

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

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

JOÃO VITOR DE QUEIROZ

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

BOTUCATU/SP

MARÇO DE 2017

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

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

JOÃO VITOR DE QUEIROZ
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

BOTUCATU/SP

MARÇO DE 2017

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

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

AUXÍLIOS FINANCEIROS

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

P&D: 6631-0001/2012

Contrato Jirau 004/13



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

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



CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Processo: FCT 270/11



CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Processo: 472388/2011-8



FUNDIBIO – Fundação do Instituto de Biociências



PROPG – Pró-Reitoria de Pós-Graduação



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

AGRADECIMENTOS

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

Sumário

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

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

CAPÍTULO I

Considerações Iniciais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Histórico do Mercúrio

O mercúrio, elemento químico de número atômico 80, de aparência metálica e brilhante, que ocorre em estado líquido a temperatura ambiente é facilmente volatilizado para a atmosfera em forma de vapores de mercúrio. Uma vez introduzido no ambiente, o Hg apresenta ciclo complexo composto da sua forma inorgânica: Elementar (Hg^0) metálico, principalmente encontrado como vapor, monovalente (Hg^+) forma pouco estável naturalmente e bivalente (Hg^{2+}). Também de forma orgânica como metilmercúrio (CH_3Hg) e dimetilmercúrio [$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$] (Ministério do Meio Ambiente, 2015).

O mercúrio (Hg) é um dos metais tóxicos mais estudados (Who, 1990), o qual apresenta propriedades mutagênicas (Manahan, 1994), caracterizado por possuir baixa pressão de vapor (0,16 Pa), sendo por isso facilmente volatilizado, em condições normais de temperatura e pressão, permitindo seu transporte a grandes distâncias (Manahan, 1994; Lindberg, 1998). O mercúrio pode ser considerado um elemento de referência nas alterações do ambiente pela ação humana.

Esse elemento apresenta maior risco a saúde humana, principalmente quando inalado na forma de vapor ou ingerido em sua forma metilada, denominada metilmercúrio. Sua capacidade tóxica é muito conhecida devido aos acidentes ocorridos em Minamata/Japão entre 1950 e 1960, e no Iraque em 1970. Esse metal possui capacidades deletérias evidentes, pois causa danos irreversíveis ao sistema nervoso central, podendo atingir áreas do cerebelo ligadas as funções sensoriais, auditivas, visuais e motoras. Em casos de contaminação extrema, pode levar a morte. Tratando especificamente da população ribeirinha, a ingestão de alimento contendo elementos organomercuriais, principalmente o metilmercúrio, representa maior risco de contaminação, enquanto o vapor desse metal se difunde rapidamente através das barreiras placentárias e hemoencefálicas (Komyo et al., 1993).

Podendo bioacumular no corpo de forma direta ou indireta, através da cadeia trófica alimentar, existem três formas principais deste elemento que merecem atenção. São elas: mercúrio elementar, orgânico e inorgânico. Todas essas formas químicas podem sofrer transformações no meio ambiente. (Harrison; De Mora, 1996). Assim como o mercúrio, outros metais potencialmente tóxicos, não exercem nenhuma função metabólica nos organismos, pelo contrário, ainda podem se tornar precursores de graves doenças. Resíduos industriais contendo estes elementos lançados sem tratamento no solo, ar ou água, podem ser absorvidos pelos vegetais e animais, bioacumulando-se ao longo da cadeia alimentar (Mohn, 1990).

As cadeias alimentares podem amplificar as concentrações de Hg e nestas, os maiores valores são encontrados nos organismos predadores (topo das cadeias tróficas). Este fenômeno é muito melhor documentado em sistemas aquáticos. Para se ter uma visão amplificada de como funciona o ambiente aquático, na maioria das vezes basta estudar os peixes, já que eles normalmente ocupam o topo da cadeia alimentar desse sistema. Dois fatores principais estão relacionados com a alta concentração de mercúrio em peixes: A contaminação desse ecossistema (Olivero; Solano, 1998) e as particularidades na alimentação de cada espécie (Campbell et al., 2003).

Conforme estudos feitos (Ikigura; Akagi, 1999), sedimentos contaminados exercem maior influência na contaminação dos peixes. Quando o metal está presente na forma de metil mercúrio, a acumulação aumenta significativamente (Ulrich et al, 2001).

Os peixes são considerados uma das maiores e melhores fontes proteicas do mundo, justamente por serem encontrados em praticamente todo o mundo. Por esse motivo é utilizado de forma abundante na dieta humana. Um estudo realizado com o intuito de determinar os teores de Hg total no pescado, mostrou que 34,8% dos peixes analisados apresentou níveis de mercúrio acima de 200 ng g⁻¹ (peso úmido) (Embrapa, 2004), sendo que o valor máximo permitido estabelecido pela OMS é de 500,0 ng g⁻¹ Hg (peso úmido).

O uso do mercúrio (Hg) no processo de amalgamação utilizado na mineração de ouro e prata foi particularmente significativo durante o período colonial na América espanhola e posteriormente na América do Norte, até o início do século passado. Estima-se que este processo de separação tenha emitido para o ambiente mais de 200.000 toneladas de Hg de 1540 até 1900 na América espanhola colonial e cerca de 60.000 toneladas na América do Norte nos séculos XVIII e XIX. Durante grande parte deste período, toda a produção de Hg das principais minas (Almadén, Espanha e Huancavelica, Peru) foi destinada a mineração de prata e ouro (Nriagu, 1994; Lacerda & Salomons, 1998). A exaustão dos principais depósitos metalíferos superficiais e a introdução do método de cianetação na separação do ouro contribuíram para a redução do uso da técnica de amalgamação na exploração desses metais. Porém, na década de 1970, devido a crescente valorização do ouro no mercado internacional e a piora na condição econômico social no mundo em desenvolvimento, esta técnica retornou, em particular nos países da Ásia tropical e América Latina.

Na bacia Amazônica em particular, esta técnica representa uma opção simples, barata e confiável para produção de ouro, pronta a ser usada por uma população crescente e carente de trabalho formal na maioria dos países em desenvolvimento da região (Lacerda et al., 1995). A emissão anual de Hg para o ambiente da bacia da Amazônia, proveniente desta atividade, na década de 1980,

pode ter alcançado cerca de 200 toneladas, sendo o Brasil, a Bolívia, a Venezuela, a Guiana e a Colômbia os maiores emissores (Lacerda, 1997).

A bacia superior do Rio Madeira foi a segunda mais importante região produtora de ouro de garimpo na Amazônia durante as duas últimas décadas do século passado. A corrida do ouro no Rio Madeira iniciou em 1975 como uma atividade individual, não mecanizada, principalmente em bancos e margens do rio, durante a estação seca. Este processo foi rapidamente seguido pela introdução de balsas, operadas em conjunto com mergulhadores, seguida da introdução de grandes dragas mecânicas, capazes de trabalhar a grandes profundidades. A atividade atingiu seu máximo durante a década de 80, quando da liberação da Reserva Garimpeira do Rio Madeira, que delimitou o setor do rio entre Porto Velho e a Vila de Abunã para a atividade garimpeira e foi regulamentada pelas Portarias MME 1345/79 e 1034/80. Em 1985, cerca de 800 dragas e 700 balsas operavam no setor do rio entre Porto Velho e Guajará Mirim, na fronteira com a Bolívia. A produção total dessa operação garimpeira atingiu cerca de 9,4 toneladas anuais, resultando em emissão anual estimada de Hg em cerca de 12 toneladas. Entre 1979 e 1990 estima-se que cerca de 87 toneladas de Hg foram emitidas para o ambiente, sendo cerca de 65% emitida para a atmosfera e o restante perdido sob forma de Hg metálico na calha do próprio rio (Lacerda et al., 1989).

Uma vez que a deposição da maior parte do Hg atmosférico originado em garimpos na Amazônia ocorre entre 40 a 60 km da fonte (Lacerda et al., 2004), é provável que a maior parte deste Hg tenha sido depositado em solos da região ao longo do Rio Madeira. Embora a atividade na porção brasileira do Rio Madeira tenha decrescido significativamente, na porção boliviana esta atividade tem apresentado crescimento substancial, sendo responsável pela emissão anual de 0,25 a 0,5 toneladas, contribuindo diretamente para porção brasileira da bacia (Maurice-Bourgoin et al., 2000).

Uma avaliação da contaminação potencial dos recursos da bacia superior do Rio Madeira e sua população depende, não só de determinações precisas de Hg nos compartimentos ambientais, mas, principalmente, de um conhecimento razoável da biogeoquímica de seus ecossistemas, em particular dos processos

biogeoquímicas que controlam a biodisponibilidade deste metal. Este aspecto é de fundamental importância, uma vez que a quantidade de Hg já depositada nos ecossistemas Amazônicos, que inclui, inclusive, o Hg das operações da mineração espanhola, durante os séculos 17 e 18, pode, sob certas circunstâncias, ser remobilizada para os ciclos ecológicos. A aceleração nas mudanças do uso da terra pela agropecuária e a dragagem anual que ocorre em alguns pontos da Hidrovia do Rio Madeira, pode acelerar processos de remobilização do Hg presente em solos e sedimentos fluviais respectivamente, enquanto que características particulares de alguns ambientes da Amazônia podem criar condições ideais para a metilação do Hg (CH_3Hg^+), forma química mais tóxica, e de rápida acumulação através da cadeia alimentar (Lacerda et al., 2004).

Formas do Mercúrio

Mercúrio Metálico

Conhecido também como mercúrio elementar (Hg^0), essa forma é utilizada principalmente pelas indústrias, sendo empregado na fabricação de termômetros, amálgama dentário, purificação de ouro no garimpo e outros produtos domésticos. O mercúrio metálico apresenta baixa absorção cutânea e ingestiva; no entanto, sua alta capacidade de volatilização a temperatura ambiente pode formar uma nuvem de vapor de mercúrio que é facilmente absorvida através dos pulmões. Essa forma lipossolúvel do mercúrio é capaz de atravessar as barreiras biológicas (hematoencefálica, placentária e membranas), sofrer oxidação em uma reação que envolve a enzima catalase e o peróxido de hidrogênio e se transformar em Hg^{2+} . Essa forma inorgânica do mercúrio tem a capacidade de permanecer por anos nos tecidos corporais e até mesmo no cérebro, confirmando a sua capacidade de bioacumulação (Hargreaves et al., 1988; Takeuchi et al., 1989; Braunwald et al., 2001).

Mercúrio Inorgânico

Além de ser formado a partir do mercúrio metálico (Hg^0), o mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) é proveniente da conversão de formas orgânicas do mercúrio a formas inorgânicas (Hg^{2+} e Hg^+) (Wood et al., 1968). Ele também é utilizado na indústria de cosméticos e produtos de limpeza (Ozuah, 2000). Essa forma de mercúrio tem maior facilidade em ser absorvida por ingestão ou de forma cutânea (Clarkson, 2002). No entanto, o mercúrio inorgânico que consegue adentrar as membranas biológicas ou até mesmo a barreira encefálica, de alguma forma é excretado pela urina e/ou fezes (Takeuchi et al., 1989). Por esse motivo, a forma inorgânica do mercúrio tem o meio extracelular e as membranas celulares como principais sítios de toxicidade (Friberg e Mottet, 1989).

Mercúrio Orgânico

Resultado da metilação do mercúrio metálico liberado pela indústria principalmente nos rios e córregos, a principal forma orgânica do mercúrio encontrada na natureza é o metilmercúrio (MeHg).

O mercúrio metálico pode ser biometilado por bactérias metalogênicas em um processo de reações químicas: Presente no meio ambiente, o mercúrio elementar é facilmente absorvido por bactérias e organismos unicelulares, sendo então ionizado como explicado acima. Entretanto, essas bactérias procuram uma forma de eliminar o mercúrio iônico, pois ele é prejudicial a elas. É a forma com que essas bactérias excretam esse mercúrio se dá pela metilação, transformando-o em MeHg . Essa forma extremamente lipossolúvel é facilmente eliminada por organismos unicelulares (Wasserman et al., 2001). A metilação do mercúrio se dá pela transferência de um ou dois grupos metilcarboânions (CH_3^-) ao mercúrio inorgânico, e a vitamina B12 (metilcobalamina), um derivado do metilcorrinóide, a única coenzima reconhecida como possível doadora do grupo metil para o Hg^{2+} (Wood, 1974). Outra forma de mercúrio orgânico é o etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$), o qual está presente no timerosal (Mertiolate®), medicamento de uso tópico utilizado como antisséptico (Braunwald et al., 2001), cuja comercialização foi banida. O dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), uma forma “supertóxica” de Hg

encontrada quase que exclusivamente em laboratório, que é absorvido facilmente através da pele. No entanto, as formas orgânicas de mercúrio não têm boa absorção cutânea, sendo melhores absorvidas por inalação e ingestão (Braunwald et al., 2001).

Ciclo Hidrobiogeoquímico do Mercúrio

O interesse no entendimento do ciclo hidrobiogeoquímico do mercúrio na Amazônia acontece devido a elevada toxicidade do metilmercúrio (MeHg) para o humanos e animais, seu acúmulo na biota e sua biomagnificação na cadeia alimentar aquática (Rocha et al., 2000). O conhecimento do processo de organificação do mercúrio no ambiente é necessário para predizer o impacto potencial desse elemento, bem como avaliar a qualidade de vida da população. O ciclo biogeoquímico do mercúrio é caracterizado pelas várias rotas que este composto pode seguir no ambiente, tendo destaque sua liberação do solo e água para a atmosfera, seu transporte nesta, seguido da deposição atmosférica das espécies mercuriais para a água e o solo. Quando em contato com solo ou sedimento, pode ocorrer absorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/desmetilação. O ciclo é completado pelas rotas de precipitação, bioconversão em formas voláteis ou solúveis, reintegração deste na atmosfera ou bioacumulação na cadeia alimentar aquática ou terrestre (Lechler et al., 1997).

A distribuição do mercúrio nos sedimentos está relacionada com o conteúdo de carbono orgânico, argila, ferro, fósforo, potencial redox e enxofre, dentre outros. Os agentes orgânicos complexantes solúveis em água, tais como humatos e fulvatos, podem complexar as espécies solúveis e insolúveis na água; os últimos precipitam-se diretamente da solução para o sedimento. Os solos possuem elevada capacidade de reter e armazenar mercúrio, devido ao forte acoplamento deste com o carbono presente. Os solos argilosos apresentam aparentemente grande capacidade de reter mercúrio, podendo acumulá-lo por muitos anos.

O processo de metilação do mercúrio tem merecido especial atenção em reservatórios naturais e artificiais devido a elevada toxicidade e bioacumulação desta forma orgânica na biota. A bioacumulação ocorre preferencialmente em áreas de remanso, lagos marginais e reservatórios artificiais devido a formação de

microambientes críticos, que podem funcionar como reatores naturais, maximizando o processo de metilação do mercúrio ou solubilizando outras substâncias tóxicas (Fadini; Jardim, 2001). A Figura 1 mostra a inter-relação entre os sistemas atmosféricos, aquáticos e terrestres do ciclo biogeoquímico do mercúrio.

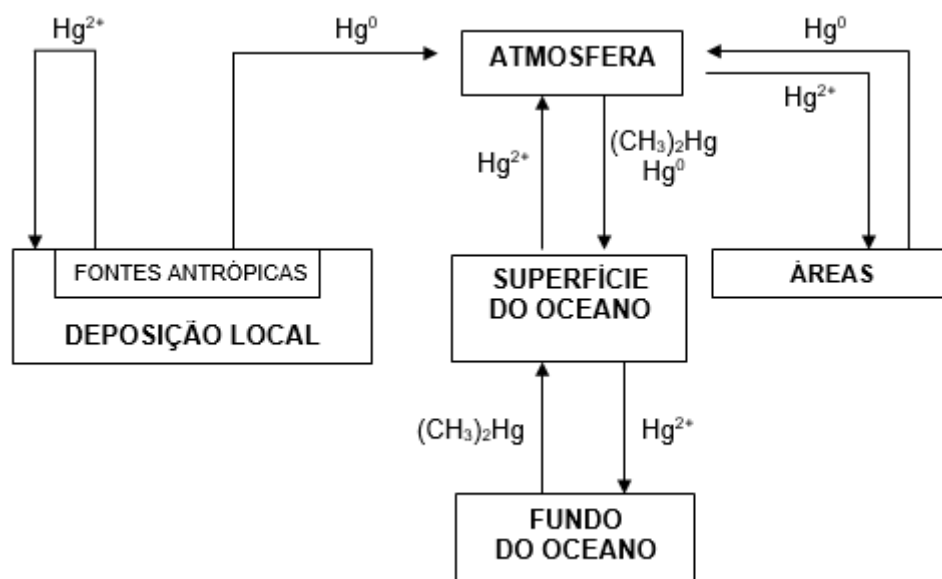


Figura 1. Ciclo hidrobiogeoquímico do mercúrio (Lechler et al., 1997).

Processos naturais podem contribuir para emissões de Hg, tais como ressuspensão de partículas do solo por meio dos ventos, emanções vulcânicas, queimadas e através do solo e águas superficiais. As mudanças climáticas também podem disponibilizar o Hg contido em rochas, entretanto, a atividade humana tem contribuído muito para o aumento dos níveis globais de Hg, situação que é extremamente preocupante. Todavia, mesmo o mecanismo de deposição do Hg através da atmosfera seja de grande importância e algumas vezes responsável pela contaminação em regiões remotas e distantes de indústrias, deve-se levar em consideração o ciclo biogeoquímico do Hg em solos e ambientes aquáticos.

O Hg liberado na atmosfera por fontes naturais ou antrópicas na forma de Hg^0 sofre oxidação na interface sólido-líquido (neblina, gotículas de chuva) e por meio de reações mediadas pelo ozônio e raios ultravioletas torna-se Hg^{2+} . Este retorna ao ambiente aquático e terrestre carregado pela água da chuva ou adsorvido

a pequenas partículas. O cátion mercúrio também pode se originar do rompimento da ligação carbono-mercúrio de compostos organomercuriais, por meio de processos químicos ou biológicos. No ambiente aquático, o Hg^{2+} é adsorvido preferencialmente na superfície dos sedimentos, ácidos húmicos, material particulado e argilas por processos de co-precipitação e interações de superfície, podendo formar grande quantidade de complexos e quelantes com o material orgânico. Nas camadas superiores do sedimento, que são biologicamente ativas, o Hg^{2+} é, em parte, metilado por bactérias, incluindo as sulfato redutoras, transformando-se em metilmercúrio e depois a etilmercúrio na interface água-sedimento e também, no perifiton das macrófitas aquáticas. O MeHg é rapidamente absorvido pelos organismos marinhos e desta forma bioacumulado e biomagnificado ao longo da cadeia trófica. Logo, os organismos de topo de cadeia apresentarão as maiores concentrações de Hg total e MeHg. Em menor extensão, o MeHg é também demetilado a Hg^{2+} e posteriormente reduzido a Hg^0 , retornando a atmosfera. Na figura 1 estão ilustradas as diferentes origens do Hg (Lebel, et al., 1998; Passos, 2002).

Como resultado de emissões antrópicas, a taxa de deposição atmosférica de Hg é aproximadamente três vezes maior do que no tempo pré-industrial e tem aumentado nas proximidades das regiões industrializadas. Companhias termoeletricas movidas a carvão, indústrias de processamento de metais, de incineração de lixo, lâmpadas fluorescentes, produção de baterias, de cloro, indústria de mineração e esgotos e outros resíduos são as principais fontes de contaminação de Hg causadas pelo próprio homem. Dadas as características alarmantes do quadro descrito, na maioria dos países as emissões de Hg de origem antrópica tiveram queda significativa em virtude do controle mais rígido exercido pelos órgãos governamentais, embora ainda se verifiquem concentrações elevadas deste elemento em muitas partes do mundo. Algumas são principalmente devidas a fontes locais, notadamente à extração de ouro em pequena escala na América do Sul, África e Ásia. Mas como poluente “transfronteiriço” que é, o Hg pode igualmente ser transportado a nível global para regiões distantes da sua fonte. Isso significa que alguma poluição de caráter local, vista à curto prazo, poderá se juntar à reserva global a longo prazo. Tal fato teve também como resultado, a

contaminação de regiões com poucas ou nenhuma fontes de Hg, como o Ártico (Wasserman, 2001).

Emissão e Deposição de Mercúrio na Bacia do Rio Madeira

A amalgamação do ouro é um método de baixa eficiência, ou seja, é necessária uma quantidade de mercúrio muito alta para que se consiga o ouro. O fator de emissão médio de Hg, calculado por Pfeiffer & Lacerda (1988) para esta atividade na década de 80 na bacia do Rio Madeira, era de aproximadamente 1,3 kg de Hg por 1,0 kg de ouro produzido. Cerca de 55% a 65% da emissão total ocorre para a atmosfera, principalmente durante a queima do amálgama de Hg-Au (mercúrio-ouro) no próprio garimpo e durante a purificação do ouro em casas compradoras. Cerca de 35% a 45% do Hg liberado é emitido diretamente para rios, solos e drenagens. As emissões na queima do amálgama são principalmente de vapor de Hg^0 (Hg metálico), enquanto que no processo de purificação do ouro, uma fração também é emitida na forma particulada, possivelmente das espécies Hg^{2+} e Hg^0 (Marins et al., 1991; Marins & Tonietto, 1995).

Estas emissões resultam em concentrações elevadas, em diversas regiões garimpeiras, e na própria cidade de Porto Velho (Tabela 1), que atingiram valores semelhantes aqueles verificados em ambientes industriais, como da produção de soda, por exemplo, e até 4 ordens de grandeza superiores aos valores esperados para atmosfera não contaminada. Atualmente, estas emissões foram significativamente reduzidas, em função da diminuição da atividade de mineração de ouro, na região, pela exaustão dos depósitos mais facilmente minerados e aumento do custo do mercúrio, obrigando os garimpeiros a utilizarem retortas (destilador de Hg) possibilitando sua reutilização e da grande desvalorização do ouro na Bolsa Mercantil de Futuros à partir do programa econômico do Governo Fernando Collor de Mello.

A tabela 1 apresenta as concentrações de Hg medidas em amostras de ar atmosférico de diferentes localidades na região do Rio Madeira durante as décadas de 1980 e 1990 e em 2002, após a diminuição do comércio de ouro local.

Tabela 1 - Concentrações de Hg em amostras de ar ao longo do Rio Madeira e em casas compradoras de ouro na cidade de Porto Velho.

Local	Fonte	Hg ($\mu\text{g m}^{-3}$)	Autor
Porto Velho	Próximo a casas comercializadoras	0.1 – 3.2	Pfeiffer et al., (1989)
Porto Velho	Próximo a casas comercializadoras	0.45 – 7.5	Malm et al., (1991)
Rio Madeira	Dragas	10.0 – 296.0	Malm et al., (1991)
Porto Velho	Casas comercializadoras desativadas	0.04 – 0.09	Bastos et al., (2004)

Adaptado de Bastos et al., 2004

A tabela 1 apresenta os dados de concentrações elevadas de Hg na atmosfera da região durante o auge da atividade garimpeira, bem como a significativa diminuição após esse período. Entretanto, em estabelecimentos comerciais, ainda são encontradas concentrações relativamente elevadas de Hg (Bastos et al., 2004), o que justifica a necessidade de continuação do monitoramento, mesmo no período atual, de baixa atividade garimpeira.

O domínio da emissão atmosférica resulta em taxas de deposição relativamente elevadas, tipicamente de 40 até 200 $\mu\text{gHg m}^{-2} \text{ ano}^{-1}$ próximo a locais de garimpo (Lacerda & Salomons, 1998). Como resultado, a contaminação de solos por Hg é comum. A reemissão de Hg de solos contaminados e de rejeitos de garimpo pode variar de 50 até 1.500 $\mu\text{gHg m}^{-2} \text{ ano}^{-1}$ (Tumpling et al., 1995), muito mais elevada que em áreas mineralizadas contendo depósitos de cinábrio (minério de mercúrio), podendo alcançar até 60 $\mu\text{gHg m}^{-2} \text{ ano}^{-1}$ (Rasmussen, 1994). Estas taxas, porém, são semelhantes aquelas medidas no ar sobre minas de Hg, como em Almadén, Espanha, onde a reemissão pode alcançar valores bem mais altos, de até 2.600 $\mu\text{gHg m}^{-2} \text{ ano}^{-1}$ (Ferrara & Maserti, 1994).

Métodos de Detecção de Mercúrio

A tabela 2 expõe de forma resumida alguns dos métodos mais utilizados para detecção de mercúrio, levando em consideração a evolução, a aplicabilidade, bem como as vantagens econômicas e a sensibilidade dos mesmos.

Tabela 2 – Métodos conhecidos para quantificação de mercúrio e seus limites de detecção.

Métodos	Limites de Detecção
Método Colorimétrico	0,01 - 0,1 µg/g
Espectrometria de Absorção atômica	
Forno de grafite (GFAAS)	1 ng/g
Vapor frio (CVAAS)	0,01 - 1 ng/g
Espectrometria de Fluorescência Atômica	
Geração de Vapor Frio (CVAFS)	0,001 - 0,01 ng/g
Análise por ativação com Nêutrons	
Instrumental (INAA)	1 - 10 ng/g
Radioquímica (RNAA)	0,01 - 1 ng/g
Cromatografia gasosa	
Detector de Captura Eletrônica	0,01 - 0,05 ng/g
Detector de Emissão Atômica	~ 0,05 ng/g
Espectrometria de Massa	0,1 ng/g
CVAAS / CVAFS	0,01 - 0,05 ng/g
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	

	Detector de Ultra-Violeta	1 ng/mL
	CVAAS	0,5 ng/mL
	CVAFS	0,08 ng/mL
	Eletroquímico	0,1 - 1 ng/mL
Plasma Indutivamente Acoplado		
	Espectrometria de Massa (ICP-MS)	0,01 ng/mL
	Espectrometria de Emissão Atômica (ICP-OES)	0,01 ng/mL
Espectrometria Foto-Acústica		0,05 ng
Fluorescência de Raio-X		5 ng/g - 1 µg/g
Métodos Eletroquímicos		0,1 - 1 µg/g
Analisador de Filme de Ouro		0,05 µg/g

Adaptado de Barcelos, 2015

Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite

A Espectrometria de Absorção Atômica tem como fundamento a quantidade de radiação absorvida dos átomos fundamentais no estado neutro do elemento que é estudado, que são gerados no nebulizador-queimador. Esta absorção é proporcional à população de átomos no estado fundamental, e que por sua vez são proporcionais à concentração da solução distribuída na chama. A quantidade absorvida é medida pela diferença entre o sinal transmitido na presença e ausência do elemento a ser determinado (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).



Figura 2. Espectrômetro de Absorção Atômica

Na primeira década, após a introdução em 1970, a Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS) era descrita como uma técnica muito sensível, porém de difícil uso devido a inúmeras interferências. Esta situação começou a mudar quando, em 1980, Slavin introduziu o conceito STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace). Este conceito tem como principais pontos a atomização da amostra via plataforma de L'vov, medida da absorbância integrada ao invés da altura do pico, o uso de modificadores químicos e um eficiente sistema de correção de fundo. Mais tarde, o uso de tubos com aquecimento transversal substituindo os atomizadores longitudinais, foi acrescentado ao conceito, resultando, assim, em condições de atomização essencialmente isotérmicas. A obediência plena do conceito STPF resultou em elevado grau de liberdade de interferências mesmo quando na presença de matrizes complexas, tornando a técnica bem consolidada na década de noventa. Recentemente, a introdução da Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS AAS), permitindo uma maior eficiência no controle das interferências espectrais, vem trazer uma nova “roupagem da GF AAS”. Os conceitos bem estabelecidos em conjunto com as inovações surgidas permitem afirmar que GFAAS atualmente é a técnica mais robusta para a determinação de elementos traço na presença de elevadas concentrações de matriz (Welz, 2008).

Nas determinações por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, a amostra é introduzida por uma micropipeta ou amostrador automático no tubo de grafite por meio de um orifício no tubo. A amostra pode ser injetada no tubo, caindo diretamente em sua parede ou sobre uma plataforma de L'vov presente na parte inferior do tubo. Dentre as diferentes configurações de tubos de grafite, a THGA (Transversely Heated Graphite Atomizer) é uma das mais utilizadas, pois permite uma distribuição uniforme da temperatura ao longo do tubo de grafite, reduzindo eventuais condensações nas extremidades do tubo, o que diminuiria a sensibilidade. A GFAAS (figura 2) permite a utilização de um programa de aquecimento, pré-definido, que submete a amostra injetada no tubo de grafite a diferentes ciclos de temperatura e tempo. As cinco etapas básicas de aquecimento do tubo são (Bougle et al., 2004):

SECAGEM: etapa de eliminação do solvente, que é evaporado lentamente da amostra para evitar respingos e consequente perda do analito, restando apenas os resíduos sólidos.

PIRÓLISE: nesta etapa a temperatura e o tempo de pirólise devem ser ajustados para remoção da maior parte da matriz orgânica da amostra, reduzindo a interferência química e o sinal de fundo. Geralmente modificadores químicos são utilizados para estabilizar o analito a temperaturas mais altas, garantindo a eliminação da matriz sem perda do analito.

ATOMIZAÇÃO: etapa em que a temperatura deve ser alta o suficiente para garantir a completa e rápida atomização do analito, formando a nuvem atômica para a consequente medida da radiação absorvida pelo analito no estado fundamental.

LIMPEZA: etapa para eliminar qualquer resíduo que possa ter ficado no tubo e posteriores efeitos de memória, onde as temperaturas são elevadas a 2400-2550 °C por um curto período de tempo.

RESFRIAMENTO: retorna a temperatura ambiente para introdução de uma nova amostra.

Durante todo o programa de aquecimento, um fluxo externo de argônio (gás inerte) passa ao redor do tubo protegendo-o do excessivo desgaste devido as elevadas temperaturas e o contato com o oxigênio atmosférico. Ao mesmo tempo,

um fluxo interno de argônio – exceto na etapa de atomização – auxilia na eliminação do ar e vapores formados a partir da volatilização das amostras.

Uma grande vantagem da espectrometria de absorção atômica em forno de grafite consiste na análise direta de amostras sólidas e/ou suspensões, eliminando a etapa de digestão ácida, o que reduz o tempo de análise, custo e contaminação, além de minimizar, consideravelmente, a exposição do analista a manipulação de ácidos concentrados. Além disso, a GFAAS apresenta outras vantagens devido a sua versatilidade, como: ação do atomizador como reator químico; obtenção de excelentes limites de detecção; separação do analito da matriz no reator; utilização de pequenos volumes de amostra; caráter multielementar; rapidez; espectro simples; etc (Krug, 2004).

Entretanto, apesar de ser uma técnica bem desenvolvida e robusta, a susceptibilidade a efeitos de matriz, que pode diminuir a sensibilidade ou provocar excessivo desgaste do tubo, limita uma aplicação mais ampla desta técnica em análises de rotina. Além dos erros sistemáticos e aleatórios que podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados e o desempenho do método analítico em questão. Porém, estando todos os parâmetros instrumentais devidamente otimizados e se o método STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace) for adotado, o desempenho analítico da técnica pode ser melhorado. O conceito STPF consiste no uso de tubos de grafite com aquecimento transversal, recoberto piroliticamente e com plataforma; uso de modificadores químicos; aquecimento rápido; fluxo de gás interno interrompido durante a atomização; sinal analítico em absorbância integrada; rápido processamento do sinal e corretor de fundo eficiente (Zeeman) (Yoshikawa et al., 2004).

Os erros resultantes de alterações nas variáveis instrumentais e/ou operacionais podem ser reduzidos por meio da padronização interna em GFAAS, minimizando erros sistemáticos e corrigindo efeitos de matriz. Os métodos de adição de padrão e compatibilização de matriz são bem estabelecidos e conhecidos; porém, a adição de padrão demanda muito tempo nas determinações quando comparada com a calibração externa e compatibilização de matriz requer diluentes de elevada pureza e de composição química similar a matriz, o que é de difícil obtenção. Sendo assim, a padronização interna é uma alternativa para esses

dois métodos de calibração, onde os cálculos são feitos baseados na suposição de que tanto o analito quanto o padrão interno apresentam influência similar a da matriz e que ambos são perturbados da mesma forma pelas condições instrumentais ou operacionais (Underwood et al., 1999).

Espectrometria de Massas

A Espectrometria de massa tem se tornado uma ferramenta essencial na química moderna, graças a sua sensibilidade, e grande número de informações fornecidas. Os espectrômetros de massa podem ser usados em uma simples determinação da massa molar de um peptídeo, como até para determinação da sequência de aminoácidos, identificação de novos biomarcadores, interações proteína-proteína e caracterização de modificações pós-traducionais (Poth et al., 2008).

Os espectrômetros de massa consistem em uma fonte de íons, um analisador de massa, um detector de íons e uma unidade de aquisição de dados. Trata-se de um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), utilizando campos eletromagnéticos para isso. As técnicas de ionização mais usadas em análises de proteínas são: a MALDI (ionização por desorção a laser assistida por matriz) e a ESI (ionização por electrospray), que é empregada na elucidação da sequência peptídica e identificação da proteína correspondente (Giron et al., 2011).

No presente trabalho, a técnica utilizada foi a ESI-MS por apresentar alta sensibilidade e seletividade, facilidade de uso e consumo reduzido de amostra, além de poder analisar uma ampla variedade de substâncias, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, e até mesmo complexos metálicos, desde que sejam iônicos ou apresentem sítios ácidos ou básicos (Mamone, 2003).

No processo electrospray a produção de íons requer a dispersão de gotas altamente carregadas, quase a pressão atmosférica, seguida por condições que permitam a evaporação da gota. Envolve a formação de um spray eletrolítico, que gera pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons, sendo necessária uma fonte de alta tensão (1,0 a 7,0 kV) que esteja em contato com a solução

contendo os eletrolíticos. Esta solução é bombeada por meio de um microcapilar (d.i. 50 a 100 μm) com velocidade de fluxo da ordem de 1 a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ ou menores. Quando um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastarem para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletródo. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o eletródo aumenta provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar. A gota ganha forma de cone e permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. Como resultado final, os íons tornam-se completamente dessolvatados. Pode-se presumir que a ESI envolve apenas o rompimento gradual de interações não covalentes, principalmente a remoção de moléculas de solventes (Giron, 2011).

Esta versatilidade de técnicas tem aumentado significativamente a gama de substâncias capazes de serem determinadas, possibilitando, por exemplo, que polipeptídios possam ser analisados sem que haja sua decomposição (Picariello, 2008). Na etapa de preparo da amostra para o sequenciamento por espectrometria de massas, utiliza-se a digestão proteolítica, etapa crítica onde são gerados os peptídeos com massas molares dentro da faixa de massas dos espectrômetros, sendo essencial a fragmentação feita de maneira eficiente. A tripsina é o reagente mais utilizado nos experimentos de sequenciamento por espectrometria de massas por ter um custo de produção relativamente baixo, possuir alta atividade proteolítica, produzir peptídeos pequenos (na faixa de 600 a 2500 Da) e poder ser covalentemente modificada, de modo a minimizar os processos de autodigestão ou autólise (Picariello, 2008). A tripsina cliva as ligações peptídicas de proteínas após os grupos carbonila dos resíduos de lisina (K) e arginina (R), exceto quando estas ligações são com resíduos de prolina (P), ou seja, ligações K-P ou R-P (Mamone, 2003).

Existem dois tipos de digestão proteolítica: em gel ou em solução. A digestão em gel é assim chamada porque a proteína é processada e digerida enquanto está contida em um spot de gel de poliacrilamida. Já a digestão em solução é aplicada em proteínas ou mistura de proteínas que estão presentes na solução do extrato

proteico sem a utilização da separação eletroforética (Picariello, 2008). Na maioria das aplicações proteômicas, a digestão é feita mais adequadamente pelo tratamento da proteína em um spot de gel 2D-PAGE. Ao utilizar a digestão em gel, é possível estabelecer relação direta entre as observações feitas pelos experimentos eletroforéticos e os peptídeos digeridos (Poth, 2008). Para a análise por espectrometria de massas, a mistura de peptídeos obtida pela digestão tríplica é misturada com solução de matriz. Esta matriz é utilizada para proteger os peptídeos de uma possível fragmentação, causada pela incidência direta do feixe do laser (Mamone, 2003).

Espécies Estudadas

Família *Arapaimatidae*

Essa família é caracterizada pela presença de língua óssea, ausência de barbelas mandibulares e por apresentar de 7 a 11 raios branquiostegais. Existem apenas dois gêneros com uma espécie cada: *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829), com ocorrência na África, e *Arapaima gigas*, na América do Sul (Castelo, 2008).

Pirarucu



Figura 3. *Arapaima gigas*, conhecido popularmente como pirarucu.

O *Arapaima gigas*, conhecido no Brasil como Pirarucu (figura 3) é considerado um dos maiores peixes de água doce do mundo. Já foram encontrados

em habitat natural exemplares pesando mais de 125 kg (Goulding, 1980). Essa espécie apresenta potencial para atingir até 200 kg e medir de 2 a 3 metros de comprimento (Saint-Paul, 1986).

O pirarucu é uma espécie de peixe muito apreciada e com grande aceitação de mercado regional e nacional. É explorado na Amazônia desde o século XVIII (Veríssimo, 1895), tendo sido na região uma das espécies mais comercializadas durante a segunda metade do século XIX (Mérona, 1993; Santos, 2005).

A partir da década de 1970 estudos citam a espécie como importante nos desembarques pesqueiros e comercialização em mercados dos principais centros urbanos da Amazônia brasileira (Veríssimo, 1895; Menezes, 1951). Alguns destes estudos avaliaram os tamanhos dos pirarucus, com base em informações indiretas como por exemplo: dados de desembarque e comercialização, medidas de línguas e mantas, e indicaram que a espécie encontrou-se sobrexplorada em diversas partes da bacia amazônica. Uma das formas em se tentar conter a exploração descontrolada do pirarucu foi por meio da implementação de medidas restritivas adotadas pelo Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), estipulando tamanhos mínimos de captura, período de defeso reprodutivo, além de permitir as capturas apenas em áreas provenientes de manejo ou produzidas em cativeiro. No entanto, mesmo havendo medidas de proteção, a pesca do pirarucu está colocando em risco a sobrevivência da espécie, pois é praticada de forma predatória. A intensidade da pesca, determinada pelo alto valor comercial, tem estimulado a captura de exemplares jovens que ainda não atingiram a maturidade sexual, prejudicando assim os estoques naturais (Saint-Paul, 1986).

Família *Serrasalminidae*

Os peixes da família *Serrasalminidae* geralmente são habitantes de águas lentas e ocorrem tipicamente em lagos e nas planícies alagadas, embora haja diversas espécies de pacus especializadas na ocupação de ambientes de corredeiras na Amazônia. Ocorrem naturalmente apenas na região Neotropical, mas sabe-se da presença dessas espécies em outros locais do mundo como resultado da introdução intencional ou acidental (Cáleta et al., 2011). A ocorrência do tambaqui fora da

bacia Amazônica em outras áreas da América do Sul também resulta de introdução para fins de piscicultura, devido ao seu alto valor comercial (Jégu, 2003).

Os pacus são consumidores vorazes de frutos e sementes nas florestas alagáveis de várzea (rios de águas brancas) e de igapós (águas pretas e claras), e acredita-se que tenham papel muito importante na dispersão de sementes de diversas espécies de árvores da floresta ripária. Certas espécies de piranhas, como a piranha-preta *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1766), também consomem grande quantidade de frutos e sementes durante a cheia dos rios; entretanto, diferentemente dos pacus, essas piranhas mastigam completamente a maior parte das sementes ingeridas, o que inviabiliza a sua germinação e o processo de dispersão pela ictiofauna (Goulding, 1980; Nico & Taphorn, 1988).

Alguns representantes dessa família são importantes para a pesca comercial e de subsistência no estado de Rondônia como tambaqui, pirapitinga, pacus (especialmente do gênero *Mylossoma*) e piranhas.

Piranha Preta



Figura 4. *Serrasalmus rhombeus*, conhecido popularmente como piranha preta.

A espécie *Serrasalmus rhombeus*, conhecida popularmente como Piranha Preta (figura 4), teve seu nome originalmente descrito como *Salmo rhombeus*. Os exemplares dessa espécie podem atingir comprimento máximo de 41,5 cm e pesar

até 4 kg. Sua distribuição vai desde a bacia dos rios Amazonas e Orinoco, rios do norte do escudo da Guiana até os rios costeiros do nordeste do Brasil. No rio Madeira, está distribuído em todas as áreas (Hubert et al., 2007).

Como característica da espécie, apresenta margem distal da nadadeira caudal escura, formando uma faixa vertical negra, corpo relativamente largo e presença de manchas escuras arredondadas de tamanho variado sobre a porção médio lateral do corpo em indivíduos com até 20 cm de comprimento. Em peixes maiores essas manchas vão desaparecendo e passando a um colorido escuro uniforme (que varia do marrom escuro até arroxeadado) em indivíduos acima de 30 cm de comprimento. Essa também é a espécie mais bem-sucedida em reservatórios artificiais ou de hidrelétricas na Amazônia (Santos et al., 2006).

Sendo assim, o capítulo II, intitulado “Mercury determination in muscle and liver tissue samples from Brazilian Amazon fish using slurry sampling” apresenta artigo submetido para publicação em revista científica *Environmental Science and Pollution Research*, que descreve nova metodologia para determinação de mercúrio em tecido biológico utilizando amostragem em suspensão. O capítulo III, intitulado “Aplicação da metalômica no fracionamento de mercúrio em amostras de pirarucu e piranha preta coletados no rio madeira/bacia amazônica” se apresenta nas normas da Omics International, com o objetivo de estabelecer metodologia para fracionamento de proteínas de amostras de tecido muscular e hepático de *Arapaima gigas* e *Serrasalmus rhombeus* para posterior estudo metaloproteômico. E, por fim, o capítulo IV apresenta as implicações do trabalho desenvolvido.

Referências Bibliográficas

- AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO, Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F. J. P.; PFEIFFER, W. C.; KATO H. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, Brasil, v. 175, p. 85-95, 1995.
- BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ZARA, L. F.; ROCHA, J. C.; SANTOS A. Programa de Monitoramento Hidro biogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. Brasil: Tectebel Energia, 2009.
- BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. A contaminação por mercúrio na bacia do rio Madeira: uma breve revisão. **Geochimica Brasiliensis**, Brasil, v. 18, p. 99-114, 2004.
- BOUGLE, D. L.; SABATIER, J. P.; GUAYDIER-SOUQUIERES, G.; GUILLON-METZ, F.; LAROCHE, D.; JAUZAC, P. Zinc status and bone mineralization in adolescent girls. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, United States, v. 18, p. 17-21, 2004.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/segurancaquimica/mercurio>>. Acessado em: 12 jun. 2016.
- BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L., LONGO, D. L.; JAMESON, J. L. **Harrison's principles of internal medicine**. United States, McGraw-Hill, 2001. p. 467–469.
- CÁLETA, M.; TUTMAN, P.; BUJ, I.; ZANELLA, D.; MUSTAFIC, P.; MARCIC, Z.; MRAKOVIC, M.; DULCIC, J. How was a Pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Serrasalminae) introduced in Croatian freshwaters? **Cybium**, India, v. 35, n. 3, p. 259–261, 2011.
- CAMPBELL, L. M.; OSANO, O.; HECKY, R. E.; DIXON, D. G. Mercury in fish from three rift valley lakes (Turkana, Naivasha and Baringo), Kenya, East Africa. **Environmental Pollution**, London, v. 125, n. 2, p. 281-286, 2003.
- CARDOSO, R. S.; FREITAS, C. E. C. A pesca de pequena escala no rio Madeira pelos desembarques ocorridos em Manicoré (Estado do Amazonas), Brasil. **Acta Amazônica**, Brasil, v. 38, p. 781-788, 2008.
- CASTELLO, L. Lateral migration of *Arapaima gigas* in floodplains of the Amazon. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 17, p. 38-46, 2008.
- CÁUPER, G. C. B. Ictiofauna. In: BIODIVERSIDADE Amazônica: Flora Amazônica. Manaus: Centro Cultural dos Povos da Amazônia, v. 2, p. 82, 2006.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise Instrumental. **Editora Interciência**. Rio de Janeiro, v. 1, p. 145 – 150.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**, London, v. 110, p. 11–23, 2002. Supplement 1.

DOLBEC, J.; MERGLER, D.; LARRIBE, F.; ROULET, M.; LEBEL, J.; LUCOTTE, M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. **Science of the Total Environment**, Brazil, v. 271, p. 87-97, 2001.

EMBRAPA. Níveis de mercúrio na carne de peixes como indicadores de contaminação do Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2004. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM076.pdf>> Acesso: 10 jul. 2016.

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the Negro river basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **The Science of the Total Environment**, Brazil, v. 275, n. 1/3, p. 71-82, 2001.

FERRARA, R.; MASERTI, B. E. Mercury degassing rate in some mediterranean areas. In: INTERNATIONAL CONFERENCE MERCURY AS A GLOBAL POLLUTANT, 2., 1994, Whistler. **Water, Air and Soil Pollution**, Spain, v. 93, p. 59 – 66, 1997.

FRIBERG, L.; MOTTET, N. K. Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. **Biological Trace Element Research**, Italy, v. 21, p. 201–206, 1989.

GIRON, P.; DAYON, L.; SANCHEZ, J. Cysteine tagging for MS-based proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, Chile, v. 30, p. 366-395, 2011.

GOULDING, M. **The fishes and the forest: explorations in amazonian natural history**. Berkeley: University of California. 1980. 280 p.

HARGREAVES, R. J.; EVANS, J. G.; JANOTA, I.; MAGOS, L.; CAVANAGH, J. B. Persistent mercury in nerve cells 16 years after metallic mercury poisoning. **Neuropathology Applies Neurobiology**, Belgium, v. 14, p. 443–452, 1988.

HARRISON, R. M.; DE MORA, S. J. **Introductory chemistry for the environmental science**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. (Cambridge Environmental Chemistry Series, 7).

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; RIVERA, R.; BONHOMMES, F.; RENNO, J-F. 2007b. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. **Molecular Ecology**, Colombia, v. 16, p. 2488-250, 2007.

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

JÉGU, M.. Subfamily serrasalminae. IN: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (Ed.). **Checklist of freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 182-196.

KOMYO, E; OYANAGI, S.; ITAI, Y.; TOKUNAGA, H.; TAKIZAWA, Y.; SUDA, I. (1993) Pathological Findings on a Fetal type of Minamata Disease. In: Inter. Symp. **Assessment of Environmental Pollution and Health Effects from Methylmercury**. Kumamoto. Proccedings, 242 p. colocar no modelo de trabalho apresentado em evento

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de absorção atômica parte 1: fundamentos e atomização com chama. Pirassununga: ESALQ, 2004. 40 p.

LACERDA, L. D.; SALOMONS, W. **Mercury from gold and silver mining: a chemical time bomb**. Berlin: Springer Verlag, 1998. 146 p.

LACERDA, L. D. Amazon mercury emissions. **Nature**, Brazil, v. 374, p. 20-21, 1995.

LACERDA, L. D. Global emissions of mercury from gold and silver mining. **Wat. Air Soil Pollution.**, Brazil, v. 97, p. 209-221, 1997.

LACERDA, L. D.; PFEIFFER, W. C.; OTT, A. T.; SILVEIRA, E. G. Mercury contamination in the Madeira River, Amazon - Hg inputs to the environment. **Biotropica**, Brazil, v. 21, p. 91-93, 1989.

LACERDA, L. D.; SOUZA, M.; RIBEIRO, M. G. The effects of land use change on mercury distribution in soils of Alta Floresta, Southern Amazon. **Environmental Pollution.**, Brazil, v. 129, p. 247-255, 2004.

LECHLER, P. L.; MILLER, J.; WARWICK, J.; LYONS, B. Mercury concentrations in channel bed sediments floodplain sediments, and lateric soils of the Madeira river basin, Brazil: Implications for anthropogenic versus natural sources. **EOS, Transactions, American Geophysical Union**, United States, v. 78, p. 846, 1997.

LINDBERG, S. E. Introduction: the fourth international conference on mercury global pollutant. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 12, p. 807-808, 1998.

MALM, O.; CASTRO, M. B.; BASTOS, W. R.; BRANCHES, F. J. P.; GUIMARÃES, J. R. D.; ZUFFO, C. E.; PFEIFFER, W. C. An assessment of Hg pollution in different goldmining areas, Amazon Brazil. **The Science of the Total Environment**, Brazil, v. 175, n. 2, p. 127-140, 1995.

MAMONE, G.; CAIRA, S.; GARRO, G.; NICOLAI, A.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, G.; MALORNI, A.; CHIANESE, L.; ADDEO, F. Casein phosphoproteome: identification of phosphoproteins by combined mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, United States, v. 24, n. 16, p. 2824-2837, 2003.

MANAHAN, S. **Environmental chemistry**. 6. ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 811 p.

MARINS, R. V.; TONIETTO, G. An evaluation of the sampling and measurements techniques of mercury in the air. In: 5th Brazilian Geochemical Congress, Niterói, Analytical Geochemistry Section, 1:1-4. 1995

MARINS, R. V.; IMBASSAY, J. A.; PFEIFFER, W. C.; BASTOS, W. R. Contaminação atmosférica de mercúrio em área produtora de ouro no distrito de Poconé, Mato Grosso, MT. In: I Inter. Simp. Environm. Studies Tropical Forest. Manaus, 1:199-203, 1991.

MAURICE-BOURGOIN, L.; QUIROGA, I.; CHINCHEROS, J.; COURAU, P. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira River and mercury exposure in riparian Amazonian populations. **Science of the Total Environment**, Brazil, v. 260, n. 73-86, 2000.

MENEZES, R. S. Notas biológicas e econômicas sobre o pirarucu. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, p. 152 (Série de Estudos Técnicos, 3), 1951.

MERONA, B. Pesca e ecologia dos recursos aquáticos na Amazônia. In: FURTADO, L.; LEITÃO, W.; FIUZA, A. (Org). **Povos das águas: realidade e perspectivas na amazônia**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993. p. 159-186.

MOHN, W. W.; MARTIN, V. J. J. E.; YU, Z. T. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 40, p. 273, 1999.

NICO, L. G.; TAPHORN, D. C. Food habits of piranhas in the Low Llanos of Venezuela. **Biotropica**, v. 20, n. 4, p. 311-321, 1988.

NRIAGU, J. O. Mercury pollution from the past mining of gold and silver in the Americas. **Science of the Total Environment**, v. 119, p. 177-182, 1994.

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

OZUAH P. O. Mercury poisoning. **Current Problem Pediatric**, United States, v. 30, p. 91-99, 2000.

PARENTE, V. M. A economia da pesca em Manaus: Organização da produção e da comercialização. p. 178, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

PFFEIFER, W. C.; LACERDA, L. D. Mercury inputs to the Amazon region, Brazil. **Environmental. Technology Letters**, Brazil, v. 9, p. 325-350, 1988.

PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; MAMONE, G.; ROEPSTORFF; ADDEO, F. Identification of N-linked glycoproteins in human milk by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. **Proteomics**, Italy, v. 8, p. 3833-3847, 2008.

POTH, A. G.; DEETH, H. C.; ALEWOOD, P. F.; HOLLAND, J. W. Analysis of the human casein phosphoproteome by 2-D electrophoresis and MALDI-TOF/TOF MS reveals new phosphoforms. **Journal of Proteome Research**, Australia, v. 7, p. 5017-5027, 2008.

QUEIROZ, L. J.; VILARA, G. T.; OHARA, W. M.; PIRES, T. H. S.; ZUANON, J.; DORIA, C. R. C. **Peixes do Rio Madeira**. Brasil, 2013. v. 1.

RASMUSSEN, P. E. Current methods of estimating atmospheric mercury fluxes in remote areas. **Environmental Science & Technology**, United Kingdom, v. 28, p. 2233-2241, 1994.

ROCHA, J. C.; SARGENTINI JUNIOR, É.; ZARA, L. F.; ROSA, A. H.; SANTOS, A.; BURBA, P. Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro): a possible process of the mercury cycle in Brazil. **Talanta**, Brazil, v. 53, n. 3, p. 551-559, 2000.

SAINT-PAUL, U. Potencial for Aquaculture of South American Freshwater Fishes: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 54, p. 205-240, 1986.

SANTOS, G. M.; SANTOS, A. C. M. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. **Estudos Avançados**, Brazil, v. 19, n. 54, p. 165- 182, 2005. Dossiê Amazônia Brasileira II.

TAKEUCHI, T.; ETO, K.; TOKUNAGA, H. Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty-six years. **Neurotoxicology**, Netherlands, v. 10, p. 651-657, 1989.

TUMPLING, W. V.; WILKEN, R. D.; EINAX, J. Mercury contamination in the northern Pantanal region, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Geochemical Exploration**, Mato Grosso, v. 52, p. 127-134, 1995.

ULRICH, S. M.; TANTON, T. W.; ABDRAHITOVA, S. A. Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 31, n. 3, p. 241-293, 2001.

UNDERWOOD, E. **Trace elements in human and animal nutrition**. 4th. ed. New York: Academic Press, 1977.

VERÍSSIMO, J. A pesca na Amazônia. Rio de Janeiro: Livraria Clássica Francisco Alves, 1895. 206 p.

WASSERMAN, J. C.; HACON, S. S.; WASSERMAN, M. A. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. **Mundo e Vida**, Brazil, v. 2, p. 1-2, 2001.

WHO. Environmental Health Criteria 101: Methylmercury. Geneva: United Nations Environment Program; International Labour Organization, 1990.

WOOD, J. M. Biological cycles for toxic elements in the environment. **Science**, Canada, v. 183, p. 1049-1053, 1974.

WOOD, J. M.; KENNEDY, F. S.; ROSEN, C. E. Synthesis on methylmercury compounds by extracts of methanogenic bacterium. **Nature, Cidade**, v. 220 173-174, 1968.

YOSHIKAWA, Y.; UEDA, E.; KOJIMA, Y.; SAKURAI, H. The action mechanism of zinc(II) complexes with insulinomimetic activity in rat adipocytes. **Life Sciences**, Japan, v. 75, p. 741-751, 2004.

LEBEL, J.; MERGLER, D.; BRANCHES, F.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; LARRIBE, F.; DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian basin. **Environmental Research**, Canada, v. 79, p. 20-32, 1998.

PASSOS, C. J. S. Exposition humaine au mercure et régime alimentaire en Amazonie brésilienne: une recherche participative. 2002. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais)-Université du Québec à Montréal, Montréal, 2002.

WASSERMAN, J. C.; HACON, S.; WASSERMAN, M. A. O Ciclo do mercúrio no Ambiente Amazônico. **Revista Mundo e Vida**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 46-53, 2001.

CAPÍTULO II

**Mercury determination in muscle and liver tissue samples from Brazilian Amazon
fish using slurry sampling**

**João Vitor de Queiroz¹, José Cavalcante S. Vieira¹, Alis Correia Bittarello²,
Camila Pereira Braga¹, Isabela Federici Padilha³, Cilene C. F. Padilha², Grasieli
de Oliveira² Pedro M. Padilha^{1,2}**

**¹UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, Botucatu, SP, Brazil**

**²UNESP - Instituto de Biociências - Departamento de Química e Bioquímica,
Botucatu, SP, Brazil**

**³UNESP - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Departamento de
Química e Ciências Ambientais, São José do Rio Preto, SP, Brazil**

Corresponding Author. Pedro de Magalhães Padilha

E-mail address: padilha@ibb.unesp.br

Abstract

This paper presents a simple, fast and sensitive method to determine mercury in muscle and liver tissue samples of fish from the Brazilian Amazon by GFAAS through the direct introduction of sample slurries into the spectrometer's graphite tube. The samples of muscle and/or liver tissues were lyophilized and macerated using a mortar and pestle in the presence of liquid nitrogen. After this treatment, it was possible to obtain particles with a diameter of 60 μm . The slurry samples were prepared by mixing 20 mg of tissue (muscle and/or liver) with 1 mL of a solution containing 0.05 % v/v Triton X-100, 0.50 % v/v suprapur HNO_3 and 100 mg L^{-1} zirconium directly in the spectrometer's automatic sampling glass. Mercury standard solutions with concentrations ranging between 0.25 and 2.00 $\mu\text{g L}^{-1}$ were prepared under the same conditions as the slurry samples and used to generate the analytical curve. After sonicating the slurry samples and/or mercury standard solutions for 20 seconds, 20 μL was injected into the graphite tube, whose internal wall was lined with a tungsten carbide film that acted as a permanent chemical modifier. Under these conditions, it was possible to obtain thermal stabilization of the mercury up to an atomization temperature of 1700 $^{\circ}\text{C}$ in the GFAAS assay. The proposed method was validated by mercury determination in slurries of fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4. The calculated limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) in relation to DORM-4 and DOLT-4 were on the order of 0.014 - 0.0016 mg kg^{-1} and 0.045 - 0.0051 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively.

Keywords: Mercury in fish, slurry samples, GFAAS, chemical modifier, Amazon fish.

1. Introduction

Several studies developed in the last two decades have highlighted high mercury concentrations in certain Amazonian fish. In general, all of these papers point to bioaccumulation along the trophic chain as being responsible for the high mercury content in Amazonian fish. As the algae and aquatic plants of the Amazonian rivers have higher mercury concentrations than the concentrations found in the waters of these rivers, the fish that feed exclusively on these algae and plants have higher mercury concentrations. This phenomenon is enhanced for predatory fish, which have mercury concentrations one million times higher than the water of the rivers (Moraes et al., 2012; Braga et al., 2015; Vieira et al., 2015).

The significant increase in the concentration of mercury in fish of greater longevity may be related to the fact that mercury has a low rate of elimination by the organism. That is, as the organism grows older, the mercury concentrations increase steadily, and the organisms that have greater longevity have higher concentrations. Another aspect to consider is that as we move up the food chain, not only the concentration of mercury but also the conversion rate into methylmercury increases. For instance, an adult carnivorous fish can present more than 90% of the mercury in the methylated form, while this value in the river water does not exceed 2% (Lebel et al., 1998; Amorim et al., 2000).

Therefore, in summary, mercury that has entered into aquatic ecosystems participates in the biogeochemical cycles mediated by microorganisms, which will be chemically transformed, bioaccumulated and biomagnified in the trophic chain. Thus, predatory fish, which accumulate high levels of mercury, can act as vehicles of this

chemical to its consumers, such as reptiles, birds and human beings (Rodrigues Bastos et al., 2005).

Thus, the consumption of fish can pose a risk to the health of the riverine population of the Brazilian Amazon region. Therefore, monitoring programs of mercury concentrations in fish consumed in the Amazon region are essential. New methodologies for mercury determination in fish tissue samples will contribute to the control of mercury concentration in fish from the Amazon region (Moraes et al., 2012; Braga et al., 2015; Vieira et al., 2015).

In this context, the determination of metallic analytes in slurries by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) is a robust technique. This technique has several advantages, such as high sensitivity, extremely low detection limits, small sample volumes, and determination of a wide variety of trace elements, including volatile elements such as mercury, and it can be thermally stabilized by the use of an appropriate chemical modifier. Considering also that the atomizer can act as a chemical reactor, the possibility of solid sampling presents some advantages over conventional digestion procedures. Aside from eliminating the stage of total decomposition of the sample, it diminishes the sample preparation time, decreases analyte loss due to excessive manipulation or retention on insoluble products, and reduces the possibility of sample contamination (SILVA et al., 2006; Loureiro et al., 2007; Silva et al., 2007). These advantages are important in determining elements such as mercury.

From the view point of the discussion above, this paper describes the development of a method to determine mercury in muscle and liver tissue samples of fish from the Brazilian Amazon by GFAAS using slurry sampling.

2. Material and methods

2.1. Reagents, standard solutions and samples

High-purity deionized water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtained with an Elga Ionic system (PURELAB Option, USA), suprapur nitric acid (Merck), hydrogen peroxide (Merck) and Triton X-100 (Merck) were used throughout this work. A solution containing tungsten, which was employed to coat the inside of the graphite tube and was used as a permanent modifier, was prepared by diluting a stock solution containing 1000 mg L^{-1} sodium tungstate (Merck) with ultrapure water. A 1000 mg L^{-1} zirconium standard solution (Fluka) was also employed as a chemical modifier.

A mercury standard solution (Merck) was used in the preparation of standard solutions for the analytical curve. The remaining solutions utilized, including concentrated acid solutions used for mineralizing the samples, were of analytical grade. All bottles for storing samples and standard solutions, glassware and containers of the atomic absorption spectrometer's autosampler were immersed in 10% v/v nitric acid for 24 h, rinsed with ultrapure water and dried before being used.

The muscle and liver tissue samples (approximately ten grams) were lyophilized, and then approximately two grams of each sample (muscle or liver) was macerated using a mortar and pestle. This procedure yielded particles with a size of approximately $60 \mu\text{m}$. Then, one part of the lyophilized and ground tissue was used for the sample preparation, and the other part was mineralized in an ultrasonic cold water bath according to the procedure described by Moraes et al., (2013) (Moraes et al., 2013).

2.2. Preparation of slurry samples

The slurry samples were prepared by transferring 20 mg of muscle and liver tissue samples directly to the autosampler cups of the spectrometer, to which 1 mL of a solution containing 0.05 % v/v Triton X-100, 0.50 % v/v suprapur HNO and 100 mg L⁻¹ zirconium were added. The slurry samples of muscle and/or liver tissues were then sonicated for 60 s directly in the autosampler cups of the spectrometer (SILVA et al., 2006).

2.3. Apparatus

For the mercury determinations, a SHIMADZU AA-6800 atomic absorption spectrometer equipped with background absorption correction with a self-reverse (SR) system, a pyrolytic graphite tube with an integrated platform and an ASC-6100 autosampler was used. Argon was used as the inert gas, and the flow rate was kept constant at 1 L min⁻¹ throughout the heating program except in the atomization stage, when the gas flow was interrupted. The absorbance signals were measured for the peaks. The inner walls of the pyrolytic graphite tubes with integrated platforms used in the mercury analyses were coated with tungsten. For this purpose, 25 µL aliquots of 1000 mg L⁻¹ sodium tungstate modifier solution were injected into the atomizer, which was then subjected to the program described by Silva et al., (2007) (Silva et al., 2007).

The slurries of muscle and liver tissue samples, as well as the slurries of fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4, were shaken in a Unique ultrasonic cell disruptor.

All samples of biological tissues (muscle and liver) and biologically certified materials (DORMA-4 and DOLT-4) were lyophilized using a CHRIST –ALPHA, model 2-4 LD *plus* equipment.

A UNIQUE ULTRASONIC CLEANER, model USC1800A, was used in the mineralization of the samples of biological tissues and biological certified materials.

2.4. Preparation of the analytical curve

The analytical curve was prepared using a stock standard solution of mercury (Merck). The mercury standards were prepared using the autosampler. Aliquots of 5, 10, 25, 50 and 100 μL of a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ mercury standard solution were combined with 5 μL of suprapur HNO_3 , 5 μL of 10 % (v/v) Triton X-100, 100 μL of 1000 mg L^{-1} zirconium standard solutions and sufficient ultrapure water to bring the final volume of the solutions to 1000 μL . The concentrations of the mercury standard solutions ranged between 0.10 to 2.00 $\mu\text{g L}^{-1}$. These solutions were then injected into the spectrometer's graphite tube coated with tungsten carbide using the micropipette autosampler. The absorbance measurements were performed in triplicate, and the graphite tube's heating program, optimized for mercury analysis, is described in Table 1.

2.5. Analytical procedures

After the sonication step of the slurry samples and/or mercury aqueous standard solutions directly in the autosampler cups of the spectrometer, a volume of 20 μL of the standard or sample was injected into the graphite tube (coated internally with tungsten carbide) using the autosampler's micropipette. Each measurement was repeated three

times. Table 1 describes the heating program of the graphite tube, which was optimized for mercury determination.

Table 1. Graphite furnace heating program optimized for mercury determination from slurries of tissue samples (muscle and liver), slurries of certified reference materials (DORM-4 and DOLT-4), and mercury aqueous standard solutions.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the graphite furnace heating program

Obtaining exact and reproducible analytical results in the determination of metals and/or metalloids by GFAAS using slurry samples depends on the optimization of the pyrolysis temperatures. It is important to eliminate concomitant samples and atomization of the analyte. Therefore, pyrolysis and atomization curves were obtained to determine these parameters for mercury using slurries of fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4 under the conditions described in the *Preparation of slurry samples* section. Fig. 1. (curves a, b, c and d) illustrates the influence of the pyrolysis and atomization temperatures on the absorbance signal obtained for mercury in the standard slurries of the reference materials (DORM-4 and DOLT-4).

Fig. 1. Pyrolysis and atomization temperature optimized for thermal stabilization of mercury in slurries of fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4.

A pyrolysis temperature of 900 °C was selected because as shown in Fig. 1. (curves a and b), the absorbance signals obtained for mercury remained constant in the range 400-900 °C, declining rapidly after reaching 900 °C. For the atomization temperature (Fig. 1., curves a and d), the absorbance signals obtained for mercury were constant from 1400 °C to 1800 °C for both standard slurries; thus, the atomization temperature of 1700 °C was selected for all of the remaining experiments.

The analyte absorbance signals (AA) and background absorbance (BG) are also important parameters in the analysis of slurry sampling. Thus, Fig. 2. (curve a, b and c) depicts the analyte absorbance (AA) and background absorbance (BG) signals for the standard slurries of reference materials.

Fig. 2. Transient atomic absorption (AA) and background (BG) signals obtained for mercury atomization in slurries of fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4.

The curves show a relatively low background absorbance, indicating the efficiency of zirconium (co-injected chemical modifier) and tungsten carbide (permanent chemical modifier) in the thermal stabilization of mercury in the stages of pyrolysis and atomization. In the stages of pyrolysis and atomization, Hg(II) ions should form intermetallic bonds first with zirconium during the reduction process for the elemental state and subsequently with the tungsten carbide film deposited on the graphite tube platform, which cause a significant increase in the mercury volatilization temperature. It is then possible to thermally stabilize mercury at an atomization temperature of 1700 °C.

3.2. Attainment of the analytical curve

Based on the parameters of pyrolysis and atomization temperature and the profile of the optimized atomic absorption signal and using the calibration system by matrix matching, the analytical curve was plotted using aqueous standard solutions of mercury in the concentration range of 0.10 to 2.00 $\mu\text{g L}^{-1}$, as described above in the *Preparation of the analytical curve*. The analytical curve for mercury corresponded to the equation $C_{(\text{Hg})} = \text{Ab.} - 0.00324/0.0832$, which gave r (linear correlation coefficient) = 0.9986. Under the experimental conditions used, the analytical curve allowed for the calculations of the characteristic mass (m_0), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) as described by Currie (1999). Thus, the characteristic mass calculated for 0.50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of mercury standard was 1.10 pg, and the limits of detection ($\text{LOD} = 3r/\text{slope}$) and quantification ($\text{LOQ} = 10r/\text{slope}$) were 18 and 61 ng L^{-1} mercury, respectively.

3.3. Application of the proposed method

After the procedures of optimization and LOD and LOQ determination, the applicability of the developed method was applied in the mercury determination of slurries of tissue samples (muscle and liver) of the pirarucu (*Arapaima gigas*) and piranha preta (*Serrasalmus rhombeus*), from the Brazilian Amazon region: The analytical results obtained in these determinations are listed in Table 2.

Table 2. Results obtained in the determination of total mercury in muscle and liver tissue samples from Brazilian Amazon fish.

The mercury concentrations determined for these fish species, in the case of muscle tissue samples, are below 0.500 mg kg^{-1} , i.e., the maximum value permitted by the World Health Organization (WHO) (FAO/WHO, 2004). However, the concentrations of mercury in hepatic samples are above the value recommended by the WHO, which are approximately ten times higher when compared to the concentrations determined for muscle tissue samples. These results are in agreement with other works in the literature, which highlight greater accumulation of toxic metals (such as mercury) in the liver than in fish muscle (Moraes et al., 2013; Braga et al., 2015; Vieira et al., 2015). The accuracy of the method was assessed using the fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4. The mercury concentrations determined for DORM-4 and DOLT-4 ($n = 6$), as shown in Table 2, were approximately 1.50 % lower than the certified values (determined values - 0.404 ± 0.006 and $2.54 \pm 0.04 \text{ mg kg}^{-1}$; certified values - 0.410 ± 0.055 and 2.54 ± 0.04 , respectively, for DORM-4 and DOLT-4), which showed excellent accuracy of the proposed method. The precision of the method (repeatability and reproducibility) was evaluated by the relative standard deviation obtained in the mercury concentrations determined for DORM-4 and DOLT-4. Here, the HORRAT value was used (Mcclure & Lee, 2003), which was calculated by dividing the RSDR obtained collaboratively by the PRSDR calculated from the HORWITZ equation (Horwitz and Albert, 1997). Thus, the values of RSDR were 3.71% and 1.72% and the PRSDR values were 1.90 and 0.90, respectively, for DORM-4 and DOLT-4. Using this calculation strategy, the accuracies of the method were 1.95 and 1.91 in relation to the DORM-4 and DOLT-4 certified standards, respectively. The LOD and LOQ values also calculated using 20 mg DORM-4 and/or DOLT-4 were 0.016 and 0.051 mg kg^{-1} and 0.014 and 0.045 mg kg^{-1} . It can be observed that the results presented in relation to the muscular

and hepatic tissue samples of fish from the Amazon region (Table 2) were all above the determined LOQ for the proposed method, thus indicating the viability of the slurry sampling method in the mercury determination of biological samples. The results obtained by the proposed method were checked against those of samples mineralized in an ultrasonic water bath according to the procedure described by Moraes et al., (2013) (Moraes et al., 2013). The results are also listed in Table 2 and showed no significant difference at a 95% confidence level (paired t-test). In addition, the proposed method presented superior analytical speed when compared with other methods in the literature but with comparable LOD and LOQ and life of the graphite tube (483 firings) (Bermejo-Barrera et al., 1994, 1999; Gallignani et al., 1998; Moraes et al., 2013; Moreda-Piñeiro et al., 2002; Zhang and Adeloju, 2012).

4. Conclusions

The proposed method for mercury determinations using slurry sampling yielded results equivalent to those obtained with the GFAAS quantification method, in which the initial step involved sample mineralization in an ultrasonic water bath. The main advantage of the proposed method is that it does not require mineralization of the samples; this considerably reduces the time spent on analytical determinations of mercury in tissue samples of fish. In addition, it offers limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) on the order of $0.014 - 0.016 \text{ mg kg}^{-1}$ and $0.045 - 0.051 \text{ mg kg}^{-1}$, respectively, using only $20 \mu\text{L}$ of the slurry samples for each analytical determination. The proposed method can thus be used to monitor the levels of mercury in fish tissue samples, considering the low

limits of detection and quantification and its validation after mercury analysis using DORM-4 and DOLT-4 certified standards.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian research funding agencies FAPESP (Processes: 2010/51332-5 and 2013/21297-1) and ANEEL/ESBR- P&D: 6631-0001/2012/Contract Jirau 004/201.for their financial support.

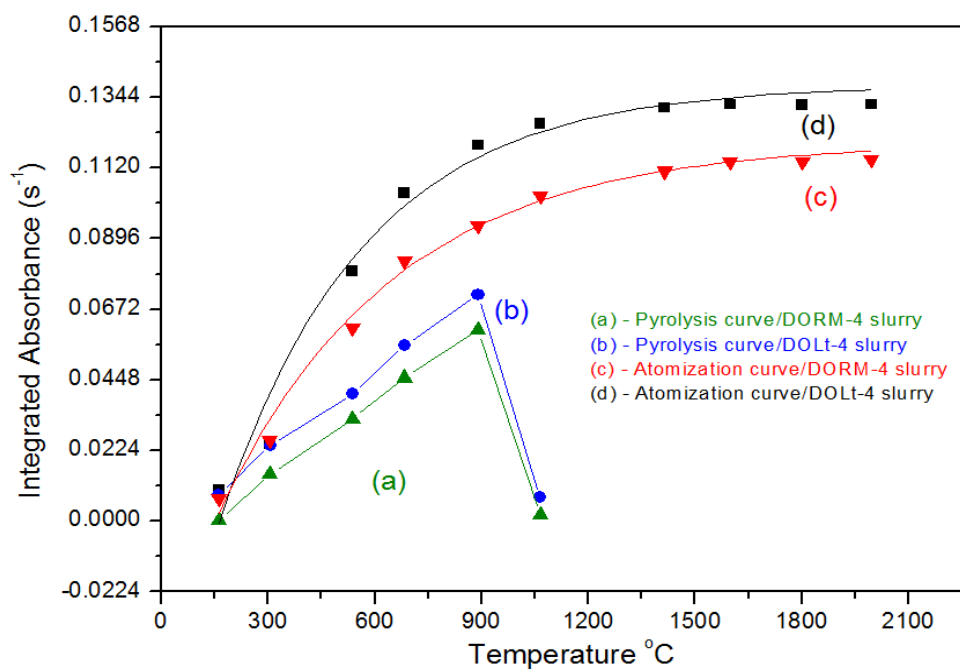


Fig. 1.
Pyrolysis and atomization temperature optimized for thermal stabilization of mercury in slurries of fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4.

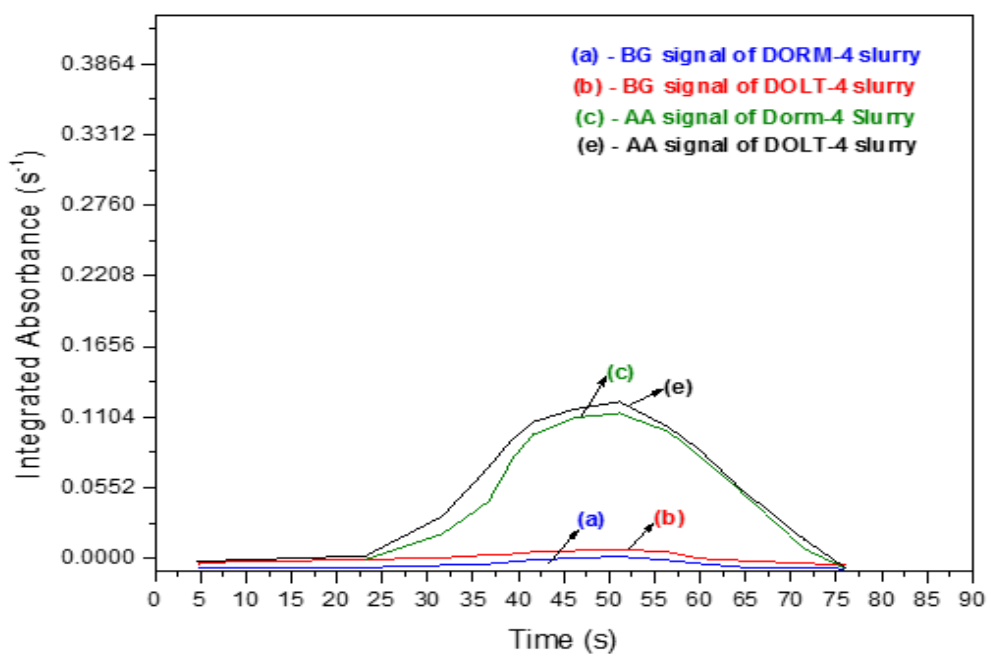


Fig. 2.
Transient atomic absorption (AA) and background (BG) signals obtained for mercury atomization in slurries of fish protein certified reference material DORM-4 and liver certified reference material DOLT-4.

Table 1.

Graphite furnace heating program optimised for mercury determination in from slurries of tissue samples (muscle and liver), slurries of certified reference material (DORM-4 and DOLT-4) as also mercury aqueous standard solutions.

Steps	Temperature (°C)	Ramp (s)	Hold (s)	Argon flow L min ⁻¹
Drying	80	5	0	1
Drying	160	5	10	1
Pyrolysis	300	5	10	1
Pyrolysis	900	5	10	1
Atomization	1700	2	5	0
Cleanup	2000	5	0	1

Table 2.

Results obtained in the determination of total mercury in muscle and liver tissue samples from Brazilian Amazon fish.

Fish Species and certified standards	Slurry sampling Muscle tissue (mg kg ⁻¹)	Slurry sampling Liver tissue (mg kg ⁻¹)	Acid mineralization Muscle tissue** (mg kg ⁻¹)	Acid mineralization Liver tissue** (mg kg ⁻¹)
Pirarucu	0.195±0.0021	0.349±0.00	0.190±0.0020	0.344±0.00382
Piranha				
preta	0.268±0.0028	0.459±0.00523	0.263±0.0029	0.456±0.00533
DORM-4*	0.404±0.006	-	0.403 ± 0.012	-
DOLT-4*	-	2.54±0.04	-	2.53±0.07

* Fish protein certified reference material DORM-4 containing 0.410 ± 0.055 mg kg⁻¹ of total mercury; Liver certified reference material DOLT-4 containing 2.58 ± 0.22 mg kg⁻¹ of total mercury; ** Mineralized samples in an ultrasonic water bath.

References

- AMORIM, M.I., MERGLER, D., BAHIA, M.O., DUBEAU, H., MIRANDA, D., LEBEL, J., BURBANO, R.R., LUCOTTE, M., 2000. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *An. da Acad. Bras. Ciências* 72, 497–507.
- BERMEJO-BARRERA, P., MOREDA-PIÑEIRO, J., MOREDA-PIÑEIRO, A., BERMEJO-BARRERA, A., 1994. Palladium as a chemical modifier for the determination of mercury in marine sediment slurries by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 296, 181–193.
- BERMEJO-BARRERA, P., VERDURA-CONSTENLA, E.M., MOREDA-PIÑEIRO, A., BERMEJO-BARRERA, A., 1999. Rapid acid leaching and slurry sampling procedures for the determination of methyl-mercury and total mercury in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 398, 263–272.
- BRAGA, C.P., BITTARELLO, A. C., PADILHA, C.C.F., LEITE, A. L., MORAES, P.M., BUZALAF, M. A. R., ZARA, L.F., PADILHA, P.M., 2015. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta* 132, 239–244.
- FAO/WHO, 2004. Human energy requirements. *FAO Food Nutr. Tech. Rep. Ser.* 10, 6.

GALLIGNANI, M., BAHASAS, H., BRUNETTO, M.R., BURGUERA, M., BURGUERA, J.L., PETIT DE PEÑA, Y., 1998. A time-based flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry system with on-line microwave sample pre-treatment for the determination of inorganic and total mercury in urine. *Anal. Chim. Acta* 369, 57–67.

HORWITZ, W., ALBERT, R., 1997. The concept of uncertainty as applied to chemical measurements. *Analyst* 122, 615–7.

LEBEL, J., MERGLER, D., BRANCHES, F., LUCOTTE, M., AMORIM, M., LARRIBE, F., DOLBEC, J., 1998. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian Basin. *Environ. Res.* 79, 20–32.

LOUREIRO, V.R., SALEH, M.A.D., MORAES, P.M., NEVES, R.C.F., SILVA, F.A., PADILHA, C.C.F., PADILHA, P.M., 2007. Manganese determination by GFAAS in feces and fish feed slurries. *J. Braz. Chem. Soc.* 18, 1235–1241.

MORAES, P.M., SANTOS, F.A., CAVECCI, B., PADILHA, C.C.F., VIEIRA, J.C.S., ROLDAN, P.S., PADILHA, P. DE M., 2013. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chem.* 141, 2614–2617.

MORAES, P.M., SANTOS, F.A., PADILHA, C.C.F., VIEIRA, J.C.S., ZARA, L.F., DE M. PADILHA, P., 2012. A Preliminary and Qualitative Metallomics Study

of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. *Biol. Trace Elem. Res.* 150, 195–199.

MOREDA-PIÑEIRO, J., LÓPEZ-MAHÍA, P., MUNIATEGUI-LORENZO, S., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E., PRADA-RODRÍGUEZ, D., 2002. Direct mercury determination in aqueous slurries of environmental and biological samples by cold vapour generation–electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 460, 111–122.

RODRIGUES BASTOS, W., PAULO, J., GOMES, O., OLIVEIRA, R.C., ALMEIDA, R., NASCIMENTO, E.L., VICENTE, J., BERNARDI, E., DRUDE DE LACERDA, L., GLÓRIA DA SILVEIRA, E., PFEIFFER, W.C., 2005. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil.

SILVA, F.A., NEVES, R.C.F., QUINTERO-PINTO, L.G., PADILHA, C.C.F., JORGE, S.M.A., BARROS, M.M., PEZZATO, L.E., PADILHA, P.M., 2007. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere* 68, 1542–7.

SILVA, F., PADILHA, C., PEZZATO, L., BARROS, M., PADILHA, P., 2006. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta* 69, 1025–

1030.

VIEIRA, J.C.S., CAVECCI, B., QUEIROZ, J. V., BRAGA, C.P., PADILHA, C.C.F., LEITE, A.L., FIGUEIREDO, W.S., BUZALAF, M.A.R., ZARA, L.F., PADILHA, P.M., 2015. Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 422–430.

ZHANG, Y., ADELOJU, S.B., 2012. Speciation of mercury in fish samples by flow injection catalytic cold vapour atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 721, 22–27.

CAPÍTULO III

APLICAÇÃO DA METALÔMICA NO FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO MERCÚRIO EM *ARAPAIMA GIGAS* E *SERRASALMUS RHOMBEUS* DO RIO MADEIRA/BACIA AMAZÔNICA

João Vitor de Queiroz^a

^aSão Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Botucatu

*Corresponding author: João Vitor de Queiroz

Rubião Júnior – Zip code: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Phone: + 55 (14) 3880-0609

Email: joaovitor.queiroz@hotmail.com

Resumo

Este trabalho apresenta os resultados de proteínas associadas ao mercúrio em amostras de tecido muscular e hepático de pirarucu (*Arapaima gigas*) e piranha preta (*Serrasalmus rhombeus*) oriundos do complexo hidrelétrico de Jirau, na Bacia do Rio Madeira, região amazônica do Brasil. O proteoma do músculo e fígado dessas espécies foi obtido por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D PAGE). O mercúrio presente nos spots proteicos foi determinado por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) após mineralização ácida assistida por banho de ultrassom. Os spots proteicos que apresentaram mercúrio foram caracterizados por espectrometria de massas por ionização com eletrospray em sequência (ESI- MS/MS) após digestão trípica. As determinações GFAAS indicaram que a maior parte do mercúrio está ligada a fração proteica com massa molar (Mm) inferior a 90 kDa. As concentrações de mercúrio nos spots apresentaram-se na faixa de 4,07 – 164,63 µg g⁻¹ no tecido muscular de pirarucu; 0,86 – 25,34 µg g⁻¹ no tecido hepático de pirarucu; 7,67 – 156,18 µg g⁻¹ no tecido muscular de piranha preta e 2,17 – 31,42 µg g⁻¹ no tecido hepático de piranha preta. A análise por ESI-MS/MS permitiu caracterizar em dezenove spots proteicos as seguintes proteínas e/ou enzimas: Triosephosphate isomerase, Fructose-bisphosphate aldolase, Ckmb protein,, Cofilin 2 (Muscle), Actin_ alpha_ cardiac muscle 1a, Actin_ alpha 1_ skeletal muscle, Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-

adult 1 (Hbaa1), Hemoglobin subunit alpha, Embryonic 1 beta-globin, Embryonic globin beta e2, Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, Adenosylhomocysteinase, Glycine N-methyltransferase, Peroxiredoxin 2, Enolase 1_ (Alpha), Fatty acid binding protein 11a, Parvalbumin 3, 3-hydroxyanthranilate 3_4-dioxygenase e Glutathione peroxidase.

Palavras-chave: mercúrio, peixe, proteína, 2D PAGE

Abstract

This work presents the results of proteins associated with mercury in muscle and hepatic tissue samples of pirarucu (*Arapaima gigas*) and piranha preta (*Serrasalmus rhombeus*) from the Jirau hydroelectric complex, in the Madeira River Basin, Amazon region of Brazil. The muscle and liver proteome of these species was obtained by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D PAGE). The mercury present in protein spots was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) after acid mineralization assisted by ultrasonic bath. Protein spots that presented mercury were characterized by mass spectrometry by ionization with electrospray in sequence (ESI-MS / MS) after tryptic digestion. The GFAAS determinations indicated that most of the mercury is bound to a protein fraction with molar mass (Mm) of less than 90 kDa. The concentrations of mercury in the spots were in the range of 4.07 - 164.63 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the pirarucu muscle tissue; 0.86 - 25.34 $\mu\text{g g}^{-1}$ in hepatic pirarucu tissue; 7.67 - 156.18 $\mu\text{g g}^{-1}$ in black piranha muscle tissue and 2.17-31.42 $\mu\text{g g}^{-1}$ in piranha preta liver tissue. Analysis by ESI-MS / MS allowed the characterization of the following proteins and / or enzymes in nineteen protein spots: Triosephosphate isomerase, Fructose-bisphosphate aldolase, Ckmb protein, Cofilin 2 (Muscle), Actin-alpha cardiac muscle 1a, Actin-1 skeletal Muscle, Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1), Hemoglobin subunit alpha, Embryonic 1 beta-globin, Embryonic globin beta e2, Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, Adenosylhomocysteinase, Glycine N-methyltransferase, Peroxiredoxin 2, Enolase 1 Alpha), Fatty acid binding protein 11a, Parvalbumin 3,3-hydroxyanthranilate 3-4-dioxygenase and Glutathione peroxidase.

Key words: mercury, fish, protein, 2D PAGE

Introdução

Na região Amazônica faz-se necessário um monitoramento constante do nível de mercúrio na população de peixes, e em menor escala, em outros organismos carnívoros utilizados como alimento pela população local, como mamíferos, aves e répteis, que também podem acumular Hg através da transferência pela cadeia alimentar. As espécies de peixes carnívoras avaliadas na bacia do Rio Madeira estão apresentando elevadas concentrações de Hg em seus tecidos, atingindo valores, para algumas espécies, superiores ao sugerido para a ingestão humana, fornecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), de 500 ng g^{-1} e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) para espécies não carnívoras e de 1.000 ng g^{-1} para espécies carnívoras.

As principais formas de entrada de Hg nos seres humanos são por inalação dos vapores (forma inorgânica, Hg^0) e ingestão de alimentos contaminados pelo metal, particularmente de peixes (forma orgânica, metil-Hg). O vapor de mercúrio metálico inalado é absorvido pelos pulmões e transportado pelo sangue acumulando-se principalmente nos rins, mas pode atravessar a barreira hemato-encefálica causando danos ao sistema nervoso central (Lacerda & Salomons, 1998). Os sintomas são: febre, tosse, fadiga, tremores, distúrbios digestivos (diarreia, anorexia e vômitos) e distúrbios nervosos, como ansiedade, cefaleia, depressão, letargia e perda de memória (Pfeiffer et al., 1993). Muito solúvel em gorduras, o composto metil-Hg, absorvido via ingestão de pescado, atravessa com facilidade as membranas celulares, danificando principalmente o sistema nervoso central. De maneira geral o metil-Hg irá produzir no homem danos irreversíveis em seu sistema nervoso atingindo principalmente as áreas associadas as funções sensoriais, visuais, auditivas e de coordenação motora (Pfeiffer et al., 1993).

Assim, o consumo de peixes pode representar um risco a saúde dessas populações ribeirinhas. A determinação de espécies mercuriais em amostras biológicas apresenta dificuldades devido as baixas concentrações que essas espécies apresentam nessas amostras e também porque a toxicidade depende da espécie mercurial analisada. Nesse contexto, o desenvolvimento de biomarcadores relacionados ao mapeamento e expressões

de metaloproteínas associadas ao mercúrio poderá indicar previamente os riscos relacionados a contaminação do pescado dos rios amazônicos (Bastos et al., 2009).

A metalômica, recente área de pesquisa, permitiu a integração de estudos analíticos e bioquímicos de elevada complexidade, contemplando o sequenciamento e a caracterização de proteínas associadas a metais. Esta nova área do conhecimento científico tem contribuído na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos. A elucidação de espécies mercuriais complexadas por proteínas e/ou enzimas utilizando a metalômica e análise de especiação permitirá estudo detalhado do aumento ou diminuição de expressão dessas metaloproteínas, frente as alterações das características limnológicas e disponibilidades das espécies mercuriais no ambiente dos rios amazônicos. Nesse aspecto, as metaloproteínas e/ou proteínas metal ligante caracterizadas nessas condições de estudo, poderão ser utilizadas como biomarcadoras de toxicidade do mercúrio no pescado da região amazônica (Meili, 1991).

Considerando o exposto, o presente trabalho apresenta os resultados metalômicos quantitativos da análise de pool de tecido muscular (n=10) e hepático (n=10) de duas espécies amazônicas, pirarucu (*Arapaima gigas*) e piranha preta (*Serrasalmus rhombeus*), utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D PAGE) para obter o proteoma dos tecidos, espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) para determinação quantitativa de mercúrio nos spots proteicos e espectrometria de massas por ionização com eletrospray em sequência (ESI-MS/MS) para caracterização dos spots proteicos que apresentaram mercúrio ligado em suas estruturas.

Material e Métodos

Método de coleta das espécies

A realização dos trabalhos de campo se deram juntamente com a empresa Naturae consultoria ambiental, com mais de dez anos de experiência em manejo e conservação de recursos naturais de acordo com a legislação ambiental vigente. Essa empresa é

responsável pelo monitoramento de fauna da região no entorno do empreendimento hidrelétrico de Jirau.

Como ferramentas de coleta, utilizaram-se redes de espera com malhagens de diferentes tamanhos para maximizar as chances de captura dos exemplares de interesse. As malhagens utilizadas foram de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 cm². Além das redes, utilizou-se, para a captura de exemplares maiores, espinhel e tarrafa.

As redes eram verificadas a cada duas horas, e os exemplares capturados (10 animais de cada espécie) foram eutanasiados e uma porção do tecido muscular, bem como o tecido hepático foram retirados, identificados, colocados em recipiente esterilizado e acondicionados em nitrogênio líquido para que não houvesse perda de conteúdo. O restante do material biológico foi utilizado pela empresa Naturae para monitoramento de fauna da região.

Um pool de amostra de músculo de cada uma das espécies de peixes coletados (pirarucu e piranha preta) foi então transferido para frascos de polipropileno de 15 mL e armazenadas em gelo seco a -70°C na Base de Operações do Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico, localizada na área do Canteiro de Obras do AHE Jirau. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o laboratório de estudos metalômicos (Laboratório de Bioanalítica) do Instituto de Biociências – Departamento de Química e Bioquímica/UNESP, Botucatu/SP.

Obtenção dos pellets protéicos

A precipitação total das proteínas foi realizada utilizando-se solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona), onde foi mantida em geladeira por duas horas, garantindo que a mesma ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, o precipitado proteico foi centrifugado a 13.000 rpm, a 4°C por 10 minutos em ultracentrífuga refrigerada (BioAgency) por 10, e o sobrenadante retirado. Esse precipitado proteico foi lavado mais duas vezes com a solução de acetona gelada utilizada para a precipitação (Lima et al., 2010).

Separações eletroforéticas

Os pellets obtidos anteriormente, foram solubilizados em solução contendo ureia, tiouréia, CHAPS, anfólitos, azul de bromofenol e DTT. As diluições dos pellets foram feitas de tal forma que a concentração de proteínas totais resultante fosse a mesma para todas as amostras: 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Um volume de 250 μL dessa solução foi adicionado as fitas de 13 cm contendo gel de poliacrilamida e com gradiente de pH de 3 a 10 para que estas fossem reidratadas com solução contendo a própria amostra. As tiras foram hidratadas por 12 horas com 1,5 mg mL^{-1} de proteínas, submetidas a focalização isoeletrica, alquilada e reduzida em soluções de equilíbrio. Em seguida, as tiras foram aplicadas a géis de poliacrilamida 12,5% (m/v) e submetidas a corrida 2D-PAGE. Após a corrida, as proteínas foram coradas com Coomassie coloidal por 72 horas e os géis descorados com sucessivas lavagens em água ultrapura, digitalizados e analisados utilizando o software ImageMaster platinum (versão 7.0) para se obter o número de spots, matching, pI e massa molecular dos spots (Braga et al., 2015; Vieira et al., 2015).

Determinação de mercúrio total

As determinações de mercúrio total nas amostras dos tecidos muscular e hepático, nos *pellets* proteicos e *spots* proteicos foram feitas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). Para validação do método de mineralização foi utilizado padrão certificado *Fish Protein* DORM 4–NRC contendo $410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio total, conforme procedimento descrito por (Braga et al., 2015; Moraes et al., 2013; Vieira et al., 2015).

Caracterização das proteínas por ESI MS/MS

Os spots proteicos que apresentaram mercúrio foram recortados do gel, removido o corante, reduzidos e alquilados, feita digestão trípica das proteínas, eluído os peptídeos e analisados por espectrômetro de massas ESI MS/MS (nanoACQUITY UPLC-Xevo sistema QT-MS, Waters, Manchester, Reino Unido) (Braga et al., 2015). A identificação das proteínas foi feita utilizando o banco de dados Otophysi e UniProt (UniProt, 2016).

Resultados e discussão

Eletroforese bidimensional

Os géis apresentaram reprodutibilidade de 75% e média de 387 spots para músculo de Pirarucu; 81% e média de 412 spots para fígado de Pirarucu; 73% e média de spots de 405 para músculo de Piranha Preta e 79% e média de spots de 429 para fígado de Piranha Preta. As figuras 1 e 2 apresentam os géis obtidos para pirarucu e piranha preta, respectivamente.

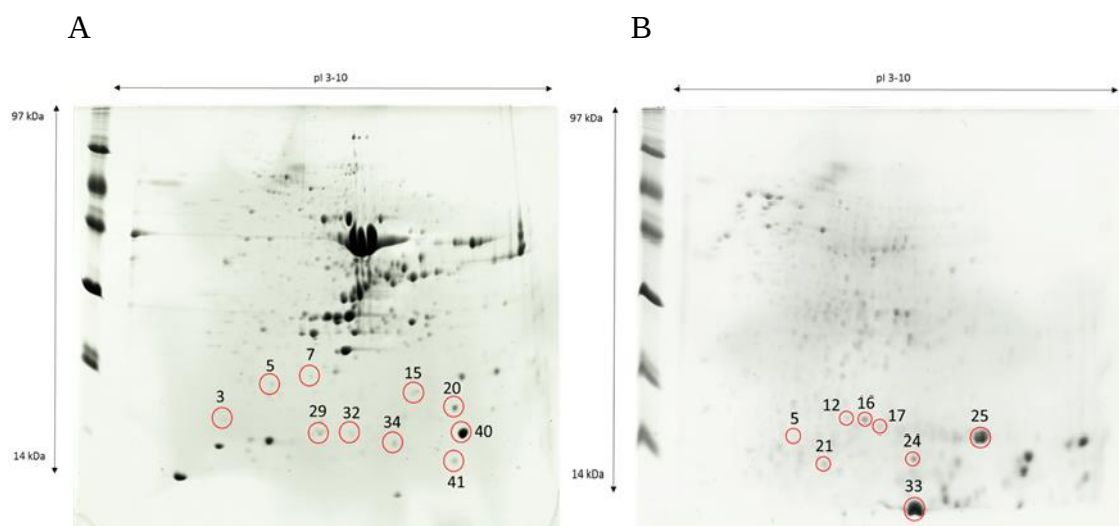


Figura 1. Gel a 12,5% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular (A) e hepático (B) de Pirarucu. Os spots que apresentaram mercúrio foram caracterizados por ESI MS/MS e estão indicados no gel com círculo vermelho.

A

B

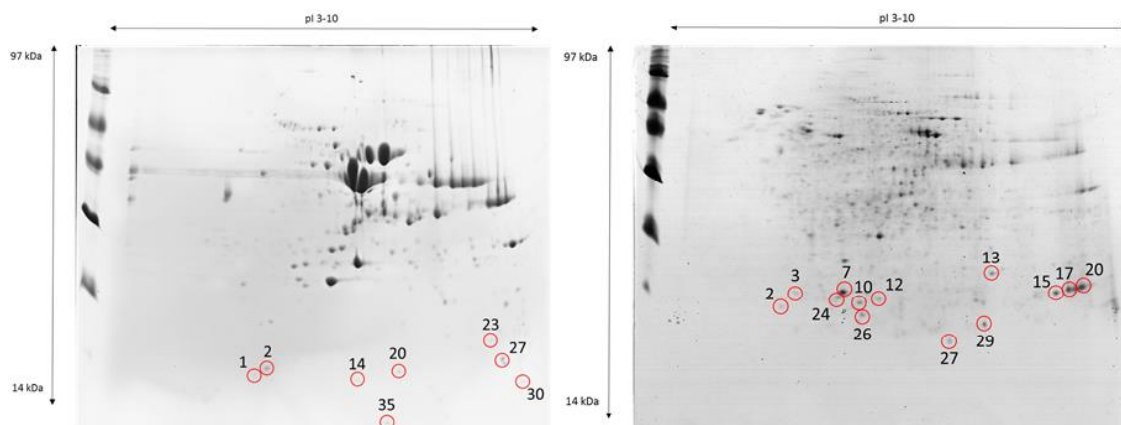


Figura 2. Gel a 12,5% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular (A) e hepático (B) de Piranha Preta. Os spots que apresentaram mercúrio foram caracterizados por ESI MS/MS e estão indicados no gel com círculo vermelho.

Determinação de mercúrio total

A determinação do mercúrio total foi realizada diretamente nos tecidos muscular de Pirarucu ($188 \pm 1,90 \mu\text{g kg}^{-1}$) e hepático ($344 \pm 3,80 \mu\text{g kg}^{-1}$) bem como nos tecidos muscular da Piranha Preta ($263 \pm 2,90 \mu\text{g kg}^{-1}$) e hepático ($456 \pm 5,40 \mu\text{g kg}^{-1}$) e também nos pellets protéicos. Neste último foi detectado $160 \pm 1,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $282 \pm 2,90 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio para o pellet muscular e hepático de Pirarucu, respectivamente (gráfico 1). Para a Piranha Preta, foram encontrados os valores de $220 \pm 2,40 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $441 \pm 5,00 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio para pellet muscular e hepático, respectivamente. O padrão certificado DORM 4-NRC ($410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg) foi utilizado para validar o método de determinação de mercúrio (Moraes et al., 2013), apresentando nas leituras $408 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio, valor próximo ao indicado pelo fabricante.

Analisando os dados obtidos, observa-se maior quantidade de mercúrio no tecido e pellets hepático da Piranha Preta; isso ocorre, pelo fato do fígado ter função detoxificante do organismo, e como o mercúrio é um metal tóxico bioacumulativo, pode ocorrer maior quantidade deste bioacumulado em animais topo de cadeia. No fígado há maior diversidade de proteínas, incluindo proteínas com grupos tióis, hidroxilas e aminas que tem maior afinidade ao mercúrio. Como as duas espécies ocupam extremidades opostas

da cadeia alimentar, já era esperado encontrar maior quantidade de mercúrio na Piranha Preta, por ser um peixe topo de cadeia.

Os dados da literatura e/ou do nosso grupo de pesquisa com outras espécies de peixes, como Filhote; *Brachyplatystoma filamentosum* (em processo de publicação), Dourada; *Brachyplatystoma rousseauxii* (Braga et al., 2015) e Tucunaré; *Cichla spp.* (Vieira et al., 2015) do Rio Madeira, demonstram que a quantidade de mercúrio nos tecidos apresenta aumento ao passo que aumenta seus níveis tróficos e consequentemente, o número de átomos de mercúrio por cada molécula de proteína acompanha esse curso.

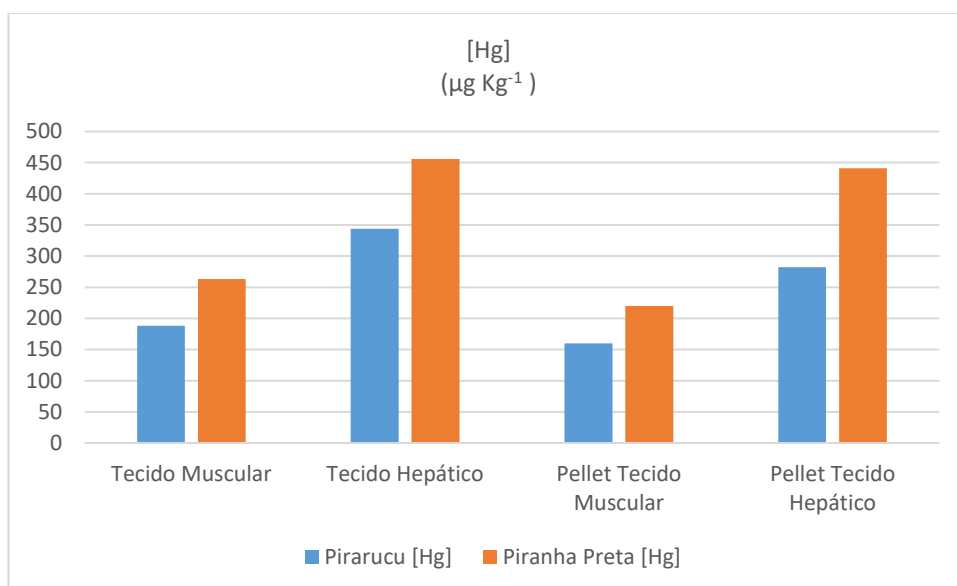


Gráfico 1. Concentração de Hg no tecido muscular e hepático e no pellet de tecido muscular e hepático de pirarucu e piranha preta.

Houve uma taxa de recuperação de aproximadamente 85,1% do total de mercúrio encontrado no pellet do tecido muscular e cerca de 83% de recuperação no pellet do tecido hepático de pirarucu. Ao analisarmos os dados da piranha preta, nota-se que cerca de 83,7% do total de mercúrio quantificado no pellet do tecido muscular foi recuperado no processo de extração, e 96,7% do total de mercúrio quantificado foi recuperado no pellet do tecido hepático.

Com os valores obtidos (gráfico 1), pode-se inferir que o processo de extração foi eficiente para as duas espécies e que a maior parte do mercúrio presente nas amostras de

tecido hepático e muscular estão ligados a fração proteica e a menor parte pode estar ligada a outros compostos e/ou macromoléculas na porção lipídica, por exemplo.

Os dados apresentados são considerados bastante confiáveis porque foram validados com base no resultado obtido na determinação de mercúrio no padrão certificado DORM 4 – NRC de proteína de músculo de peixe. Conforme mostra a Tabela 1, o valor experimental do desvio padrão relativo obtido nas amostras é menor que 1% e o valor experimental absoluto do padrão certificado ($408 \mu\text{g kg}^{-1}$) é cerca de 0,50 % menor que o valor certificado absoluto ($410 \mu\text{g kg}^{-1}$), comprovando assim a exatidão e precisão do método otimizado para determinação de mercúrio.

Tabela 1. Valores obtidos na determinação da concentração de mercúrio por GFAAS nos spots proteicos das amostras de tecido muscular e hepático de pirarucu e piranha preta.

Spots Proteicos	Massa Molar (kDa)	pI	Massa de proteína (μg)	Concentração de Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$)
PM 15	16.16	6.92	3.270	48.17
PM 34	12.19	7.43	2.964	68.94
PM 40	15.75	9.36	1.378	164.63
PF 5	19.71	5.62	1.702	25.34
PF 12	19.6	6.42	13.695	14.92
PF 16	20.04	7.48	23.698	7.60
PF 17	20.9	7.94	11.724	3.68
PF 21	17.2	5.99	5.219	21.56
PF 24	15.4	4.8	13.046	12.07
PF 25	15.45	5.23	12.296	5.34
PPM 14	25.16	9.69	2.813	23.33
PPM 20	20.71	7.07	5.145	17.49
PPM 23	18.33	9.85	2.198	19.62
PPM 27	14.76	9.31	1.363	82.56
PPM 30	11.31	4.68	11.735	7.67
PPM 35	12.43	7.76	1.453	156.18
PPF 2	20.16	5.13	9.204	19.56
PPF 7	19.51	6.36	42.744	4.78
PPF 13	21.96	8.67	9.495	4.54

PM=spot do tecido muscular de Pirarucu; PF=spot do tecido hepático de Pirarucu; PPM=spot do tecido muscular de Piranha Preta; PPF=spot do tecido hepático de Piranha Preta; pI=ponto isoelétrico.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que as concentrações de mercúrio nos spots proteicos das duas espécies apresentam valores semelhantes aos encontrados na literatura (Moraes et al., 2013; Vieira et al., 2015; Braga et al., 2015). Peixes do topo da cadeia alimentar, como é o caso da Piranha Preta e Pirarucu, tendem a apresentar maiores concentrações de mercúrio em seus tecidos. As cadeias alimentares podem amplificar as concentrações de Hg e nestas os maiores valores são encontrados nos organismos predadores (topo das cadeias tróficas). Este fenômeno é muito melhor documentado em sistemas aquáticos. Como os peixes geralmente ocupam o topo da cadeia alimentar no ambiente aquático, seu estudo fornece uma visão integrada desse ambiente. A alta concentração de mercúrio em peixes está relacionada com dois fatores principais: a poluição dos componentes do ambiente aquático (Olivero; Solano, 1998), e as peculiaridades na alimentação de cada espécie (Campbell et al., 2003). A acumulação do mercúrio nos peixes deve-se principalmente a poluição dos sedimentos (Ikigura; Akagi, 1999).

Proteínas identificadas por ESI MS/MS

Todas as proteínas (e suas isoformas) foram caracterizadas por espectrometria de massas ESI MS/MS (Vieira et al., 2015) (tabelas 2 e 3) e confrontadas com a quantidade de mercúrio encontrado ligado a estas. As proteínas caracterizadas no estudo, tratam-se de metaloproteínas ou proteínas do tipo *metal-binding*.

Tabela 2. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido muscular e hepático de Pirarucu.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Sequência Peptídica
PM15	Triosephosphate isomerase	A0A0R4IGG3_DANRE	1502.022	6.92/16.16	6.45/26.526	5.31	GAFTGEISPAMIK
PM34	Cofilin 2 (Muscle)	Q6NZW3_DANRE	845.2561	7.43/12.19	7.62/18.568	13.25	LLPLNDCR HEWQVNGLDDIQDR
PM40	Fructose-bisphosphate aldolase	Q803Q7_DANRE	448.1828	9.36/15.75	8.45/39.740	2.47	QLLFTADDR FQSINAENTEENRR
PF05	Actin_ alpha_ cardiac muscle 1a	Q6IQR3_DANRE	299.2042	5.62/19.71	5.22/41.974	6.10	SYELPDGQVITIGNER IIAPPER
PF12	Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1)	Q6ZM17_DANRE	539.4877	6.42/19.60	8.81/15.565	7.69	ADEIGAEALAR
PF16	Hemoglobin subunit alpha	HBA_DANRE	807.2234	7.48/20.04	7.97/15.522	7.69	ADEIGAEALAR
PF17	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase	Q6DI22_DANRE	110.9138	7.94/20.90	8.66/33.336	2.91	DTPGFIVNR
PF21	Adenosylhomocysteinase	Q803T5_DANRE	48.0788	5.99/17.20	6.33/47.933	3.46	FDNLYGCR GCVQALR
PF24	Glycine N- methyltransferase	F1Q884_DANRE	151.0402	4.80/15.40	6.40/33.233	3.40	VWQLYIGDTR
PF25	Peroxiredoxin 2	Q6DGJ6_DANRE	213.4559	5.23/15.45	5.93/21.850	5.58	QITINDLPVGR

Tabela 3. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido muscular e hepático de Piranha Preta.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Sequência Peptídica
PPM14	Enolase 1_ (Alpha)	Q6TH14_DANRE	1119.342	9.69/25.16	6.25/47.472	4.16	AAVPSGASTGVHEALELR PSGASTGVHEALELR
PPM20	Fatty acid binding protein 11a	Q66I80_DANRE	523.2964	7.07/20.71	7.63/15.166	6.72	AIGVGFATR GVGFATR GFATR
PPM23	Embryonic 1 beta- globin	O93548_DANRE	1512.836	9.85/18.33	6.89/16.161	6.12	LHVDPDNFR LHVD
PPM27	Ckmb protein	Q7T306_DANRE	205.9325	9.31/14.76	6.29/42.851	7.37	FEEILTR TFLVWVNEEDHLR GTGGVDTASVGGVFDISNADR
PPM30	Parvalbumin 3	Q7ZT36_DANRE	226.1489	4.68/11.31	4.43/11.547	10.09	LFLQNFSAGAR
PPM35	Embryonic globin beta e2	Q7T1B0_DANRE	665.0792	7.76/12.43	6.12/16.532	6.12	LHVDPDNFR
PPF02	Actin_ alpha 1_ skeletal muscle	Q9I8V1_DANRE	235.7541	5.13/20.16	5.23/41.972	4.24	SYELPDGQVITIGNER IIAPPERK
PPF07	3-hydroxyanthranilate 3_4-dioxygenase	F1QYC7_DANRE	510.9469	6.36/19.51	5.54/33.192	7.32	QANTVGLVVER EGEMFLPAR
PPF13	Glutathione peroxidase	F6NYT7_DANRE	647.4651	8.67/21.96	6.83/21.717	4.71	FIIWSPVCR

Figura 3. Análise feita pelo B2G com as sequências de proteínas identificadas do tecido muscular e hepático de piranha preta

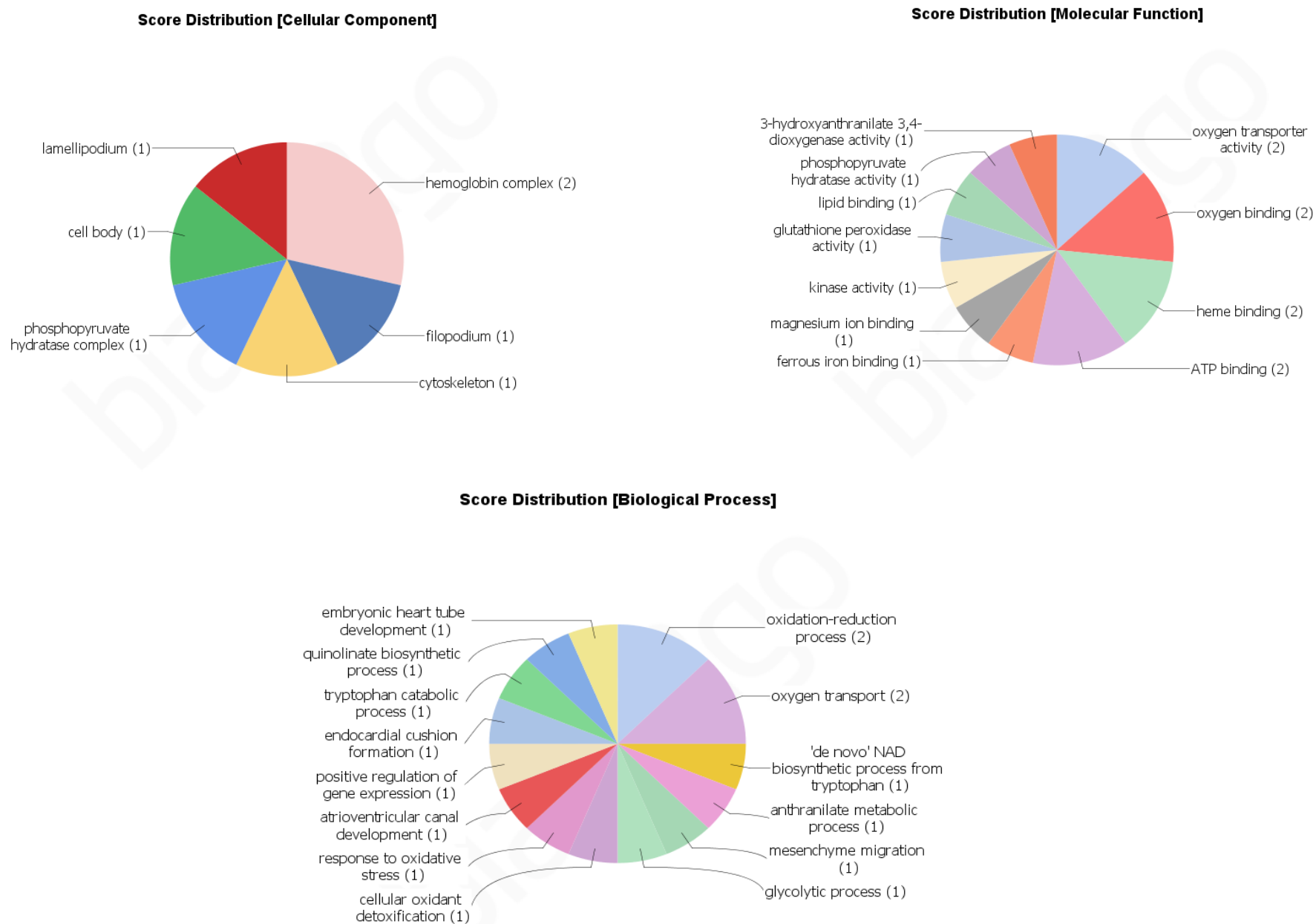
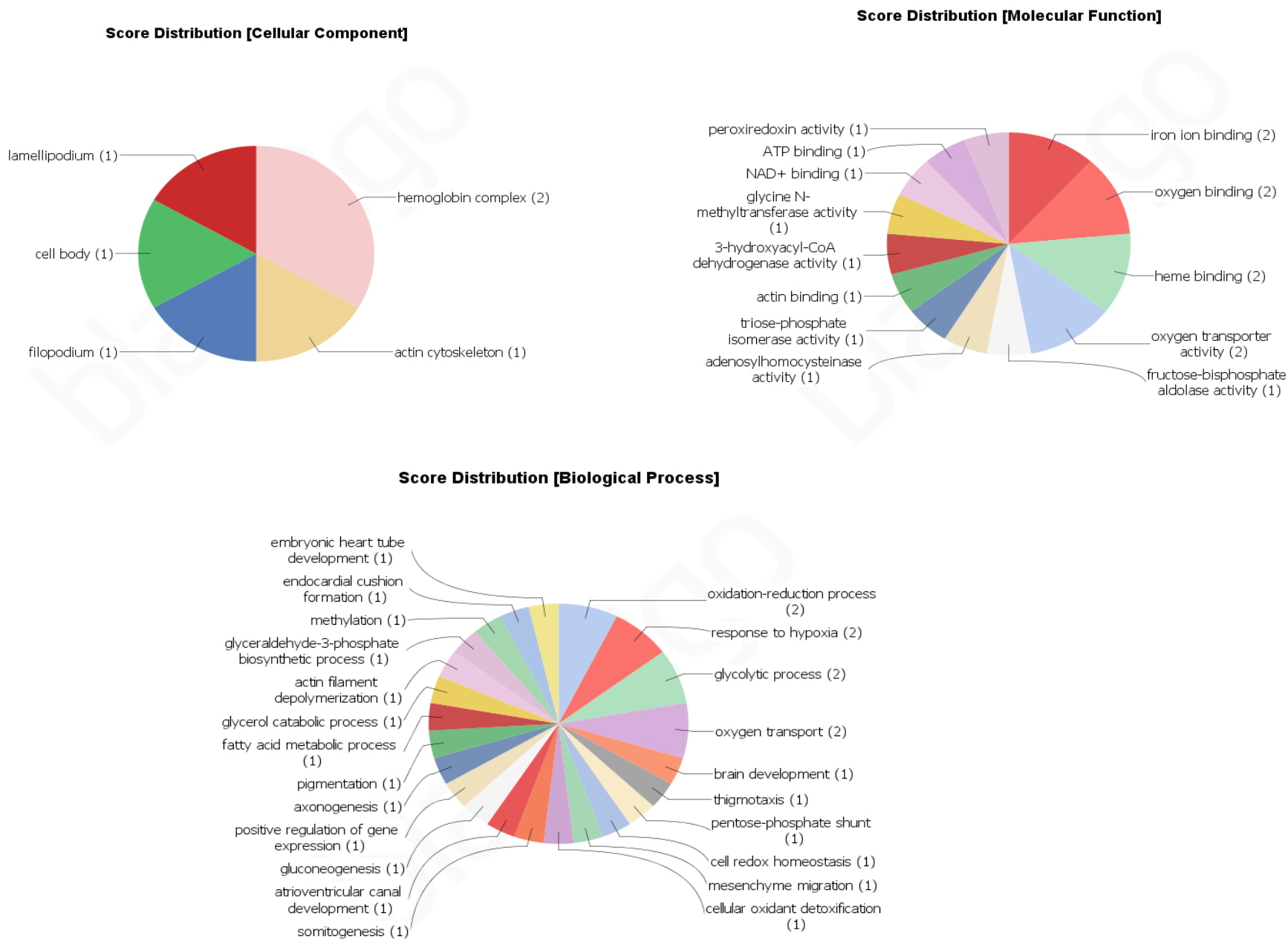


Figura 4. Análise feita pelo B2G com as sequências de proteínas identificadas do tecido muscular e hepático de pirarucu



Considerando a análise feita pelo programa B2G dos tecidos muscular e hepático das duas espécies estudadas, as sequencias de proteínas identificadas foram divididas em componente celular, função molecular e função biológica da proteína (figuras 3 e 4).

No que diz respeito a componente celular, as proteínas foram divididas em **lamellipodium** (Actin, alpha 1, skeletal muscle e Actin, alpha, cardiac muscle 1a), **cell body** (Actin, alpha 1, skeletal muscle e Actin, alpha, cardiac muscle 1a), **filopodium** (Actin, alpha 1, skeletal muscle e Actin, alpha, cardiac muscle 1a), **hemoglobin complex** (Embryonic globin beta e2, Embryonic 1 beta-globin, Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1) e Hemoglobin subunit alpha), **actin cytoskeleton** (Cofilin 2 (Muscle)), phosphopyruvate hydratase complex (Enolase 1, (Alpha)) e **cytoskeleton** (Actin, alpha 1, skeletal muscle)).

Em relação a função molecular, as proteínas sequenciadas foram divididas da seguinte forma: **3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase activity** (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase), **phosphopyruvate hydratase activity** (Enolase 1, (Alpha)), **lipid binding** (Fatty acid binding protein 11a), **glutathione peroxidase activity** (Glutathione peroxidase), **kinase activity** (Ckmb protein), **magnesium ion binding** (Enolase 1, (Alpha)), **ferrous iron binding** (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase), **oxygen transporter activity** (Embryonic 1 beta-globin, Embryonic globin beta e2, Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1) e Hemoglobin subunit alpha), **oxygen binding** (Embryonic 1 beta-globin, Embryonic globin beta e2, Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1), Hemoglobin subunit alpha), **heme binding** (Embryonic 1 beta-globin, Embryonic globin beta e2, Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1) e Hemoglobin subunit alpha), **ATP binding** (Actin, alpha 1, skeletal muscle, Ckmb protein e Actin, alpha, cardiac muscle 1a), **peroxiredoxin activity** (Peroxiredoxin 2), **NAD⁺ binding** (Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase), **glycine N methyltransferase activity** (Glycine N-methyltransferase), **3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity** (Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase), **actin binding** (Cofilin 2 (Muscle)), **triose-phosphate isomerase activity** (Triosephosphate isomerase), **adenosylhomocysteinase activity** (Adenosylhomocysteinase), **iron ion binding** (Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1) e Hemoglobin subunit alpha) e **fructose-bisphosphate aldolase activity** (Fructose-bisphosphate aldolase).

Referente ao processo biológico, as proteínas forma divididas em: **embryonic heart tube development** (Actin, alpha 1, skeletal muscle e Actin, alpha, cardiac muscle 1a), **quinolinate biosynthetic process** (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase), **tryptophan catabolic process** (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase), **endocardial cushion formation** (Actin, alpha 1, skeletal muscle e Actin, alpha, cardiac muscle 1a), **positive regulation of gene expression** (Actin, alpha 1, skeletal muscle e Actin, alpha, cardiac muscle 1a), **atrioventricular canal development** (Actin, alpha 1, skeletal muscle e Actin, alpha, cardiac muscle 1a), **response to oxidative stress** (Glutathione peroxidase), **cellular oxidant detoxification** (Glutathione peroxidase e Peroxiredoxin 2), **oxidation-reduction process** (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase, Glutathione peroxidase, Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase e Peroxiredoxin 2), **oxygen transport** (Embryonic 1 beta-globin, Embryonic globin beta e2, Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1) e Hemoglobin subunit alpha), **'de novo' NAD biosynthetic process from tryptophan** (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase), **anthranilate metabolic process** (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase), **mesenchyme migration** (Actin, alpha 1, skeletal muscle, Actin, alpha, cardiac muscle 1a), **glycolytic process** (Enolase 1, (Alpha), Fructose-bisphosphate aldolase, Triosephosphate isomerase), **glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process** (Triosephosphate isomerase), **actin filament depolymerization** (Cofilin 2 (Muscle)), **glycerol catabolic process** (Triosephosphate isomerase), **fatty acid metabolic process** (Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase), **pigmentation** (Fructose-bisphosphate aldolase), **axonogenesis** (Fructose-bisphosphate aldolase), **gluconeogenesis** (Triosephosphate isomerase), **somitogenesis** (Fructose-bisphosphate aldolase), **response to hypoxia** (Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1) e Hemoglobin subunit alpha), **brain development** (Fructose-bisphosphate aldolase), **thigmotaxis** (Fructose-bisphosphate aldolase), **pentose-phosphate shunt** (Triosephosphate isomerase) e **cell redox homeostasis** (Peroxiredoxin 2).

Triosefosfato isomerase tem como função assegurar um rendimento líquido positivo de ATP a partir da oxidação de glicose para piruvato, sendo absolutamente essencial para eficiente produção de energia (Joseph-McCarthy et al., 1994). Possui ampla funcionalidade devido ao grande número de cofatores, dentre eles metais, nucleotídeos e aminoácidos que cooperam com sua atividade; usam cofatores como ferro,

enxofre e zinco (Goldman, Beatty & Landweber, 2016). Como essa proteína e suas isoformas se ligam ao ferro, zinco e tem grupos sulfidrila em suas estruturas, íons de mercúrio podem se ligar a esses grupos com facilidade, já que, o mercúrio tem maior afinidade pelos sítios ativos de ligação do ferro e do zinco a proteína.

Cofilin 2 (Muscle) conduz a dinâmica do citoesqueleto, promovendo a desfragmentação de filamentos ADP-actina. A cofilin 2 promove o desmembramento de filamentos de actina em sarcômeros para controlar o comprimento exato de filamentos finos no aparelho contrátil (Kremneva et al., 2014). Como essa proteína apresenta resíduos de leucina e isoleucina com grupos carboxílico e amino terminais que apresentam sítios de ligações para metais divalentes, podem formar ligações com íons como Hg^{2+} (Garcia et al., 2006; Tusnádý & Simon, 1998). Essas ligações, mesmo não sendo específicas, caracterizam uma proteína *metal-binding*, não configurando o mercúrio como um cofator metálico (Garcia et al., 2006).

Fructose-bisphosphate aldolase, é fundamental para o processo de obtenção de energia, já que ela participa de uma reação importante da gluconeogênese, e é utilizada na formação de um substrato em gliceraldeído-3-fosfato na gliconeogênese (Zgiby et al., 2000). A Fructose-bisphosphate aldolase apresenta como cofator e grupo prostético Fe^{2+} e Zn^{2+} . Essa enzima possui domínios específicos ligados a átomos de zinco e ferro, que apresentam características semelhantes ao mercúrio, podendo também se ligar a outros íons divalentes como o cobre e o cádmio (Garcia et al., 2006; Pearson et al., 1963; Chevalier et al., 1996). Por apresentar tais cadeias laterais coordenadas com zinco e ferro, que apresentam características semelhantes aos íons Hg^{2+} , pode se inferir que o mercúrio possa deslocar os íons dos grupos tióis, ligando-se as cadeias laterais da Fructose-bisphosphate aldolase.

Actin_ alpha_ cardiac muscle 1a e Actin_ alpha 1_ skeletal muscle são proteínas altamente conservadas, essenciais as células eucarióticas e possuem uma importante função na manutenção da estrutura do citoesqueleto, mobilidade e divisão celular, movimentos intracelulares, processos contráteis, integridade celular, ligação ao Ca^{2+} e Mg^{2+} (UniProt, 2016). A Actin_ alpha é encontrada no músculo esquelético como principal constituinte do aparelho contrátil, juntamente com miosina e envolve principalmente a regulação da contração e relaxamento muscular (Wasko, 2005). A alfa

actina do músculo cardíaco apresenta a mesma função, no entanto ela está relacionada com a contração coordenada do coração (Gunning et al., 1983). Por essa proteína e suas isoformas se ligarem ao Ca^{2+} e Mg^{2+} que são elementos divalentes, a ligação com mercúrio inorgânico, pode ocorrer, já que este também é divalente e tem grande afinidade por sítios de ligação onde se agregam outros elementos químicos com essas mesmas propriedades.

Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1) apresenta como função, absorver e transportar o oxigênio no sangue e liberá-lo no tecido. Isso ocorre graças a capacidade de seus átomos de ferro se ligarem com o oxigênio, reversivelmente (Val et al., 1986). A parte da hemoglobina onde o ferro está ligado é o grupo heme. O ferro chega até ele pelo seu transportador, a transferrina. Através de receptores específicos, o complexo ferro-transferrina liga a membrana da hemácia.

Hemoglobin subunit alpha são proteínas envolvidas no transporte de oxigênio a partir das brânquias para os vários tecidos periféricos dos peixes. Essas proteínas apresentam o grupo ‘heme’ que é responsável pela complexação específica do íon Fe^{2+} configurando-o como um cofator metálico (Jonsson et al., 2006). A literatura não relata a interação dessas proteínas com o mercúrio, mas, como qualquer outra metaloproteína, as hemoglobinas apresentam em suas sequências peptídicas cadeias terminais com átomos de nitrogênio que podem formar ligações não específicas com outros íons metálicos divalentes, como o mercúrio, e caracterizando uma proteína do tipo *metal-binding* (Tomanek, 2008).

Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase codifica uma proteína de 34,3 kDa. Sua função está relacionada com a codificação de proteínas na matriz mitocondrial para catalisar a oxidação de cadeia 3-hidróxiacil-CoA, como parte da via da beta-oxidação. Sua atividade enzimática é mais elevada com ácidos graxos de cadeia média (Zong et al., 2013).

Adenosylhomocysteinase catalisa a hidrólise reversível da S-adenosil a adenosina e L-homocisteína. Assim, regular a concentração intracelular de S-adenosil é importante para reações de transmetilação. A deficiência desta proteína é uma das causas de hipermetioninemia (Palmer, 1979).

Glycine N-methyltransferase participa do metabolismo da glicina, serina e treonina (Ogawa et al., 1998).

Peroxiredoxin 2 é uma enzima antioxidante que reduz o peróxido de hidrogênio e alquil hidroperóxido. A proteína codificada pode desempenhar um papel protetor nas células antioxidantes, e contribuir para a atividade antiviral de células T (Pahl et al., 1995). A incidência de mercúrio no organismo faz com que aumente a produção de peróxidos. De forma simples, a presença de mercúrio induz ao estresse oxidativo, e esse estresse vai produzir ROS (espécies reativas de oxigênio). Sendo assim, as enzimas antioxidantes têm a função de limpar as ROS que são produzidas por conta do estresse causado pela presença de mercúrio. Essas enzimas são responsáveis pela proteção do organismo contra possíveis danos as células, disfunção de tecidos, dentre outras patologias (Hussain et al., 1997). Quando existe um aumento na concentração de mercúrio, a produção de enzimas antioxidantes sofre uma elevação como resposta (Gutierrez, 2002).

Enolase 1_ (Alpha) é uma enzima glicolítica expressa no fígado, cérebro, rim, baço e olhos. Dentro das células, ela se encontra predominantemente no citoplasma, embora uma forma alternativa seja encontrada no núcleo (Kim et al., 2015).

Fatty acid binding protein 11a são responsáveis pela transferência de ácidos graxos nas membranas intracelulares. Essa proteína também pode ser responsável pelo transporte de moléculas lipofílicas da membrana exterior da célula para certos receptores intracelulares (Pu et al., 1999).

Embryonic 1 beta-globin tem como função o transporte de oxigênio (Basu et al., 2005).

Ckmb protein é uma enzima catalítica que participa da formação da fosfocreatina e ADP. Esta reação enzimática é reversível, assim, o ATP pode ser gerado a partir da fosfocreatina e ADP. A fosfocreatina serve como um reservatório de energia em tecidos e células que consomem ATP rapidamente (músculo esquelético, liso e cérebro) (Wallimann et al., 1992). Por essa enzima apresentar sítios de ligações de metais divalentes disponíveis, podem formar ligações com íons Hg^{2+} (Garcia et al., 2006; Berbel et al., 1996). Dessa forma, pode se inferir que o mercúrio pode ter se incorporado a Ckmb

protein por ligações não específicas formando uma proteína *metal-binding*, não sendo configurado como um cofator metálico (Garcia et al., 2006).

Parvalbumin 3 é uma proteína que está diretamente envolvida em processos de relaxamento muscular após ocorrência de contração. Essa proteína é basicamente formada por sequências peptídicas que contém serina e alanina – aminoácidos que apresentam estruturas com grupos carboxílicos, amino e hidroxila, suscetíveis a complexação de íons metálicos divalentes, principalmente cálcio e magnésio (Berbel et al., 1996). Vieira e colaboradores (2015), encontraram mercúrio ligado a parvalbumin e suas isoformas no tecido muscular e hepático de tucunaré (*Cichla spp.*) da região amazônica, o que corrobora a afinidade do metal por essa enzima. Por essa proteína apresentar sítios de ligações de metais divalentes disponíveis, podem se formar ligações com íons Hg^{2+} (Mccall, 2000). Dessa forma, é possível inferir que o mercúrio pode ter se incorporado as isoformas da parvalbumin por ligações não específicas formando uma proteína *metal-binding* (Faibane; Williams, 1981). Deve-se destacar que o spot caracterizado com isoformas da parvalbumin ligadas ao mercúrio apresentaram expressão significativa, o que pode candidatar esses spots a possíveis biomarcadores de mercúrio.

Embryonic globin beta e2 tem como função o transporte de oxigênio. A expressão de todos estes genes é controlada por uma única região, e os genes são expressos diferentemente ao longo do desenvolvimento (Basu et al., 2005).

3-hydroxyanthranilate 3_4-dioxygenase participa no metabolismo do triptofano, empregando um co-fator de ferro (Decker et al., 1961). A presença de metionina (base mole) na sequência peptídica da 3-hydroxyanthranilate 3_4-dioxygenase pode coordenar íons com características de ácido mole, como o Hg^{2+} (Pearson, 1963; Garcia et al., 2006).

Glutathione peroxidase apresenta como função reduzir hidroperóxidos de lípidos aos seus correspondentes álcoois e reduzir peróxido de hidrogênio livre a água. A glutathione peroxidase tem uma alta preferência por hidroperóxidos lipídicos. É uma enzima intestinal e extracelular, enquanto que a glutathione peroxidase 3 é extracelular, especialmente abundante no plasma (Ladenstein; Wendel, 1983). Essa enzima apresenta em sua sequência peptídica grupos sulfidril. O Hg apresenta grande afinidade pelo enxofre. Uma vez dentro do organismo, os íons de mercúrio se ligam a qualquer átomo

de enxofre disponível, como os grupos sulfidríla (-SH) de várias proteínas (Garcia et al., 2006).

Conclusão

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO IV

Implicações

Esse trabalho traz informações relevantes que auxiliam no estudo da contaminação pelo mercúrio na fauna e flora da região amazônica. Realizar estudos e fazer o monitoramento do mercúrio na região, é de fundamental importância não só pela saúde da população que tem como principal fonte de proteína a carne branca do peixe, mas também para entender a dinâmica deste metal no corpo e seu possível efeito sobre processos biológicos. A metalômica é um novo método de investigação, com aplicações em diversas áreas e integra estudos de espécies metálicas com estudos de macromoléculas, mais especificamente as proteínas. O aprimoramento de métodos analíticos que permitem a investigação segura das metaloproteínas, inclusive aquelas que podem possuir maior afinidade com o mercúrio. Esse trabalho corrobora para a continuação de estudos metalaproteômicos relacionados com a toxicidade de mercúrio em peixes. Os spots proteicos caracterizados e que apresentaram características de biomarcador poderão ser utilizados como banco de dados no acompanhamento, em nível proteômico, das concentrações de mercúrio nas espécies de peixes estudadas.