, p. 159-163, 2006.

- MACHREKI-AJMI, M.; KETATA, I.; LADHAR-CHAABOUNI, R.; HAMZA-CHAFFAI, A. The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. **Ecotoxicology**, vol. 17, p. 1–11, 2008.
- MAGOSSI, L. R.; BONACELLA, P. H. **Poluição das águas**. 2ª edição, editora Moderna; São Paulo, 2003.
- MANDUZIO, H.; MONSINJON, T.; GALAP, C.; LÉBOULENGER, F.; ROCHER, B. Seasonal variations in antioxidant defences in the blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. **Aquat. Toxicol.**, vol. 70, p. 83–93, 2004.
- MARTINS, M. L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, vol. 56, n. 5, p. 640-646, 2004.
- MILLER, J. M.; CHAFFIN, D. B.; SMITH, R. G. Subclinical psychomotor and neuromuscular changes in workers exposed to inorganic mercury. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, vol. 36, p. 725-733, 1975.
- NORSETH, T. The intracellular distribution of Mercury in rat liver after methoxymethylmercury intoxications. **Biochem. Pharm.**, vol. 16, p. 1645-1654, 1967.
- 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.**, vol. 58, p. 865-870, 1997.
- PATHIRATNE, A.; CHANDRASEKERA, L. W. H. U.; PATHIRATNE, K. A. S. Use of biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to assess the impacts of pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. **Environ. Monit. Asses.** doi: 10.1007/s 10661-008-0490-4, 2008.

- PEREIRA, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. **Motriz**, vol. 2, n. 2, p. 71-79, 1996.
- PINHEIRO, M. C. N.; GUIMARÃES, G. A.; NAKANISHI, J.; OIKAWA, T.; VIEIRA, J. L.; QUARESMA, M.; CARDOSO, B.; AMORAS, W. Total mercury in hair samples of inhabitants of Tapajós river, Pará State, Brazil. **Revista da Soc. Bras. de Med. Tropical**, vol. 33, n. 2, p. 181-184, 2000.
- POLUIÇÃO DAS ÁGUAS. Disponível em: <http://www.redeambiente.org.br/Temas.asp?id_secao=2&artigo=17>. Acesso em 21 de maio de 2006.
- POWER, A.; SHEEHAN, D. Seasonal variations in the antioxidant defense systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. **Comp. Biochem. Physiol., Part C Pharmacol. Toxicol.**, vol. 114, p. 99– 103, 1996.
- PRABHU, K. S.; REDDY, P. V.; GUMPRICHT, E.; HILDENBRANDT, G. R.; SCHOLZ, R. W.; SORDILLO, L. M.; REDDY, C. C. Microsomal glutathione S-transferase A1-1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver: molecular cloning, expression and characterization. **Biochem. J.**, vol. 360, p. 345– 354, 2001.
- QUEIROZ, I. R. **Determinação do metilmercúrio em peixes de região de garimpo**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 1995.
- RANK, J.; LEHTONEN, K. K.; STRAND, J.; LAURSEN, M. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. **Aquatic Toxicol.**, vol. 84, p. 50–61, 2007.
- RIBEIRO, C. A. O.; NETO, F. F.; MELA, M.; SILVA, P. H.; RANDI, M. A. F.; RABITTO, I. S.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environ. Research**, vol. 101, n. 1, p. 74-80, 2006.

- SABELAISH, S.; HILMI, G. Ocular manifestations of Mercury poisoning. In: WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Conference on intoxication due to alkylmercury-treated seed**. Geneve, WHO, p. 83-86, 1976.
- SALOMÃO, D.; MARTINS, A.; BURNS, M.; VIEIRA, J. P.; MONSERRAT, J. Determinação da atividade da enzima glutathione-s-transferase (GST) e da capacidade antioxidante total na ictiofauna, na avaliação de estresse ambiental do sistema de transição Patos-Mirim, RS. **Soc. de Ecol. do Brasil**. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, p.1-2, MG, 2007.
- SANTOS, E. **Pesca e piscicultura**. Editora Itatiaia Limitada; Belo Horizonte, 1977.
- SANZ, P.; REPETTO, M. Implicaciones toxicológicas de las enzimas colinesterasas. **In Toxicol. Avanzada** (Repetto M, ed), p. 117-145, 1995.
- SCHIEDEK, D.; BROEG, K.; BAR`SIEN`E, J.; LEHTONEN, K. K.; GERCKEN, J.; PFEIFER, S.; VUONTISJ`ARVI, H.; VUORINEN, P. J.; DEDONYTE, V.; KOEHLER, A.; BALK, L.; SCHNEIDER, R. Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the south-western Baltic Sea. **Mar. Pollut. Bull.**, vol. 53, p. 387-405, 2006.
- SHEEHAN, D., POWER, A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defense mechanisms in bivalve molluscs. **Comp. Biochem. Physiol., Part C Pharmacol. Toxicol.**, vol. 123, p. 193-199, 1999.
- SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, vol. 103, p. 287-290, 1979.
- SIKORSKI, R.; JUSZKIEWICZ, T.; PASZKOWSKI, T.; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T. Women in dental surgeries: reproductive hazards in occupational exposure to metallic mercury. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, vol. 59, n. 6, p. 551-557, 1987.

- SOLEO, L.; URBANO, M. L.; PETRERA, V.; AMBROSI, L. Effects of low exposure to inorganic Mercury on psychological performance. **Br. J. Ind. Med.**, vol. 47, n. 2, p. 105-109, 1990.
- STAMLER, C. J.; ABDELOUAHAB, N.; VANIER, C.; MERGLER, D.; CHAN, H. M. Relationship between platelet monoamine oxidase-B (MAO-B) activity and mercury exposure in fish consumers from the Lake St. Pierre region of Que., Canada. **NeuroToxicol.**, vol. 27, n. 3, p. 429-436, 2006.
- STEINBERG, N.; ROTH, E.; SILMAN, I. *Torpedo* acetylcholinesterase is inactivated by thiol reagents. **Biochem. Int.**, vol. 21, p. 1043-1050, 1990.
- STOHS, S. J.; BAGCHI. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal íons. **Free Radical Biol. & Med.**, vol. 18, n. 2, p. 321-336, 1994.
- TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars. Vet.**, vol. 14, n. 3, p. 254-263, 1998.
- TAVARES-DIAS, M. SCHALCH, S. H. C.; MARTINS, M. L. et. al. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britiski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scient**, vol. 21, p. 337-342, 1999.
- TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G.; MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. variáveis do Jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciêñ. Rural**, vol. 32, n. 4, p. 693-698, 2002.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Biosci. J.**, vol 19 (1), p. 107-114, 2003.
- TORRES, M. A.; NETO, P. C. Determinação do índice *redox* de glutaciona, um biomarcador de contaminação marinha em algas, utilizando HPLC acoplado a um detector eletroquímico *flow-through*. **Revista Analytica**, nº 30, p. 96-105, 2007.

- TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos vegetais. **Ciên. e Tecnol. de Alimentos**, vol. 24 (2), 2004.
- TOUNG, Y. P. S., HSIEH, T. S., TU, C. P. D. Drosophila glutathione S-transferase L-L shares a region of amino acid sequence homology with the maize glutathione S-transferase III. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 87, p. 31–35, 1990.
- UNEP CHEMICALS. Impacts of mercury on the environment. **Global mercury assessment**. UNEP, 2002, cap. 5. Disponível em: <http://www.chem.unep.ch/mercury/WGmeeting/revreport-Ch5.pdf>. Acesso em 11 de junho de 2007.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Review article. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. and Pharmacol.**, vol. 13, p. 57-149, 2003.
- VASSALLO, D. V.; MASSARONI, L.; OLIVEIRA, E. M.; ROSSONI, L. V.; AMARAL, S. M.; VASSALLO, P. F. Ações tóxicas agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. **Arq. Bras. de Cardiologia**, vol. 67, n. 1, 1996.
- VEAL, E. A., TOONE, W. M., JONES, N., MORGAN, B. A. Distinct roles for glutathione S-transferase in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. **J. Biol. Chem.**, vol. 277, p. 35523–35531, 2002.
- VERLECAR, X. N.; JENA, K. B.; CHAINY, G. B. B. Modulation of antioxidant defenses in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. **Chemosphere**, vol. 71, p. 1977-1985, 2008.
- VERLECAR, X. N.; JENA, K. B.; CHAINY, G. B. N. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. **Chemico-Biol. Interactions**, vol. 167, p. 219-226, 2007.

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

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Inorganic mercury. **Environ. Health Criteria**, n. 118. Geneva, 1991.

WILCZEK, G.; KRAMARZ, P.; BABCZYŃSKA, A. Activity of carboxylesterase and glutathione S-transferase in different life-stages of carabid beetle (*Poecilus cupreus*) exposed to toxic metal concentrations. **Comp. Biochem. and Physiol. Part C**, vol. 134, p. 501-512, 2003.

WINTROBE, M. M. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, vol. 51, p. 32-49, 1934.