

# **Avaliação de Risco Ecológico em Ecossistemas Aquáticos Contaminados por Mercúrio. Estudo de caso: Ilha das Enxadas, Baía de Guanabara, RJ.**

**Ana Paula C. Rodrigues**

Bolsista de Inic. Científica, Ciências Biológicas, UniverCidade

**Zuleica Carmen Castilhos**

Orientadora, Farmacêutica, D. Sc.

## **RESUMO**

*Foi avaliada a contaminação por mercúrio em tecido muscular, sangue total, soro e hemácias de bagres marinhos, Netuma barba (n=15), oriundos da Ilha das Enxadas - Baía de Guanabara. Para avaliar a saúde dos animais coletados foram realizados hemograma, hemocitoscopia, dosagens de enzimas (acetilcolinesterase e de butirilcolinesterase) no músculo e teste do micronúcleo. As concentrações de HgT no músculo ( $126,1 \pm 40,2$ ) foram relativamente altas para um peixe com dieta detritívora. Nesse estudo, a butirilcolinesterase mostrou-se mais*

*apropriada como biomarcador de efeito do que a acetilcolinesterase e o teste de micronúcleo indicou ocorrência de potenciais efeitos genotóxicos em Netuma barba. A forte correlação entre a concentração de HgT no músculo e nas hemácias possibilitou a derivação de uma equação. Ela pode ser utilizada para prever teores de Hg no músculo a partir das concentrações de Hg nas hemácias, o que permitiria a monitorização sistemática, sem o sacrifício do animal, inclusive em áreas de proteção ambiental.*

## **1. INTRODUÇÃO**

O mercúrio (Hg) é um metal da família 2B e possui propriedades diferentes de outros metais. É um elemento-traço e pertence ao grupo chamado de metais pesados. Pode ser encontrado na forma inorgânica ( $Hg^0$  – elementar;  $Hg^{2+}$  – íon mercúrico e  $Hg_2^{2+}$  – íon mercuroso) e na forma orgânica. O Hg advém de fontes naturais como erupções vulcânicas e de fontes antrópicas, em sua maior parte. A emissão de Hg para a atmosfera por atividades industriais é de cerca de 2000 a 3000 toneladas/ano, sendo que desse Hg, 95% permanece no solo, 3% em águas superficiais e 2% na atmosfera (Micarone, 2000). A sua entrada na cadeia alimentar é dada através da

transformação do íon  $Hg^{2+}$  em metilmercúrio (MeHg) por um processo de metilação, onde o  $Hg^{2+}$  recebe um grupamento metila, e é a forma orgânica mais comum do mercúrio. Cada forma do Hg apresenta uma dada toxicidade, sendo que o metilmercúrio é uma substância neurotóxica e teratogênica (Sweet, 2001), capaz de causar danos irreversíveis. É capaz de bioacumular e de biomagnificar através dos níveis tróficos. Liga-se fortemente às proteínas, o que pode facilitar a sua passagem através dos tecidos. É lipofílico, porém quando acumulado não é encontrado predominantemente em tecido adiposo, e sim em tecido muscular, onde cerca de 90% do Hg total está na forma de MeHg. Acredita-se que o processo de metilação no ambiente aquático seja realizado principalmente por bactérias. Assim, o MeHg torna-se biodisponível. O processo de biomagnificação ocorre pela transferência do MeHg acumulado no primeiro nível trófico (produtores) para os consumidores, sendo que quanto mais longa a cadeia trófica, maior será a concentração acumulada pelo consumidor. Tem sido demonstrado que o fator de biomagnificação é cerca de 10 vezes entre peixes não carnívoros e carnívoros (Bruggeman, 1982). Assim, em um ambiente aquático, os peixes representam um dos maiores níveis tróficos, dependendo do seu hábito alimentar e os carnívoros apresentam maiores concentrações de Hg.

Os peixes representam a principal via de exposição dos seres humanos ao MeHg (WHO, 1991). A taxa de excreção do MeHg por organismos vivos é baixa. Nos humanos, a meia vida biológica do MeHg é de 30 a 120 dias. Segundo Ribeyre (1984), o MeHg teria uma afinidade por tecidos musculares e pelo cérebro. No sangue, o Hg é agregado pelas hemácias e interage com as proteínas do plasma, principalmente, com a albumina e com as globulinas (Cember, 1968). O MeHg apresenta afinidade pelas hemácias e o Hg inorgânico é encontrado no plasma (Schultz, et al., 1994). Nas hemácias de peixes, cerca de 90% do Hg está na forma orgânica (Olson, 1973).

Para a avaliação de risco ecológico é necessário considerar a saúde dos animais coletados, utilizando diversificados parâmetros. Alguns exemplos são a utilização de hemogramas, visualização de células sanguíneas para análise de deformações nucleares e dosagem de atividade enzimática.

O hemograma é constituído por cinco etapas: volume globular (VG); hemoglobinometria (Hb g%); hematimetria (He/mm<sup>3</sup>); volume globular médio (VGM); e, concentração de hemoglobina globular média (CHGM).

Os micronúcleos são corpúsculos formados por cromossomos que se encontram dispersos no citoplasma por não terem sido ligados ao fuso na divisão celular. Eles não podem se prender ao fuso por não terem polímeros formadores de tubulina, que é responsável pela formação desses fusos. Podem haver também a formação de núcleos bilobados que seriam indicação de um início de alterações no metabolismo celular.

A dosagem de enzimas como acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase (BchE) tem sido utilizada como biomarcador de efeito para exposição a compostos persistentes no meio ambiente. A primeira tem como função clivar as moléculas de acetilcolina, que são responsáveis pela condução do impulso nervoso nas junções sinápticas. Vários trabalhos demonstram que sua atividade é diminuída em organismos expostos àqueles compostos (Lopez-Carillo & Lopez-Cervantes, 1993). A segunda é produzida pelo tecido hepático e exportada para corrente sanguínea, onde possui uma meia vida em torno de sete dias, em humanos. Pode ser encontrada em tecidos como fígado, pele, músculo liso gastrointestinal e no plasma. Sua função fisiológica é desconhecida (Mason et al, 1993).

Atualmente, há uma preocupação nos processos de avaliações de risco ecológico em preservar a vida do animal estudado, sendo recomendado que os estudos não requeiram o sacrifício do mesmo. A maioria dos trabalhos com peixes como bioindicadores ambientais utilizam o tecido muscular, o que exige o sacrifício dos espécimens.

Ecossistemas estuarinos, como a Baía de Guanabara, vêm sendo impactados por material orgânico e elementos químicos tóxicos como metais pesados, incluindo o mercúrio. A Baía de Guanabara é uma das maiores baías do Brasil; cerca de 7.000 indústrias estão localizadas ao seu redor e são responsáveis pelo lançamento de 4,800 Kg de metais pesados diariamente. O tempo para renovação de suas águas é cerca de 10 a 20 dias (Wasserman et al, 2000).

Os bagres marinhos são peixes demersais (Azevedo, 1999; Lowe-McConnell, 1999) de importância comercial relativamente alta e tem como habitat, em vida adulta, águas salinas; na época da desova buscam regiões lagunares/estuarinas. A espécie estudada foi Netuma barba (Lacepède, 1803). Esta espécie possui uma dieta variada, alimentando-se desde poliquetas, pequenos crustáceos até peixes em putrefação. Segundo Reis (1986), o Netuma barba têm incluído na sua dieta peixes da família

Scianidae. Esta família inclui peixes de alto valor comercial como a corvina (*Micropogonias furnieri*) (Santos, 1992). Trabalhos prévios (Lima & Castilhos, 2001; Kerig et al, 1998) estudaram a contaminação mercurial em corvinas da Baía de Guanabara.

## **2. OBJETIVO**

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o risco ecológico aquático representado pela disponibilização de mercúrio na Baía de Guanabara, utilizando a espécie de bagre marinho *Netuma barba* (Siluriforme, Ariidae) como bioindicador.

Os seguintes objetivos específicos foram atribuídos para a realização do objetivo geral: (i) avaliação da distribuição do mercúrio total no peixe, utilizando quatro matrizes (músculo, sangue, soro e hemácias); (ii) avaliação da saúde dos peixes coletados, através de hemograma e hematoscopia; teste do micronúcleo; determinação de atividade enzimática da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase no músculo dos peixes.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

A Ilha das Enxadas (22°52'30"W; 43°10'S), ponto da coleta desse trabalho, está situada no arquipélago de Santa Bárbara, na Baía de Guanabara, próximo ao 1º Distrito Naval e a poucas milhas da ponte Rio-Niterói. Seu nome vem da tradução de paru, nome dado por indígenas a um peixe abundante na região. Foi um dos pontos participantes da revolta de 1893 e durante algum tempo foi sede da Escola Naval.

Em 15 de Março de 2003, foram coletados, com anzol, 15 espécimes de *Netuma barba*, sendo que cinco outros peixes de espécies diferentes (badejo, charéu, robalo, obarana e tainha) também foram coletados para serem utilizados no aperfeiçoamento das técnicas usadas. O sangue foi retirado através de punção caudal, com seringas de 1, 3 ou 5mL, armazenado em tubos com anticoagulante (EDTA) e refrigerado. Foram retiradas amostras de músculo, que foram congeladas.

Para avaliação da concentração de mercúrio total foram pesados aproximadamente 0,5 g de amostra em balão volumétrico de 50 mL,

adicionados 2 mL de  $\text{NH}_3\text{-HClO}_4$  (1:1), 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , e 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Essa mistura foi aquecida em placa quente a  $230\text{-}250^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Depois de resfriada, a solução foi avolumada para 50 mL com água. Uma alíquota de 5 ml foi introduzida no Automatic Mercury Analyzer Hg 3500, espectrofotômetro de absorção atômica com sistema de geração de vapor frio de mercúrio (Castilhos, 2001). Para as análises de mercúrio total nas hemácias e no soro, o sangue foi centrifugado a uma rotação de 6000 rpm por 20 minutos, onde se verificou uma melhor separação soro/hemácias.

O micronúcleo e a hemocitoscopia foram realizados através de esfregaços feitos em lâminas lisas com sangue fresco durante a coleta. Estas lâminas foram fixadas em metanol e coradas com GIEMSA para visualização em microscopia óptica.

O hemograma foi determinado como sugerido por Almosny et al (1993), no qual todos os tipos celulares estão presentes na câmara de Neubauer, onde se procede a contagem de eritrócitos, trombócitos e leucócitos. O corante utilizado (GIEMSA) delinea as membranas e cora suavemente os núcleos, o que possibilita a diferenciação entre aquelas células. O hemograma foi realizado no mesmo dia da coleta evitando perda de material por coagulação, já que o estresse do animal durante a punção venosa contribui para que esse processo ocorra, mesmo na presença do anticoagulante utilizado (EDTA). O Volume Globular (Vg) foi determinado através da técnica de microhematócrito. O Volume Globular Médio (VGM) foi obtido através da fórmula:  $\text{VGM} = \text{Vg} \times 100 / \text{hematimetria}$ . A concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foi obtido pela fórmula:  $\text{CHGM} = \text{Hb} \times 100 / \text{Ht}$ .

As determinações das atividades de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase seguiram o método descrito por Oliveira Silva 2000, com modificações, onde as mesmas são quantificadas com base na reação descrita por Ellman (1961). Foram retiradas porções pequenas das amostras do músculo descongelado. A seguir essas porções foram pesadas e homogeneizadas com uma solução tampão de fosfato de sódio 0,12M, pH 7,6 em proporção 6:1 com relação ao peso das porções retiradas. As amostras foram centrifugadas a 9000G por 20 minutos a  $8^\circ\text{C}$ . Durante a centrifugação, foram preparados tubos de ensaio com 2 ml de solução tampão; 0,5 ml de DNTB 2mM. Para a leitura são adicionados aos tubos de ensaio preparados anteriormente 500  $\mu\text{L}$  de substrato (acetil ou butiriltiocolina) e 25  $\mu\text{L}$  da amostra. As atividades enzimáticas foram determinadas em

espectrofotômetro de forma cinética em  $\lambda = 412 \text{ nm}$ , sendo obtida ao final de dois minutos de reação, a absorvância por minuto. Os valores de absorvância foram convertidos em atividade enzimática, expressos em  $\mu\text{moles}/\text{min}.\text{mL}^{-1}$ , através de cálculo de regressão linear utilizando uma curva padrão de L-cisteína. As atividades de acetilcolinesterase foram correlacionadas com concentração de proteína do músculo.

Para determinação da concentração de proteína das amostras de músculo, as amostras foram diluídas de 1:10 em solução tampão fosfato de sódio 0,12M pH 7,6. Em tubos de ensaio relativos as amostras foram adicionados 4,3mL de H<sub>2</sub>O destilada, 200 $\mu$ L de NaOH a 25% e 200 $\mu$ L de amostra diluída a 10%. O "branco" foi confeccionado utilizando-se 4,5mL de H<sub>2</sub>O destilada e 200 $\mu$ L de NaOH a 25%. Em seguida, foi adicionado 300 $\mu$ L de reativo de Folin no primeiro tubo (branco) levando-se ao vortex por 30 seg. O mesmo processo foi repetido para os demais tubos. Transcorrido um período de 5min a partir do primeiro tubo, foi iniciada a leitura da absorvância em espectrofotômetro em  $\lambda = 660\text{nm}$ . As absorvâncias obtidas foram convertidas em concentração de proteína em mg/mL utilizando-se uma curva padrão de albumina.

Os valores de atividade de Acetilcolinesterase foram divididos pela concentração de proteína da amostra sendo obtida a atividade específica da enzima expressa em  $\mu\text{moles}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de ptn (Cunha 1991).

As análises estatísticas dos dados obtidos foram elaboradas no programa SPSS e Statistics. As correlações foram investigadas através dos testes de correlação de Spearman.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A identificação da espécie *Netuma barba* (Figura 1) foi realizada pelo Museu Nacional-RJ, utilizando um espécimen de bagre coletado.

Na Tabela 1 estão apresentados valores médios de parâmetros alométricos e de concentrações de mercúrio em *Netuma barba*.

**Tabela 1.** Médias e desvio padrão do peso (g), do tamanho (mm) e de teores médios Hg ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no músculo (M), sangue total (S), soro (So) e hemácias (H).

| Peso (14)     | Tamanho (14) | M (14)           | S (14)          | So(10)          | H(10)           |
|---------------|--------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 673 $\pm$ 962 | 328 $\pm$ 92 | 126,1 $\pm$ 40,2 | 34,4 $\pm$ 30,2 | 10,5 $\pm$ 10,9 | 20,2 $\pm$ 16,0 |

(n)=número de espécimens

**Figura 1.** Exemplar de *Netuma barba*, coletado na Ilha das Enxadas, Baía de Guanabara, Rio de Janeiro - RJ.



Corvinas (*Micropogonias furnieri*) oriundas da Baía de Guanabara apresentaram uma concentração média de HgT no músculo de 164,1 $\pm$ 69  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Lima & Castilhos, 2001). Comparando com a concentração média no músculo do *Netuma barba* (126,1 $\pm$ 40,2), a diferença se mostra sutil, apesar das duas espécies estarem em níveis tróficos diferentes – a *Micropogonias furnieri* é carnívora e o *Netuma barba*, detritívoro. Essa pequena diferença pode ser explicada pelo fato da corvina ser um peixe migratório, o que interromperia a exposição dessa espécie ao Hg da Baía de Guanabara.

Foram feitas 13 lâminas para a observação microscópica de micronúcleo nas células. Dessas treze, oito apresentaram alterações nos núcleos. A frequência encontrada de micronúcleo e de núcleos bilobados (média de 0,75 micronúcleos e de 0,67 núcleos bilobados para 1000 células contadas) indica a ocorrência de potenciais efeitos genotóxicos.

As médias das atividades específicas das enzimas acetil e butirilcolinesterase estão apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2.** Médias das atividades específicas de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase ( $\mu\text{moles}/\text{min}.\text{mg}$ ); da proteína muscular ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). N=15

| Acetilcolinesterase | Butirilcolinesterase | Proteína          |
|---------------------|----------------------|-------------------|
| 0,42 $\pm$ 0,332    | 0,24 $\pm$ 0,049     | 287,6 $\pm$ 292,2 |

Adicionalmente, é importante comentar que as amostras que mais apresentaram alterações preliminares no núcleo das células foram as de Charéu e Badejo. Essas apresentaram, respectivamente, 12 e 7 núcleos bilobados em 1000 células, observando-se ainda a presença de núcleos amorfos. Ambos os peixes são carnívoros e apresentaram uma alta concentração de mercúrio no músculo (100,7µg/kg e 115,4µg/kg, respectivamente), sendo que os espécimens capturados são pequenos tanto em tamanho quanto peso (22cm e 200 g; 18 cm e 100 g, respectivamente), comparativamente aos seus tamanhos e pesos máximos. O Charéu apresentou ainda a maior atividade específica de butirilcolinesterase (3,0 µmoles/min.mg ptn).

Das 15 amostras de sangue coletadas para hemograma, somente sete não coagularam. Dessas sete amostras, apenas em cinco foi possível a realização do hemograma. Na Tabela 3 estão as médias e o desvio padrão dos resultados obtidos.

**Tabela 3.** Médias e desvio padrão dos hemogramas realizados (N=5).

| VG%       | Hb g%     | He /mm <sup>3</sup> | VGM fl      | CHGM%      |
|-----------|-----------|---------------------|-------------|------------|
| 34,6±5,94 | 5,9±1,195 | 1404000±266889,5    | 251,4±49,85 | 17,08±2,17 |

VG% = Volume Globular; Hg g% = Hemoglobina; He /mm<sup>3</sup> = Hematimetria; VGM fl = Volume Globular Médio; CHGM % = Concentração de Hemoglobina Globular Média

Foram investigadas correlações entre todos os dados obtidos (parâmetros alométricos, bioquímicos e concentrações de mercúrio total nas quatro matrizes). Seguem, na Tabela 4, as correlações significativas.

Não foi observada correlação entre HgT no músculo com tamanho. Com o peso, embora a correlação não seja significativa, há uma clara tendência (0,53 p=0,051). A forte correlação positiva e significativa entre a concentração de HgT no músculo e a concentração de HgT nas hemácias abre a possibilidade da utilização do sangue de peixes como matriz para a avaliação de contaminação por mercúrio no músculo, o que evitaria o sacrifício dos exemplares coletados.

O estudo de regressão linear com esses dois parâmetros apresentou um R<sup>2</sup> = 0,488 (p<0,05), finalizando na equação:

$$[\text{HgT Músculo}] = ([\text{HgT Hemácias}] / 0,1020) - 0,9821$$

Assim, obtendo a concentração do HgT no sangue, poderá ser estimada a concentração de HgT no músculo do espécimen.

**Tabela 4.** Correlações significativas entre parâmetros alométricos, bioquímicos e concentrações de mercúrio total nas quatro matrizes (músculo, sangue total, soro e hemácias), de acordo com o teste de Spearman.

| Parâmetros       | Coefficiente de correlação e significância |
|------------------|--|
| HgM x HgH        | 0,72; p<0,05                               |
| HgH x HgSo       | 0,67; p<0,05                               |
| Butiril x acetil | 0,50; p<0,05                               |
| Butiril x HgSo   | -0,74; p<0,05                              |
| Acetil x HgM     | -0,57; p<0,05                              |
| Acetil x Tamanho | -0,62; p<0,05                              |
| Acetil x Peso    | -0,65; p< 0,05                             |
| Acetil x Hb g%   | 0,99; p< 0,0001                            |
| CHGM x HgSo      | - 0,99; p<0,0001                           |

HgM = HgT no músculo; HgH = HgT nas hemácias; HgSo = HgT no soro; Butiril = atividade da butirilcolinesterase; Acetil = Atividade da acetilcolinesterase; Hg g% = Hemoglobina; CHGM = Concentração de hemoglobina globular média.

A forte correlação negativa e significante da atividade da butirilcolinesterase e dos teores de Hg em soro, indicam esta enzima como um biomarcador de efeito à exposição recente ao mercúrio, já que correlacionou apenas com o HgT em soro, que representa uma exposição recente. Esse Hg presente no soro geralmente é inorgânico e isso indicaria uma afinidade da butiril por essa forma do Hg, já que em músculo e em hemácia o Hg acumulado predominante seria MeHg e o butiril não apresentou correlações com nenhuma dessas matrizes, onde o MeHg é predominante.

A acetilcolinesterase apresentou correlação negativa e significativa com a concentração de mercúrio total no músculo, confirmando a tendência da atividade desta enzima, em presença de compostos persistentes no meio ambiente. Entretanto, a atividade da acetilcolinesterase apresentou correlações significativas com o peso e com o tamanho, que variam normalmente durante a vida do animal. São parâmetros variáveis de espécie para espécie, pois dependem dos seus hábitos alimentares e de comportamento (migratório ou sedentário, por exemplo). Portanto, a acetilcolinesterase não foi considerada apropriada como biomarcador de efeito decorrente da exposição ao Hg para o *Netuma barba*.

As correlações encontradas entre a acetilcolinesterase e a hemoglobina (positiva e significativa); e entre o HgTSo e o CHGM (negativa e significativa)

serão consideradas apenas como tendências, pois o número de amostras analisadas para essas correlações foi pequeno (CHGM e hemoglobina, N=5).

## **5. CONCLUSÕES**

Os teores de Hg músculo de *Netuma barba* foram considerados altos levando-se em consideração os teores de Hg em músculo de *Micropogonias furnieri*, pertencente a nível trófico superior ao *Netuma barba*, mas de comportamento migratório, o que pode influenciar na exposição ao mercúrio presente na Baía de Guanabara.

Das enzimas estudadas, a butirilcolinesterase apresentou-se mais apropriada como biomarcador de efeito à exposição recente ao mercúrio, do que a acetilcolinesterase

O teste do micronúcleo indicou a ocorrência de potenciais efeitos genotóxicos em *Netuma barba*, sendo que as espécies de Charéu e Badejo apresentaram as maiores frequência de alterações nucleares.

Embora haja necessidade de uma amostragem mais ampla, a partir dos resultados do presente trabalho, sugere-se que a coleta de sangue seja utilizada para que a determinação do teor de Hg nas hemácias possa prever os teores de Hg no músculo de peixes, a partir de uma equação linear. Isso permitirá a monitorização sistemática, sem o sacrifício do animal, inclusive em áreas de proteção ambiental.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Gostaríamos de agradecer ao CNPq pela bolsa concedida, à Dra. Nádia Almosny e ao Luiz César Cavalcanti (Faculdade de Veterinária da UFF), à Dra. Ana Rosa Linde, ao Alan, ao Leonardo e à Carla (FIOCRUZ) pelo apoio e pela concessão dos seus laboratórios, sem o que seria impossível a realização desse trabalho.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

ALMOSNY, NRP ET AL. (1993) HEMOGRAMA DE AVES: MÉTODOS. VI CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA EM LÍNGUA PORTUGUESA, SALVADOR, BA.

- AZEVEDO, MCC, ET AL (1999) VARIAÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DE BAGRES MARINHOS (SILURIFORMES, ARIIDAE) NA BAÍA DE SEPETIBA, RJ. VER. BRASIL. BIOL., 59(3): 443-454.
- CARRIER, G.; BOUCHARD, M.; BRUNET, R. C.; CAZA, M. (2001) A TOXICOKINETIC MODEL FOR PREDICTING THE TISSUE DISTRIBUTION AND ELIMINATION OF ORGANIC AND INORGANIC MERCURY FOLLOWING EXPOSURE TO METHYL MERCURY IN ANIMALS AND HUMANS. II. APPLICATION AND VALIDATION OF THE MODEL IN HUMANS. TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, 171: 50-60.
- CASTILHOS, Z.C; BIDONE, E. D.; HARTZ, S. M. (2001) BIOACCUMULATION OF MERCURY BY TUCUNARÉ (CICHLA OCELLARIS) FROM TAPAJÓS RIVER REGION, BRAZILIAN AMAZON: A FIELD DOSE-RESPONSE APPROACH. BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY, 66: 631-637.
- CEMBER, H. (1968) DISTRIBUTION OF MERCURY AMONG BLOOD FRACTIONS AND SERUM PROTEINS. AMERICAN INDUSTRIAL HYGIENE ASSOCIATION JOURNAL, 233-237.
- CUNHA, J. B.; LIMA, J. S. AND FARIA, M. V. C. (1991) BRAIN ACETYLCHOLINESTERASE AS AN IN VITRO DETECTOR OF ORGANOPHOSPHORUS AND CARBAMATE INSECTICIDES IN WATER. WAT.RES., VOL. 25, N 7, PP.835-840.
- ELMANN, G. L.; COURTNEY, K.; ANDRES, JR A.; FEATHERSTONE, R. (1961) A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. BIOCHEM. PHARMACOL, 7: 89-95.
- KEHRIG, H. A; MALM O.; MOREIRA, I. (1998) MERCURY IN A WIDELY CONSUMED FISH MICROPOGONIAS FURNIERI (DEMAREST.1823) FROM FOUR MAIN BRAZILIAN ESTUARIES. THE SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT, VOL 213: 263-271.
- KEHRIG, H. A; MOREIRA, I; MALM O; PFEIFFER, W. C. (2001) ESPECIAÇÃO E ACUMULAÇÃO DE MERCÚRIO PELA BIOTA DA BAÍA DE GUANABARA – RJ. EM: EFEITOS DE POLUENTES EM ORGANISMOS MARINHOS. MORAES, R.; CRAPEZ, M.; PFEIFFER, W.; FARINA, M.; BAINY, A.; TEIXEIRA, V. ARTE CIÊNCIA VILLIPRESS.
- LIMA, C.; CASTILHOS, Z.C. (2001) ABORDAGEM DOSE-RESPOSTA PARA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO ("DRAC") POR MERCÚRIO EM PEIXES. ESTUDO DE CASO: MERCÚRIO EM CORVINAS (MICROPOGONIAS FURNIERI) DA BAÍA DE GUANABARA -RJ. JIC-CETEM
- LOPEZ-CARILLO, L. & LOPEZ-CERVANTES, M. (1993) EFFECT OF EXPOSURE TO ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES ON SERUM CHOLINESTERASE LEVELS. ARCH. ENVIRON. HEALTH, 48 (5):359-363.

- LOWE-MCCONNELL, R. H. (1999) ESTUDOS ECOLÓGICOS DE COMUNIDADES DE PEIXES TROPICAIS. Ed. USP.
- MASON, H.; WAINE, E.; STEVENSON, A. & WILSON, H. K. (1993) AGING AND SPONTANEOUS REACTIVATION OF HUMAN PLASMA CHOLINESTERASE ACTIVITY AFTER INHIBITION BY ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES. HUMAN & EXP. TOXICOL., 12:497-513.
- MASON, R. P.; REINFELDER, J. R.; MORELL, F. M. M. (1995) BIOACCUMULATION OF MERCURY AND METHYLMERCURY. WATER, AIR AND SOIL POLLUTION, 80: 915-921.
- MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. (2000) COMPOSTOS DE MERCÚRIO, REVISÃO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO, TRATAMENTO E DESCARTE. QUÍMICA NOVA, 23 (4): 487-495.
- OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; INÁCIO, A. F.; MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; FERREIRA, M. F.; CUNHA, J. C.; MOREIRA, J. C. (2000) CHOLINESTERASE ACTIVITIES DETERMINATION IN FROOZEN BLOOD SAMPLES: AN IMPROVEMENT TO THE OCCUPATIONAL MONITORING IN DEVELOPING COUNTRIES. HUM. EXP. TOXICOL., 19 (3): 173-177.
- OLSON, K. R.; BERGMAN, H. L.; FROMM, P. O. (1973) UPTAKE OF METHYL MERCURY CHLORIDE AND MERCURIC CHLORIDE BY TROUT: A STUDY OF UPTAKE PATHWAYS INTO THE WHOLE ANIMAL AND UPTAKE BY ERYTHROCYTES IN VITRO. JOURNAL OF THE FISHERIES RESEARCH BOARD OF CANADA, 30 (9): 1293-1299.
- REIS, E. G. (1986) REPRODUCTION AND FEEDING HABITS OF THE MARINE CATFISH NETUMA BARBA (SILURIFORMES, ARIIDAE) IN THE STUARY OF LAGOA DOS PATOS, BRAZIL. ATLÂNTICA, RIO GRANDE, 8: 35-55.
- REIS, E. G. (1986) AGE AND GROWTH OF THE MARINE CATFISH, NETUMA BARBA (SILURIFORMES, ARIIDAE) IN THE STUARY OF THE PATOS LAGOON, BRAZIL. FISHERY BULLETIN, 84 (3): 679-686.
- RIBEYRE, F.; BOUDOU, A. (1984) BIOACCUMULATION ET TEPARTITION TISSULAIRE DU MERCURE – HgCl<sub>2</sub> ET CH<sub>3</sub>HgCl – CHES *SALMO GAIRDNERI* APRES CONTAMINATION PAR VOIE DIRECTE. WATER, AIR AND SOIL POLLUTION, 23: 169-186.
- SANTOS, EDUARDO. (1992) ZOOLOGIA BRASÍLICA – NOSSOS PEIXES MARINHOS. VILLA RICA EDITORAS REUNIDAS LIMITADA, BELO HORIZONTE, MG.
- SCHULTZ, A ET AL (1994) MERCURY. IN TRACE ELEMENTS ANALYSIS IN BIOLOGICAL SPECIMENS (RFM HERBER AND M STOEPLER) v.15, p.403-446, ELSEVIER.

SWEET, LEONARD; ZELIKOFF, JUDITH. (2001) TOXICOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY OF MERCURY: A COMPARATIVE REVIEW IN FISH AND HUMANS. JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH PART B, 4: 161-205.

WASSERMAN, J. C.; FREITAS-PINTO, A. A. P.; AMOUROUX, D. (2000) MERCURY CONCENTRATIONS IN SEDIMENT PROFILES OF A DEGRADED TROPICAL COASTAL ENVIRONMET. ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY, VOL. 21: 297-305.

WHO. ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 118. (1991) INORGANIC MERCURY. INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, GENEVA, SWITZERLAND

