

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E  
PESCA INTERIOR – BADPI**

**DINÂMICA ESPAÇO TEMPORAL E INFLUÊNCIA DO METILMERCÚRIO  
EM PEIXES DO LAGO JANAUCÁ, AM**

**ANDRESSA DE JESUS FRANÇA**

**Manaus – Amazonas  
Julho, 2017**

ANDRESSA DE JESUS FRANÇA

**DINÂMICA ESPAÇO TEMPORAL E INFLUÊNCIA DO METILMERCÚRIO EM  
PEIXES DO LAGO JANAUCÁ, AM**

**Orientadora: Dra. Fabíola Xochilt Valdez Domingos Moreira**

**Co-orientadores: Dr. Bruce Rider Forsberg e Dra. Daniele Kasper**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior/INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

**Fonte Financiadora: CNPq**

**Manaus – Amazonas  
Julho, 2017**

**ANDRESSA DE JESUS FRANÇA**

**DINÂMICA ESPAÇO TEMPORAL E INFLUÊNCIA DO METILMERCÚRIO  
EM PEIXES DO LAGO JANAUCÁ, AM**

**BANCA EXAMINADORA**

- 1) Dr Jean Remy Davee Guimarães**
- 2) Dra Andréa Viviana Waichmann**
- 3) Cláudia Pereira de Deus**

**Manaus – Amazonas  
Julho, 2017**



## FICHA CATALOGRÁFICA

França, Andressa de Jesus

Dinâmica espaço temporal e influência do metilmercúrio em peixes do Lago Janauacá, AM / Andressa de Jesus França – Manaus 2017.XXX

Dissertação (mestrado) – INPA, Manaus, 2017

Orientadora: Dra. Fabíola Xochilt Valdez Domingos Moreira

Co-orientadores: Dr. Bruce Rider Forsberg e Dra Daniele Kasper

Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior

1. Mercúrio 2. Metilação 3. Amazônia 4. Biomarcadores 5. Tóxico

### Sinopse

Foi investigada a influência de variáveis limnológicas, época do ano e local sobre as concentrações de metilmercúrio na água e no sedimento do Lago Janauacá, bem como a bioacumulação e efeitos do metilmercúrio em três diferentes espécies de peixes coletadas no mesmo lago. Foi observado que na região sul do lago a formação de metilmercúrio é mais pronunciada.

Palavras-chave: elemento-traço, ambiente aquático, água doce, toxicidade, biota

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, sou a grata a Deus, por ter me conduzido ao longo desta jornada. Ele esteve presente em minha vida em todos os momentos. Em segundo lugar, agradeço aos meus familiares (pai, mãe, irmãos e sobrinhos) por toda a torcida e amor. Obrigada por serem compreensivos com a minha ausência. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida. ☺ Amo vocês.

Sou muito grata pela oportunidade de ter integrado o quadro de estudantes do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca interior. Sou muito grata ao CNPq pela concessão da bolsa. Me sinto muito grata também pela oportunidade de ter estudado no INPA e pelos maravilhosos professores que me ensinaram e me apoiaram ao longo destes dois anos, em especial aqueles professores que fizeram parte da minha banca de qualificação (José Gomes, Ézio Sargentini e Jaydione Marcon). Também não posso deixar de fazer um agradecimento especial aos seguintes professores: Jansen Zuanon, que me deu boas orientações e transmitiu muita tranquilidade em momentos em que me senti preocupada; Edinaldo Nelson dos Santos, que foi coordenador do curso assim que ingressei, obrigada pelo bom humor e por todas as vezes que me ajudou; Cláudia de Deus, muitíssimo obrigada por ser compreensiva, pelo apoio e por ser uma pessoa tão amável; Eliana Feldberg, que foi sempre tão gentil desde a primeira vez que a conheci e me cedeu espaço no seu laboratório para que eu realizasse algumas atividades importantes, essa gratidão também é externada aos seus alunos, em especial a Milena e seu esposo Isac (que pessoas bacanas).

À Elci e demais integrantes da secretaria do PPG-BADPI pela disposição em me ajudar todas as vezes que as procurei. Não tenho o que reclamar de vocês. Sempre fui bem atendida.

Aos responsáveis e demais integrantes de cada laboratório onde estive, e não foram poucos ☺: i) LTBM, onde passei muitas semanas fazendo barulho ao usar a máquina de fazer gelo; ii) LTMOE, obrigada Lucas, por toda a ajuda no processamento das amostras para análise histológica, obrigada Jaqueline e Wilson pela flexibilidade☺; iii) Laboratório de Química Ambiental coordenado pela Dra Hillandia, obrigada Elaine e Carmendes pelas análises de COD; iv) Laboratório de Química Analítica do Dr Ézio, muito obrigada professor pelo espaço e por sua simpatia ☺; obrigada Henrique, Natasha e especialmente Marquinho, pelas análises, conversas e etc.; v) Laboratório de microorganismos do solo, onde peguei água ultra-pura muitas vezes, obrigada por tudo Francisco; vi) Laboratório de Ecossistemas Aquáticos do Dr Bruce Forsberg, obrigada Jonis pelas análises de COD,

obrigada João Henrique (vulgo: minhoca) pela ajuda com os equipamentos, obrigada Rodrigo pela ajuda no campo piloto, com análises no “R” e alguns mapas, obrigada Joãozinho (João Rocha) pela ajuda no campo e em diversas outras situações, você foi ótimo, obrigada Giselle pela ajuda inicial com a logística de campo, obrigada João Sá pela ajuda com o transporte; vii) LACA (UFAM), obrigada Fran e Rafael pela ajuda com a coloração das lâminas para micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias; vii) Laboratório de Biogeoquímica Ambiental Wolfgang C. Pfeiffer, onde foram realizadas grande parte das análises de Hg, obrigada a todos os integrantes do Lab, em especial: Célinha, Marília Mussy, Cristina, Walkimar, Igor, Melissa e demais...

Aos meus maravilhosos orientadores – Dra Fabíola, Dr Bruce, Dra Dani e Dr Wanderley – que me apoiaram, ensinaram e foram muito pacientes comigo, principalmente no final da dissertação. Obrigada por acreditarem e confiarem em mim. Vocês foram ótimos, cada um colaborou de maneira única e me sinto muito abençoada por ter tido cada um de vocês em minha jornada acadêmica.

À dona Lúcia, por ter cedido seu flutuante para ser a base de campo. Muito obrigada por seu carinho, saiba que é recíproco. ☺ Também externo essa gratidão aos seus familiares que também me ajudaram e apoiaram, principalmente o Marechal, Neco e Evilásio.

Aos meus colegas de turma, que pessoas alegres. Sinto por não ter passado mais tempo com vocês, mas podem ter certeza que sempre me lembrarei com carinho de todos, vocês foram ótimas companhias durante as disciplinas. Também sou grata pelos colegas da turma de 2016, que tive a oportunidade de conhecer. Tivemos ótimos momentos juntos, principalmente na disciplina de Ecologia de Área Alagáveis.

Ao Luigi, da turma de 2017 do BADPI, por ter me ajudado a rodar a PCA no “R”. Também agradeço ao doutorando Sérgio por ter disponibilizado seu tempo para me ajudar com algumas dúvidas no “R” e pela “troca de ideias”. ☺

Ao Urbano Lopes pela ajuda com a parte estatística.

Ao Brendson, pela ajuda inicial com dicas e materiais para eu estudar para a seleção do mestrado. Muito obrigada pela ajuda, mesmo a distância; todas as vezes que eu o procurarei no decorrer desses anos sempre me atendeu.

Ao Marcio R. Miranda, que me orientou na graduação e me incentivou a fazer o mestrado, bem como me ajudou no contato inicial com uma de minhas orientadoras (Dra Fabíola).

Aos amigos que ficaram em Porto Velho (RO) me apoiando de longe e a todos os amigos que fiz aqui em Manaus e à maravilhosa família que ganhei através da Odineas, que me acolheu tão bem e tem sido uma mãe e amiga.

A minha amiga Bruna, com quem morei nestes dois anos. Obrigada pelos momentos de risos, pelo incentivo e tudo mais que você já fez por mim.

Aos gestores, pedagogas e colegas professores das escolas onde leciono que foram muito flexíveis comigo quando precisei me ausentar da escola para me dedicar a algumas atividades do mestrado.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram e torceram por mim: MUITO OBRIGADA. Sem dúvidas eu tive muitos anjos na forma de pessoas que auxiliaram de diferentes maneiras.



## RESUMO

O mercúrio é encontrado nos rios e lagos amazônicos e pode ser derivado de fontes naturais e antrópicas. Este elemento é tóxico para a biota em qualquer de suas formas químicas. No entanto, a forma orgânica metilmercúrio (MeHg) é considerada a mais tóxica, bioacumula mais facilmente nos organismos e biomagnifica ao longo da cadeia trófica. Muitos peixes amazônicos possuem concentrações elevadas de MeHg, porém as informações acerca dos efeitos dessa exposição crônica são escassas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica temporal e espacial da concentração de metilmercúrio na água e no sedimento, sua bioacumulação e efeitos toxicológicos em peixes do Lago Janauacá, Amazonas. Oito locais do lago foram amostrados, seguindo um gradiente de distância do Rio Solimões, quatro situados na região norte e quatro na região sul do lago. Em cada local, foram realizadas amostragens nos períodos de seca e cheia para mensuração de parâmetros limnológicos e coleta de água e sedimento. Peixes foram coletados somente na seca e incluíram as espécies: *Pterygoplichthys pardalis*, *Hoplias malabaricus* e *Cichla* spp. Foram analisadas as concentrações de metilmercúrio na água, no sedimento e no tecido muscular dos peixes. Peixes também foram analisados para biomarcadores de efeito genotóxicos (frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias), histopatológico (índice de lesão no fígado) e bioquímico (concentração de metalotioneína). O carbono orgânico dissolvido correlacionou positivamente com as concentrações de MeHg na água durante a seca e a cheia, enquanto o oxigênio dissolvido, o pH e a condutividade elétrica correlacionaram negativamente com as concentrações de MeHg na água apenas na cheia. As maiores concentrações de MeHg na água (0,68 a 1,21 ng/L) foram observadas na região sul do lago e no hipolímnio do lago durante a cheia. As concentrações de MeHg no sedimento (0,20 a 0,56 µg/kg) foram semelhantes em todo o lago e ligeiramente maiores durante a cheia. Enquanto as concentrações de MeHg em *P. pardalis* (0,02±0,01 mg/kg) e *Cichla* spp. (0,66±0,31 mg/kg) foram similares em todos os pontos de amostragem, os níveis de MeHg em *H. malabaricus* (0,66±0,29 mg/kg) foram maiores na região sul do lago. Não foram observados micronúcleos e as frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias foram baixas (0,07±0,17% e 0,26±0,19%, respectivamente) em *P. pardalis* e em *H. malabaricus* (não avaliadas em *Cichla* spp.). A concentração de metalotioneína (2,50±0,90 µg/mg prot) e os índices de lesão hepática em *H. malabaricus* (22±4) foram maiores na região sul do lago. A região sul do lago é mais propícia à metilação do mercúrio pois concentrações de MeHg mais elevadas na água e em *H. malabaricus* foram observadas nesta região. Os efeitos tóxicos observados por meio dos biomarcadores podem não ter sido causados exclusivamente pelo MeHg, podendo haver influência de outro estressor ambiental na região sul do lago. Esses resultados mostram que a dinâmica e a bioacumulação do metilmercúrio podem variar entre diferentes áreas de um mesmo lago amazônico de acordo com a proximidade e conexão com o canal do rio principal, com o tipo de água, profundidade, área e conexão com áreas de terra firme e de vegetação alagada.

Palavras-chave: metal, mercúrio, biomarcadores, estratificação, Rio Solimões, lago de várzea, matéria orgânica

## ABSTRACT

Mercury is encountered in the Amazon rivers and lakes and can be derived from both natural and anthropogenic sources. This element is toxic for biota in any of its chemical forms. However, the organic form, methylmercury (MeHg), is considered the most toxic, bioaccumulates more easily and biomagnifies along the food chain. Many Amazonian fishes have elevated MeHg concentrations; however information on the effects of chronic mercury exposure is scarce. Therefore, the aim of this study was to evaluate the temporal and spatial dynamics of methylmercury concentrations in water and sediment, and its bioaccumulation and toxicological effects in fish of Janauaca Lake, Amazonas. Samples were collected at eight sites on the lake, located at different distances from the Solimões River, four in the northern part of the lake and four in the southern part. Water, sediments and limnological parameters were sampled at each site, during the low-water and high-water seasons. Fish were only collected at low water and included the species: *Pterygoplichthys pardalis*, *Hoplias malabaricus* and *Cichla* spp. Water, sediment and muscle tissue of fishes were analyzed for methylmercury. Fish were also assayed for biomarkers of genotoxic (frequency of micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities), histopathological (index of liver lesion) and biochemical effects (metallothionein concentration). Dissolved organic carbon was positively correlated with MeHg concentrations in water in both seasons, while dissolved oxygen, pH and electrical conductivity were negatively correlated with MeHg concentration in water only during the high-water season. The highest MeHg concentrations in water (0,68 a 1,21 ng/L) were observed in the southern part of the lake and in the hypolimnion at high-water. The MeHg concentrations in the sediment (0,20 a 0,56 µg/kg) were similar throughout the lake and slightly higher during the high-water season. While MeHg concentrations in *P. pardalis* (0,02±0,01 mg/kg) and in *Cichla* spp. (0,66±0,31 mg/kg) were similar at all sampling points, MeHg levels in *H. malabaricus* (0,66±0,29 mg/kg) were higher in the southern part of the lake,. Micronucleus were not observed and the frequency of erythrocyte nuclear abnormalities was low (0,07±0,17% e 0,26±0,19%, respectively) in both *P. pardalis* and in *H. malabaricus* (*Cichla* spp. was not evaluated). Metallothionein concentrations (2,50±0,90 µg/mg prot) and the index of hepatic lesion in *H. malabaricus* (22±4) were highest in the south part of the lake. The higher MeHg concentrations observed in water and *H. malabaricus* in the southern part of the lake indicated that the environmental conditions in this region are more conducive to methylation. The toxic effects observed with biomarkers may not have been caused exclusively by methylmercury. Other environmental stressor in the south region of the lake may also be involved. These results demonstrate that the dynamics and bioaccumulation of methylmercury can vary between regions in the same Amazonian lake, depending on proximity and connection to the river main channel, water type, depth, area and connection with upland and wetland environments.

Keywords: metal, mercury, biomakers, stratification, Solimões River, floodplain lake, organic matter

<b>SUMÁRIO</b>	
<b>AGRADECIMENTOS</b>	6
<b>RESUMO</b>	9
<b>ABSTRACT</b>	10
<b>LISTA DE TABELAS</b>	13
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	14
<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>1. OBJETIVOS</b>	23
1.1. OBJETIVO GERAL	23
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	24
2.1. ÁREA DE ESTUDO	24
2.2. AMOSTRAGEM DE CAMPO E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS	25
2.2.1. Água	26
2.2.2. Sedimento	27
2.2.3. Peixes	27
2.2.4. Biologia das espécies	27
2.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	31
2.3.1. Análise de carbono orgânico dissolvido	31
2.3.2. Análise de metilmercúrio	31
2.3.3. Controle de qualidade analítica	32
2.3.4. Análise de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias	32
2.3.5. Análises histológicas	33
2.3.6. Análises bioquímicas	33
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
<b>3. RESULTADOS</b>	35
3.1. DINÂMICA DO METILMERCÚRIO NO AMBIENTE	35
3.1.1. Descrição das condições limnológicas	35
3.1.2. Relação ente as variáveis limnológicas e a concentração de metilmercúrio na água	36
3.1.3. Relação ente as variáveis limnológicas e a concentração de metilmercúrio no sedimento	38
3.1.4. Controle de qualidade analítica	39
3.1.5. Concentração de metilmercúrio na água	40
3.1.6. Concentração de metilmercúrio no sedimento	41

3.2.	BIOACUMULAÇÃO DE METILMERCÚRIO NOS PEIXES .....	42
3.3.	BIOMARCADORES .....	45
3.3.1.	Anormalidades nucleares eritrocitárias .....	45
3.3.2.	Metalotioneína .....	46
3.3.3.	Histopatologia .....	47
4.	DISCUSSÃO .....	49
4.1.	DINÂMICA DO METILMERCÚRIO NO AMBIENTE.....	49
4.2.	BIOACUMULAÇÃO DE METILMERCÚRIO NOS PEIXES.....	52
4.3.	BIOMARCADORES .....	55
4.3.1.	Anormalidades nucleares eritrocitárias .....	55
4.3.2.	Metalotioneína .....	60
4.3.3.	Histopatologia .....	61
	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS .....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis limnológicas mensuradas na superfície e fundo do Lago Janauacá nos períodos de seca e cheia.....	36
Tabela 2. Correlação entre diferentes variáveis limnológicas com as concentrações de metilmercúrio na água do Lago Janauacá.....	38
Tabela 3. Correlação entre diferentes variáveis limnológicas com as concentrações de metilmercúrio no sedimento do Lago Janauacá. ....	38
Tabela 4 Resultados das medidas de controle de qualidade analítica para as análises de metilmercúrio no sedimento e nos peixes do Lago Janauacá. ....	39
Tabela 5 Resultados das medidas de controle de qualidade analítica para as amostras de água.....	40
Tabela 6. Concentração de metilmercúrio (ng/L) na água do Lago Janauacá.....	40
Tabela 7. Concentração de metilmercúrio (µg/ kg) no sedimento do Lago Janauacá....	42
Tabela 8. Número de espécimes de cada espécie de peixe analisados por local de amostragem no Lago Janauacá. ....	43
Tabela 9. Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias nos peixes da espécie <i>Pterygoplichthys pardalis</i> nos locais amostrados na região norte do Lago Janauacá. ...	46
Tabela 10. Frequências espontâneas de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias obtidas de tratamentos controles em laboratório e estudos de campo.....	56
Tabela 11. Ocorrência (%) de peixes com alterações segundo classificação proposta para os valores de índices de lesão. ....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa do Lago Janauacá no período de cheia evidenciando os locais de amostragem.....	24
Figura 2 Espécime de <i>Pterygoplichthys pardalis</i> .....	28
Figura 3 Espécime de <i>Hoplias malabaricus</i> .....	29
Figura 4 Espécimes de <i>Cichla</i> spp.....	30
Figura 5 Análise de componentes principais dos parâmetros.....	37
Figura 6 Análise de componentes principais dos parâmetros.....	39
Figura 7 Concentração de metilmercúrio (MeHg) na água superficial do Lago Janauacá nos períodos de seca e cheia. ....	41
Figura 8 Concentração de metilmercúrio (MeHg) na água do hipólímnio do Lago Janauacá no período de cheia. ....	41
Figura 9 Concentração de metilmercúrio (MeHg) no sedimento do Lago Janauacá nos períodos de seca e cheia.....	42
Figura 10 Correlação entre a concentração de metilmercúrio e o comprimento padrão em <i>Pterygoplichthys pardalis</i> .....	43
Figura 11 Correlação entre a concentração de metilmercúrio e o comprimento padrão em <i>Hoplias malabaricus</i> . ....	44
Figura 12 Correlação entre a concentração de metilmercúrio e o comprimento padrão em <i>Cichla</i> spp.....	44
Figura 13 Concentração de metilmercúrio (MeHg) no músculo dos peixes das espécies <i>Pterygoplichthys pardalis</i> , <i>Cichla</i> spp. e <i>Hoplias malabaricus</i> em diferentes regiões do Lago Janauacá.....	45
Figura 14 Anormalidades nucleares eritrocitárias observadas nos espécimes de peixe de <i>Pterygoplichthys pardalis</i> .....	46
Figura 15 Concentração de metalotioneína (MT) no fígado dos peixes das espécies <i>Pterygoplichthys pardalis</i> , <i>Cichla</i> spp. e <i>Hoplias malabaricus</i> em diferentes regiões do Lago Janauacá.....	47
Figura 16 Alterações observadas no tecido hepático dos peixes avaliados.....	48
Figura 17 Índices de lesão hepática em <i>Pterygoplichthys pardalis</i> , <i>Cichla</i> spp. e <i>Hoplias malabaricus</i> em diferentes regiões do Lago Janauacá.. ....	49

## INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) ocorre naturalmente e é disperso no ambiente por processos naturais (e.g., intemperismo, degaseificação da crosta e atividade vulcânica) e antrópicos (e.g., atividades industriais diversas e mineração de ouro). Em algumas áreas da região Amazônica houve uma intensa atividade de garimpo de ouro entre as décadas de 70 e 80 e o mercúrio foi muito utilizado nos processos de amalgamação para extração do ouro. Durante muito tempo, a presença do mercúrio nos ambientes amazônicos foi atribuída a esta atividade (MARTINELLI et al., 1988; PFEIFFER & LACERDA, 1988; MALM, et al., 1990). Porém estudos realizados no Rio Negro e outros lugares distantes das áreas de garimpo mostraram que o mercúrio presente na região também tem uma origem natural no solo e que o mercúrio associado a esta fonte é liberado para os ambientes aquáticos através dos processos de erosão e lixiviação (ROULET & LUCOTTE, 1995; FOSTIER, 1999; ROULET et al., 1999; FADINI & JARDIM, 2001; FARELLA et al., 2001).

O mercúrio pode ser encontrado em diferentes formas orgânicas (e.g., metilmercúrio) e inorgânicas (e.g., mercúrio iônico). As espécies químicas naturais de mercúrio mais comuns que são encontradas no meio ambiente são o mercúrio metálico ( $\text{Hg}^0$ ), sulfeto de mercúrio ( $\text{HgS}$ ), cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) e metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) (MOREL et al., 1998; WIENER et al., 2002). No ambiente aquático, o mercúrio ocorre predominantemente como  $\text{Hg}^{2+}$  (íon mercúrico) que pode ser adsorvido ao material particulado e precipitar no sedimento ou pode ser convertido para metilmercúrio ( $\text{MeHg}$ ) por processos abióticos e bióticos e ser incorporado mais facilmente pelos peixes através da cadeia alimentar. Em comparação ao mercúrio inorgânico, a formação do composto orgânico metilmercúrio aumenta a mobilidade e dispersão do Hg no sistema aquático (WIENER et al., 2002). O metilmercúrio é uma espécie química com reduzida afinidade com as superfícies minerais do sedimento. Assim, o metilmercúrio produzido é liberado para a coluna d'água e pode entrar na cadeia trófica por rápida difusão sendo rapidamente acumulado e biomagnificado, atingindo altas concentrações nos tecidos dos peixes do topo de cadeia (MOREL et al., 1998; WIENER et al., 2002).

Algumas variáveis ambientais podem modificar a forma química do mercúrio, e com isso influenciar a sua disponibilidade no ambiente aquático e bioacumulação pela biota. Belger e Forsberg (2006) encontraram correlação positiva entre a concentração de mercúrio em *H. malabaricus* na bacia do Rio Negro com o pH e

com o carbono orgânico dissolvido na água. Silva-Forsberg et al. (1999) detectaram correlações negativa e positiva, respectivamente, entre a concentração de mercúrio em cabelos de ribeirinhos, que possuem um alto consumo de peixe, com o pH e com o carbono orgânico dissolvido na água de diferentes tributários da bacia Amazônica, sendo que na bacia do Rio Negro foram encontradas as maiores concentrações de mercúrio.

Belger e Forsberg (2006) observaram também uma correlação positiva entre a concentração de mercúrio em *Hoplias malabaricus* e a porcentagem de áreas alagáveis. As áreas alagáveis são consideradas ambientes propícios para a metilação do Hg. As áreas alagáveis amazônicas associadas aos grandes rios são definidas como ambientes que recebem, periodicamente, o aporte lateral de águas desses rios devido a flutuação anual de seus níveis (JUNK, 1997). Estas áreas cobrem 6% da Amazônia brasileira, isto é, cerca de 300.000 km<sup>2</sup>, e são classificadas, conforme sua fertilidade, em várzeas (4%) e igapós (2%) (IRION et al., 1997). As várzeas são as áreas de maior fertilidade e são habitadas por 90% da população rural do Amazonas. Os igapós são, em contraste, pobres em nutrientes inorgânicos, ricos em material orgânico dissolvido e suas águas são extremamente ácidas, com cor clara ou mais frequentemente, preta (IRION et al., 1997; VAL et al., 2010; PIEDADE et al., 2012).

Processos e padrões ecossistêmicos nas áreas alagáveis amazônicas são determinados pelas flutuações anuais de nível da água e pela alternância entre as fases de seca (águas baixas) e cheia (águas altas). Os rios contribuem com a transferência de substâncias dissolvidas, nutrientes e sedimentos entre o canal principal e a planície de inundação e afetam a quantidade de compostos que são transportados a partir do solo para os corpos d'água, estando esses processos associados à influência dos regimes hidrológicos, variações sazonais e processos de erosão e deposição de sedimentos (DUNNE et al., 1998).

As mudanças entre as condições terrestres para as aquáticas nas planícies fluviais levam a alterações nos processos biogeoquímicos (MELACK & FORSBERG, 2001; MELACK et al., 2009). Durante a inundação, há uma entrada de material orgânico alóctone e uma grande produção de material autóctone no sistema aquático, o que, em combinação com a estratificação termal, resulta em condições anóxicas na parte inferior da coluna d'água (TUNDISI et al., 1984; MELACK & FORSBERG, 2001). Estas condições, associadas à alta diversidade natural da qualidade da água (por exemplo, pH, turbidez, concentração de carbono dissolvido), e composição de habitats, tornam os sistemas fluviais amazônicos uma área interessante e desafiadora para o estudo dos ciclos



biogeoquímicos naturais. Devido a pulsação do aporte de água fluvial, as várzeas apresentam uma alta dinâmica espacial e temporal das variáveis físicas e químicas que podem exercer forte influência na formação de metilmercúrio e sua disponibilidade para a biota.

#### USO DE BIOMARCADORES

O mercúrio é um elemento traço com distribuição global e extremamente tóxico aos organismos (BASTOS & LACERDA, 2004; MIRANDA et al., 2007). Não possui nenhuma função fisiológica para o organismo humano, uma vez que em qualquer uma das formas que se apresenta é tóxico para os seres vivos (OPAS, 2011). No ambiente, tende a distribuir-se nos diversos compartimentos, sedimento, água e biota. Por sua vez, a biota aquática é capaz de concentrar os metais em várias ordens de grandeza acima das concentrações encontradas na coluna d'água (MACKAY, 1982; PHILLIPS, 1993; CARMO et al., 2011). Muitos organismos, incluindo os peixes, apresentam um forte potencial para bioconcentrar níveis elevados de metais a partir de seu ambiente (JOBLING, 1995; HANDY, 1996).

O acúmulo de metais nos peixes ocorre através da absorção pela superfície do tegumento (pele e escamas), pela via respiratória, através das brânquias e principalmente, através da alimentação (ROESIADI & ROBINSON, 1993; BARRON, 1995; CHOVANEC et al., 2003). O tamanho, hábito alimentar, peso, idade, o comprimento e as características de cada espécie de peixe, são fatores que influenciam na capacidade de acumulação (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003; GOMES & SATO, 2011). Além destes fatores alguns autores também citam a influência da taxa de absorção e de eliminação na bioacumulação de metais nos tecidos de peixes (HEATH, 1995; MONTEIRO et al., 2010).

Os efeitos de contaminantes em peixes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações bioquímicas, genotóxicas, estruturais em órgãos e tecidos e modificações comportamentais que podem levar a prejuízos no crescimento e até na reprodução (ADAMS et al., 1989; BAATRUP, 1991; CAVALCANTE, 2009; MONTEIRO et al., 2010). Quando ocorre uma exposição intensa dos organismos a poluentes, uma cascata de respostas fisiológicas pode ocorrer (SHUGART, 1990). Os efeitos tóxicos de metais nos ecossistemas aquáticos podem variar desde uma perda completa da biota até efeitos sutis na taxa de reprodução, crescimento e mortalidade da população (HODSON, 1988; CHOVANEC et al., 2003).

Estas respostas biológicas ao estresse provocadas pelos poluentes podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos organismos e podem ser denominadas biomarcadores (BENSON et al., 1990; HANSEN, 2003). Os biomarcadores são respostas biológicas (desde o nível molecular até comportamental) dos organismos quando são expostos a algum agente poluente (MCCARTY & MUNKITTRICK, 1996; VAN DER OOST et al., 2003). Os biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde dos ecossistemas aquáticos e têm sido incluídos em vários programas de monitoramento ambiental em países desenvolvidos (MCCARTHY & SHUGART, 1990; MCCARTY & MUNKITTRICK, 1996; BURGEOT et al., 2001; LAM & GRAY, 2003; BARTELL, 2006; HAGGER et al., 2008; LAM, 2009). Uma das principais vantagens da utilização de biomarcadores é que eles podem fornecer informação sobre os efeitos biológicos de poluentes, em vez de uma simples quantificação dos níveis ambientais (VAN DER OOST et al., 2003). As duas características mais importantes dos biomarcadores são: 1ª) permitir a identificação das interações que ocorrem entre os contaminantes e organismos vivos; 2ª) possibilitar medir os efeitos sub-letais, permitindo por em prática ações preventivas (SCHLENK et al., 2008; JESUS & CARVALHO, 2008).

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo (HANSEN, 2003). Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição química. Podem ter como objetivo avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna), os efeitos das substâncias químicas ou a suscetibilidade individual (MELANCON, 1995; AMORIM, 2003; AITIO et al., 2007). Existem diversos biomarcadores em peixes, entre eles podem ser citados a biotransformação de enzimas, parâmetros do estresse oxidativo, produtos de biotransformação, proteínas de estresse, metalotioneína, parâmetros hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endocrinológicos, genotóxicos, neuromusculares, fisiológicos, histológicos e morfológicos (VAN DER OOST et al., 2003).

Os biomarcadores podem fornecer uma indicação do estado de saúde dos organismos aquáticos, como os peixes, antes que eventos de mortalidade venham a ocorrer. Como exemplo, biomarcadores bioquímicos apresentam respostas extremamente rápidas e sua detecção pode contribuir para evitar que efeitos mais graves como alterações reprodutivas possam ocorrer. A possibilidade de monitorar o ambiente antes de ocorrerem consequências reprodutivas ou letais para os organismos ou para a comunidade representa

uma grande vantagem (SANDERS, 1990; WALKER & SAVVA, 2001). Os biomarcadores são respostas biológicas sensíveis na determinação do grau de impacto na saúde da biota (MCCARTY & SHUGART, 1990).

Dentre os biomarcadores de contaminação ambiental, o teste de micronúcleo em hemácias tem sido utilizado para detectar a exposição ambiental de peixes a genotoxinas (BOMBAIL et al., 2001). Micronúcleos são pequenos corpos contendo DNA que podem estar presentes próximo ao núcleo da célula, os quais são formados por fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal após a anáfase durante a divisão mitótica (AL-SABTI & METCALFE, 1995; NUNN et al., 1996; FENECH, 2000). A formação pode ocorrer de forma espontânea ou induzida por variações ambientais e poluição (AL-SABTI & METCALFE, 1995). A avaliação de micronúcleos pode ser aplicada em vários tecidos de diversos animais como sangue de peixes e hemolinfa de moluscos para o monitoramento de agentes genotóxicos em ambientes aquáticos (BOMBAIL et al., 2001). A avaliação de micronúcleos em amostras de sangue periférico é indicada para condições de exposição crônica, como por exemplo em estudos ecotoxicológicos (UDROIU, 2006).

A avaliação de micronúcleos (MN) tem sido aplicada, com sucesso, em eritrócitos de peixes, pois sendo nucleados, os micronúcleos podem ser marcados facilmente, como um resultado de atividade clastogênica (AL-SABTI & METCALFE, 1995; MATSUMOTO et al., 2006). Outras vantagens para o uso dos eritrócitos são a facilidade de obtenção dessas células; a taxa mitótica relativamente alta do tecido hematopoiético, o qual oferece uma rápida resposta mutagênica em relação a exposição a xenobióticos; e a facilidade na preparação de lâminas por meio de esfregaço sanguíneo (AL-SABTI & HARDIG, 1990; BOLOGNESI et al., 2006).

Em conjunto com a contagem de micronúcleos a avaliação de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) também tem sido considerada uma boa indicadora de genotoxicidade (AYLLON & GARCIA-VAZQUEZ, 2000; ÇAVAS, 2008; ROCHA et al., 2009). Embora ainda não sejam bem compreendidos todos os mecanismos que estejam envolvidos no surgimento de células com o formato do núcleo alterado (ÇAVAS & -GÖZÜKARA, 2003), diferentes pesquisadores observaram alta incidência de ANE em peixes expostos a diferentes poluentes (FERRARO et al., 2004; BARŠIENE et al., 2006; FALFUSHYNSKA et al., 2011; MURANLI & GÜNER, 2011). Segundo Baršienė et al. (2015) deve ser levado em consideração que a resposta obtida por meio do MN é um marcador transitório dependente da mitose enquanto algumas anormalidades

nucleares podem ser usadas como uma ferramenta expressa para a avaliação da genotoxicidade em células que não estão em divisão e poderiam refletir os efeitos iniciais a agentes genotóxicos.

Geralmente, as alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de indicadores biológicos de efeito (SCHLENK, 1999; DIZER et al., 2001). Se considerarmos que estas alterações precedem um dano estrutural, a detecção destas alterações biológicas permite a identificação precoce de uma exposição excessiva e intervenção para prevenir um efeito irreversível ou uma doença (ADAMS, 1989; OLSSON, 1996; AMORIM, 2003).

Vários estudos têm utilizado a quantificação de metalotioneínas (MT) como biomarcador para avaliar o possível impacto dos metais nos ecossistemas aquáticos. As MT são uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular, em torno de 6 a 7 KDa, e sua estrutura molecular é composta de uma única cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas, que representam em torno de 30% do total de aminoácidos (VIARENGO et al., 2001). A abundância de ligantes tiol nos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere à proteína uma alta afinidade por íons metálicos livres, o que faz das MT, proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico. A possibilidade da utilização de MT como biomarcador da exposição a metais tem sido estudada e empregada em diferentes espécies de animais aquáticos (GARVEY, 1990; VIARENGO et al., 1997; FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2005; CRETÌ et al., 2010).

A histologia também representa uma ferramenta sensível e muito utilizada para se diagnosticar efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetem tecidos animais (MUHVICH et al., 1995; TEH et al., 1997; THOPHON et al., 2003; DOMINGOS et al., 2009; GUARDIOLA et al. 2013). Isoladamente, a histopatologia estuda lesões em níveis teciduais não especificando a causa pontual da lesão, ou seja, não diagnostica contaminação, mas é uma ferramenta que indica uma agressão ao estresse (BERNET et al., 2004). No entanto, quando associados a outros métodos de análises, estudos histopatológicos podem auxiliar na compreensão profunda de determinadas situações (STENTIFORD et al., 2003). Para isso, a escolha dos órgãos que serão alvos de estudo é crucial para a relevância dos dados obtidos. Um órgão envolvido com o metabolismo de detoxificação de xenobióticos, como o fígado, pode indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos animais (BERNET et al., 1999; GERNHÖFER et al., 2001; AU, 2004; LINS et al., 2010; AGAMY, 2012).

As análises químicas de amostras ambientais não são apropriadas na indicação e predição dos efeitos deletérios causados por contaminantes na biota, mas são importantes para a caracterização da exposição aos elementos-traço (HEATH, 1995; YARSAN & YIPEL, 2013). Diante da importância dos biomarcadores nos estudos ecotoxicológicos é recomendada a utilização de vários tipos de biomarcadores, pois a avaliação de uma única resposta biológica pode não refletir de forma ampla os danos à saúde dos organismos vivos (MOORE & SIMPSON, 1992; MELANCON, 1995; PACHECO & SANTOS, 2002a,b; FREIRE et al., 2008). Desta forma, para avaliar os impactos dos poluentes na qualidade ambiental é pertinente que sejam mensurados os efeitos que estas substâncias causam nos organismos vivos (BOLOGNESI & HAYASHI, 2011; FREIRE, 2008). No presente estudo foi possível mensurar a concentração de metilmercúrio a qual os organismos estão expostos e avaliar o estado geral de saúde dos peixes. O uso combinado de biomarcadores de efeito e exposição foi extremamente importante para a correta interpretação dos dados, pois um diagnóstico de intoxicação por metais a partir de biomarcadores pode ser feito apenas se os efeitos observados estão, de fato, associados a uma exposição excessiva ou a valor do metal quantificado no organismo (AITIO et al., 2007).

Nas últimas décadas as avaliações clássicas dos efeitos biológicos de substâncias químicas nos organismos aquáticos têm se baseado nos resultados de experimentos de exposição a poluentes em laboratório (AL-SABTI, 1994; ARKHIPCHUK & GARANKO, 2005; RABITTO et al., 2005; MILLER et al., 2007; MONTEIRO et al., 2010; VALDEZ DOMINGOS et al., 2011; AHMED et al., 2013; HEDAYATI, 2013; KOCHHANN et al., 2015). Esses estudos são importantes para avaliar as relações entre poluentes e seus efeitos e podem ser muito úteis para entender os efeitos de poluentes em ambientes naturais. No entanto, a avaliação das respostas biológicas dos peixes no seu ambiente natural é mais rara e indica o estresse do organismo àquele ambiente. Portanto, esta é uma lacuna que ainda deve ser preenchida.

Os peixes são geralmente considerados como excelentes organismos bioindicadores para monitoramento de poluição em sistemas aquáticos (VAN DER OOST, BEYER, & VERMEULEN, 2003). Os peixes são comumente usados como sentinelas devido à sua posição chave na cadeia trófica e seu elevado valor comercial (BOLOGNESI & HAYASHI, 2011). Embora os peixes sejam uma fonte de proteínas também atuam como uma via de contaminação de elementos tóxicos para os seres humanos (AL-SABTI & METCALFE, 1995; FREIRE, 2008). Como estes organismos

podem responder aos agentes tóxicos de maneira similar aos vertebrados superiores, é interessante utilizá-los para a avaliação de substâncias potencialmente perigosas aos humanos (TORRES DE LEMOS et al., 2001; BOLOGNESI & HAYASHI, 2011). Segundo Chovanec, et al. (2003) os peixes são bioindicadores com ciclo de vida longo que são sensíveis ao impacto de uma complexa mistura de agentes químicos em um ecossistema aquático específico, integrando a carga ambiental ao longo do tempo e espaço.

Na região Amazônica, e em todo o mundo, o mercúrio é um elemento muito estudado. Tem sido observado que diferentes espécies de peixes amazônicos podem apresentar concentrações de Hg consideradas elevadas em ambientes aquáticos da Amazônia (MAURICE-BOURGOIN et al., 2000; KEHRIG et al., 2008; KASPER et al., 2012; SOUZA-ARAUJO et al., 2016). Alguns autores têm associado concentrações de mercúrio a efeitos prejudiciais deste metal por meio de biomarcadores genotóxicos e histológicos em peixes (PORTO et al., 2005; RABITTO et al., 2011; SILVA et al., 2012; FERREIRA, 2013).

Os ambientes amazônicos representam excelentes áreas de estudo por sua grande heterogeneidade morfológica, espacial e temporal. Essa gama de variações pode resultar em ambientes com diferentes graus de condições favoráveis a biogeoquímica do mercúrio e suas implicações para a biota aquática. Um estudo recente realizado por Brito et al. (2017) relatou estratificação da coluna d'água durante o período de cheia no Lago Janauacá e ocorrência de maiores concentrações de MeHg na água do hipolímnio dos ambientes de água aberta quando comparado com o epilímnio. Os autores argumentaram que a metilação poderia estar ocorrendo na água ou no sedimento e que as variações na morfometria do lago estariam controlando a estratificação e as concentrações de MeHg no lago durante o período de cheia.

É importante aumentar o conhecimento a respeito da dinâmica do mercúrio e suas implicações para os organismos em lagos de várzea da Amazônia. O Lago Janauacá representa uma excelente área de estudo para este fim e essa dissertação visou ampliar o conhecimento a respeito das áreas do lago sujeitas à estratificação, avaliar se há associação entre as áreas de estratificação e a bioacumulação e seus possíveis efeitos tóxicos em peixes. Este conhecimento poderá ser útil para medidas futuras referentes à utilização dos recursos pesqueiros pela população humana bem como para a implementação de medidas de manejo e conservação do lago.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a dinâmica temporal e espacial do metilmercúrio na água e no sedimento, sua bioacumulação e efeitos em peixes do Lago Janauacá.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a influência de variáveis limnológicas, época do ano e local sobre a concentração de metilmercúrio na água e no sedimento do Lago Janauacá.
- Avaliar a influência da concentração de metilmercúrio na água e no sedimento sobre a bioacumulação em peixes do Lago Janauacá.
- Avaliar a influência da concentração de metilmercúrio no músculo dos peixes sobre os biomarcadores de efeito toxicológico.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo compreende o Lago Janauacá (Figura 1), localizado à 40 km de Manaus (AM). É um ambiente que ainda pode ser considerado como preservado apesar da presença de pequenas comunidades nas suas margens. O lago está situado na planície fluvial da margem direita do Rio Solimões. Sua região norte está conectada ao rio por um canal de aproximadamente 12 km de comprimento, enquanto que a região sul recebe principalmente a água de igarapés que são predominantemente de água preta. É um lago grande e possui 180 km<sup>2</sup> de área máxima alagável (FISHER & PARSLEY, 1979; MIRANDA, 2013). Na maior parte do ano apresenta estratificação térmica e química, especialmente em relação à concentração de oxigênio (MELACK & FISHER, 1990).

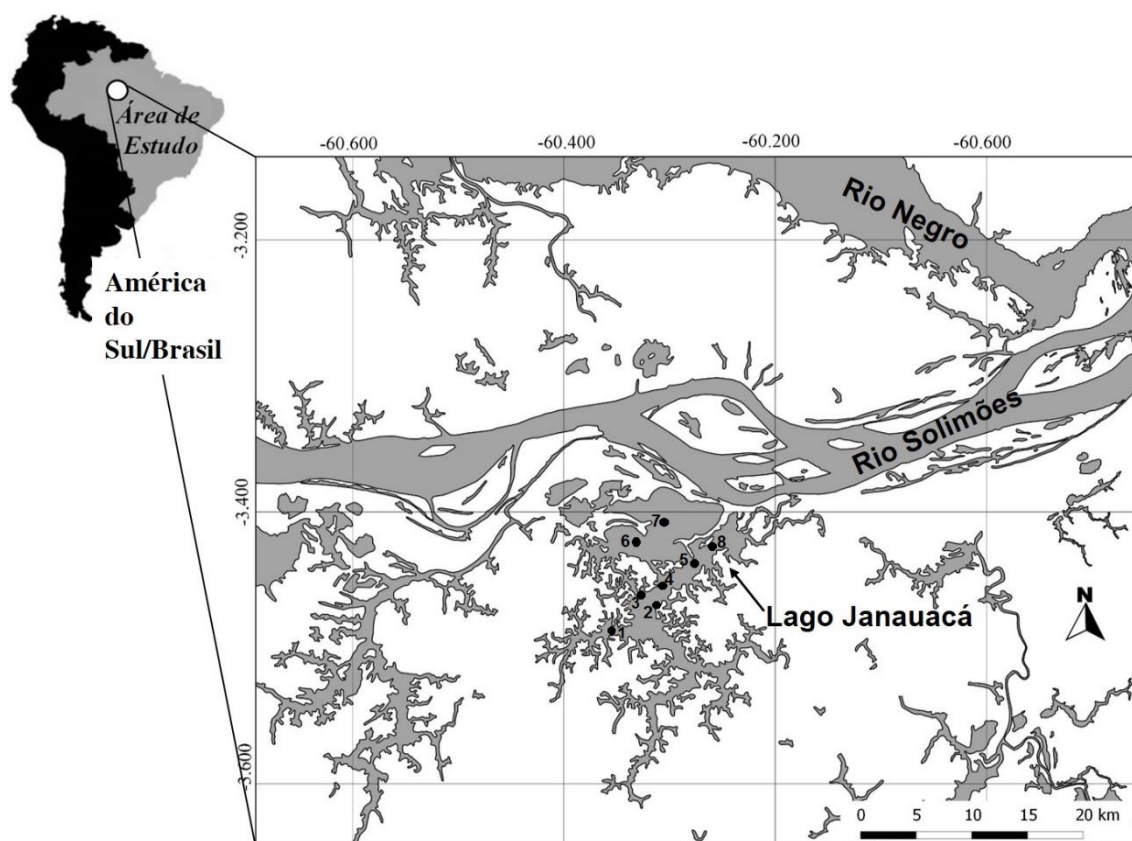


Figura 1 Mapa do Lago Janauacá no período de cheia evidenciando os locais de amostragem (1 a 8). Os locais de 1 a 4 foram classificados como sul e os locais de 5 a 8 como norte. Fonte: Adaptado de Brito et al. (2017).

O lago possui uma hidrologia e uma química complexas devido à contribuição variável de água e de componentes químicos do rio e da bacia local



(LESACK & MELACK, 1995; BONNET et al., 2017). Quando o nível da água está alto (e.g., final da enchente e início da vazante), água no lago é derivada predominantemente do rio e suas características químicas são relativamente uniformes e similares às do Rio Solimões. O volume e profundidade média do lago são maiores (e.g., atinge até 12 m) neste período e a estratificação termal é mais acentuada e duradora. Quando o nível da água está baixo (e.g., início da enchente e final da vazante), os igarapés da bacia local contribuem proporcionalmente mais do que no período de água alta, gerando um gradiente químico significativo entre as partes norte e sul do lago (FORSBERG et al., 1988; MELACK E FISHER, 1990; BONNET et al., 2017). O volume e profundidade do lago são menores (e.g., até 3 m) nesta época e a estratificação termal é mais fraca e instável (MELACK e FISHER, 1990).

O Lago Janauacá tem uma dinâmica hidrológica semelhante àquela observada em outros lagos da Amazônia e, portanto, representa bem estes sistemas (FISHER E PARSLEY, 1979). O lago está sob a influência contínua do pulso de inundação devido a conexão permanente com o Rio Solimões, recebendo uma grande carga de sedimentos, matéria orgânica e metais deste rio (FISHER E PARSLEY, 1979). Também está sujeito a variações sazonais nas suas características físico-químicas e no balanço de água e nutrientes devido a influência adicional da sua bacia local (FORSBERG et al., 1988). Além disso, o lago também recebe uma grande carga de material orgânico dos habitats vegetados associados. A distribuição e importância relativa destes habitats variam sazonalmente com o pulso de inundação. Durante o período da cheia, a área inundada do lago é ocupada por água aberta, floresta inundada, arbustos alagados e herbáceas aquáticas, enquanto que no período de seca a área alagada, agora reduzida, é ocupada principalmente por água aberta e herbáceas aquáticas (HESS, et al., 2003). No presente estudo, foi avaliada apenas a região de água aberta do lago. Porém essa região sofre forte influência dos habitats vegetados do entorno, que contribuem com material orgânico ao sistema, promovendo o desenvolvimento de condições hipóxicas a anóxicas na parte inferior da coluna de água.

## 2.2. AMOSTRAGEM DE CAMPO E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram selecionadas oito regiões amostrais, seguindo um gradiente de distância do rio, sendo que os locais 5 a 8 foram classificados como região norte e os locais 1 a 4 como região sul (Figura 1). O delineamento amostral (e.g., classificação dos locais) foi elaborado com base nos resultados encontrados por Brito et al. (2017) que

revelaram que a região sul do lago possui condições mais propícias à metilação do Hg do que a região norte, que por sua vez possui maior influência do Rio Solimões. Água e sedimento foram coletados no lago para investigar a importância destas matrizes no processo de contaminação dos peixes. Amostras de água e sedimento foram coletadas nos períodos de seca (Novembro/2015) e cheia (Julho/2016) para investigar a influência de mudanças sazonais em características químicas e no padrão de estratificação termal sobre a dinâmica de mercúrio. A coleta de peixes foi realizada apenas no período de seca (Novembro/2015) e incluiu uma espécie benthica (*Pterygoplichthys pardalis*, bodó) e duas pelágicas (*Hoplias malabaricus*, traíra e *Cichla* spp., tucunaré) para investigar os processos de contaminação por metilmercúrio nestes ambientes distintos.

### 2.2.1. Água

Amostras de água foram coletadas nos oito locais do lago com o auxílio de uma garrafa de Van Dorn ou com uma bomba peristáltica. As amostras foram acondicionadas em garrafas de vidro âmbar. Durante a coleta, foi seguido o protocolo “mãos sujas/mãos limpas”, Método 1669 (US-EPA 1996). A lavagem das garrafas antes da coleta foi realizada de acordo com o protocolo EPA-1630 (US-EPA 2001). Durante a seca, só foi coletada a água subsuperficial (15 cm da superfície) quando a coluna d’água era inferior a 1 m; em profundidades maiores ou iguais a 1 m, a água do fundo também foi coletada (profundidade a 10 cm do sedimento). Durante a cheia, a água subsuperficial e de fundo foram coletadas em todos os locais. No mesmo momento das coletas de água, foram mensurados os parâmetros físico-químicos: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica por meio de equipamentos multiparâmetros portáteis (Thermo Scientific). A transparência da água foi medida com um disco de Secchi. O oxigênio dissolvido e a temperatura foram medidos na coluna da água a cada 0,5 m na estação seca e a cada 3 m na estação cheia. Os demais parâmetros avaliados foram medidos apenas nos locais de coleta das amostras de água (na subsuperfície e no fundo).

Após a coleta, as amostras de água foram filtradas com filtros de fibra vidro (GF/F), previamente calcinados (450°C por 4 h). O conteúdo filtrado foi armazenado sob refrigeração em dois diferentes tipos de recipientes de acordo com a análise a ser realizada: i) frasco de vidro de 15 mL previamente calcinado (450°C por 4 h), para a análise de carbono orgânico dissolvido (COD); ii) garrafa de vidro âmbar (500 mL), previamente lavada como descrito acima, com septo de teflon para a análise de mercúrio. Foi adicionado HCl (2,5%) nas amostras destinadas à análise de mercúrio.

### **2.2.2. Sedimento**

As amostras de sedimento foram coletadas utilizando uma draga tipo Petersen. Esse equipamento permite a coleta da camada superficial e mais reativa do sedimento. A coleta foi realizada em três pontos equidistantes aproximadamente 150 m ao redor de cada local de coleta. Posteriormente, o sedimento foi homogeneizado e uma alíquota (e.g., uma amostra por ponto) foi armazenada em sacos plásticos e mantida congelada para posterior análise em laboratório.

### **2.2.3. Peixes**

Os peixes foram coletados em malhadeiras (50 a 100 mm entre nós) com auxílio de pescadores do local. Após a captura, os indivíduos foram mantidos em caixas isotérmicas com água do ambiente e aeração com bomba de oxigenação durante o transporte até a base de campo. Os animais foram anestesiados com benzocaína (100 mg/L). Os espécimes foram pesados e medidos (comprimento padrão e comprimento total). Amostras de sangue foram coletadas de cada animal a partir de corte do arco branquial. O sangue coletado com auxílio de seringa heparinizada foi transferido para lâminas histológicas por meio do método de esfregaço. Um fragmento de fígado foi retirado e imediatamente preservado em solução fixadora ALFAC (etanol 70%, formaldeído 4% e ácido acético glacial 5%) por 16 h para avaliação das alterações histopatológicas. Para análise de metalotioneína, foi retirada uma alíquota do fígado, que foi congelada em nitrogênio líquido até o transporte para o laboratório, onde foi armazenada em ultrafreezer (- 80 °C). Alíquotas de cerca de 15 g de músculo foram congeladas em freezer para a quantificação de metilmercúrio.

Alguns espécimes foram fixados em formol para confirmação de identificação e para tombamento como espécimes testemunho na Coleção de Peixes do INPA (Vouchers: INPA 52817; INPA 52818; INPA 52820; INPA 52821). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Conselho Nacional de Experimentação Animal e com a licença para coleta de peixes emitido pelo SISBIO (licença 29657-6).

### **2.2.4. Biologia das espécies**

A espécie *Pterygoplichthys pardalis* (Casltenau, 1855), popularmente conhecida como bodó, acari, acari-bodó e cascudo pertence à subfamília Hypostominae,

família Loricariidae e à ordem Siluriforme. Os indivíduos dessa espécie podem atingir até 50 cm e são distinguidos das outras espécies de bodó através do grande número de raios da nadadeira dorsal, que pode variar de 12 a 14. Como os demais membros da família Loricariidae, apresentam corpo roliço ou achatado em seção transversal e coberto por placas ósseas (Figura 2), formando três a cinco séries sobre o tronco, sendo cada uma munida de pequenas estruturas ósseas, bastante ásperas ao tato ou mesmo perfurantes, denominadas odontódios; região abdominal achatada ou plana; boca inferior; lábios expandidos em forma de ventosa e papilosos; uma ou mais fileiras de dentes delgados, fracamente implantados e quase sempre com duas cúspides assimétricas ou em forma de concha; um par de barbilhões curtos nos cantos da boca, na conexão entre os lábios superior e inferior; nadadeira adiposa, quando presente, com um raio curto e duro na borda anterior; pedúnculo caudal normalmente longo e comprimido; nadadeiras peitorais e dorsal munidas de um espinho (SANTOS et al., 2006).



Figura 2 Espécime de *Pterygoplichthys pardalis*.

*P. pardalis* é iliófago (e.g., detritívoro), alimenta-se de matéria orgânica particulada e microorganismos associados, como protozoários, fungos e bactérias. Ocorre em áreas de várzea, em lagos e margens de rios de águas brancas, habitando preferencialmente o fundo, em locais de substrato mole, composto por lama e detritos onde normalmente permanece imóvel ou se movimenta lentamente. Apresenta respiração aérea acessória, processada através do estômago, que tem forma de “U”, paredes extremamente finas e ricamente vascularizado na porção posterior. Como o estômago é um órgão respiratório acessório, não retém o alimento, atuando apenas como uma passagem para o intestino longo e enovelado. Quando o ambiente é bem oxigenado, o bodó tem uma respiração totalmente aquática, mas onde há pouco oxigênio, ele vem à tona para tomar o ar atmosférico. Foi observado que, fora d’água e com o corpo umedecido, essa espécie pode passar cerca de dois dias vivo (SANTOS et al., 2006).

*P. pardalis* é um peixe muito frequente no mercado de Manaus e regiões circunvizinhas; é muito utilizado para o preparo de caldeiradas. É comercializado vivo nas feiras e mercados e dele se aproveita tanto a carne quanto a ova, sendo que os teores de gordura são extremamente baixos (0,1% e 1,3%, respectivamente). Além de ser consumida in natura, sua carne também é aproveitada para a fabricação de farinha-de-peixe (piracuí), um produto muito utilizado na região (SANTOS et al., 2006).

A espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974.), popularmente conhecida como traíra, pertence à família Erythrinidae e à ordem Characiforme. Possui ampla distribuição geográfica. É um dos peixes mais comuns do Brasil, com ocorrência em todas as bacias hidrográficas e em todo tipo de ambiente, mesmo em áreas poluídas. É um peixe de porte grande, atinge até 40 cm (Figura 3). Apresenta corpo cilíndrico e escorregadio em função da intensa quantidade de muco produzido; coloração cinza-escura a amarronzada, às vezes com barras angulares ao longo dos flancos; nadadeiras com faixas formadas por pequenas manchas escuras e claras, alternadamente; cabeça robusta, bastante ossificada; escamas duras e lisas; nadadeira caudal arredondada; dorsal com 13 a 15 raios; dentes cônicos e caniniformes, de vários tamanhos e firmemente implantados em ambas as maxilas(SANTOS et al., 2006).



Figura 3 Espécime de *Hoplias malabaricus*.

*H. malabaricus* possui hábito alimentar carnívoro e alimenta-se de peixes e ocasionalmente de camarões e insetos aquáticos. Para obter alimentos, usa a tática de emboscada, e as presas são engolidas inteiras. Vive comumente em águas lânticas, como lagos, margens e remansos de rios e é capaz de suportar ambientes com baixíssimas concentrações de oxigênio (SANTOS et al., 2006).

A espécie de *H. malabaricus* tem uma grande importância na pesca de subsistência. Embora não esteja constantemente nos mercados, aparece com frequência

relativamente alta no período de seca, quando a pesca é mais acentuada nos lagos (SANTOS et al., 2006).

O tucunaré (*Cichla* spp.) pertence à família Cichlidae e à ordem Perciforme. Esse peixe possui as seguintes características: boca larga, mandíbula prostrátil e maxila exposta; nadadeira dorsal com um entalhe, sendo a primeira porção constituída por raios duros ou espinhos, em número de 12 a 15 e a segunda por raios moles, em número de 15 a 18; nadadeira anal com 3 espinhos e 10 a 11 raios moles e quase completamente cobertos por escamas. Existe grande variação no padrão de coloração dos tucunarés (Figura 4), com a presença de faixas verticais ou manchas (oceladas ou não) escuras, sobre um fundo amarelo-oliváceo; ventre claro, tornando-se avermelhado em alguns peixes na época da reprodução; um ocelo na base da nadadeira caudal em indivíduos a partir de 10 cm de comprimento (SANTOS et al., 2006).

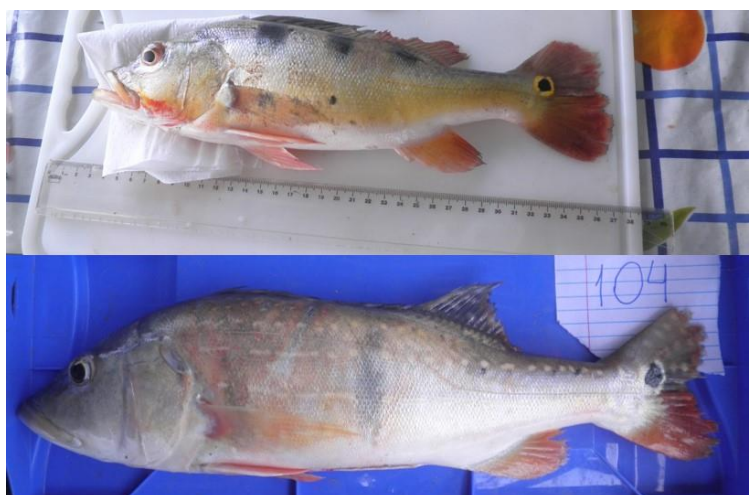


Figura 4 Espécimes de *Cichla* spp.

O tucunaré é piscívoro. As espécies *Cichla monoculus* e *Cichla temensis* além de consumirem peixes, consomem em menor escala, camarões, e eventualmente insetos. *C. monoculus* é sedentária e normalmente se refugia nas pausadas e galhadas submersas. O tucunaré é nativo da bacia amazônica e foi introduzido em quase todas as demais bacias hidrográficas do Brasil e de outros países das Américas do Sul, Central e do Norte. Como é um peixe voraz e de grande porte, é muito apreciado na pesca esportiva. É um dos cinco peixes mais importantes do mercado de Manaus; além disso, é uma espécie muito frequente, ocorrendo ao longo de todo o ano em todas as feiras. (SANTOS et al., 2006)

## 2.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

### 2.3.1. Análise de carbono orgânico dissolvido

As análises de COD foram realizadas pelo método de combustão a alta temperatura, com detecção do dióxido de carbono em um aparelho analisador de carbono total (TOC 500, Shimadzu).

### 2.3.2. Análise de metilmercúrio

#### 2.3.2.1. Água

A determinação de metilmercúrio foi obtida após as seguintes etapas: i) destilação com amônio 1-pirolidinaditiocarbomato (200 µL); ii) etilação aquosa com tetraetilborato de sódio (50 µL) na presença de solução tampão de acetato de sódio (300 µL); iii) quantificação por cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Fluorescência Atômica (CG-AFS, MERX, Brooks Rand Labs) de acordo com o método 1630 da EPA (US-EPA 2001).

#### 2.3.2.2. Sedimento

As amostras de sedimento foram peneiradas para a obtenção da fração <74µm, considerada a mais ativa fisicamente, por possuir maior área superficial em relação ao seu volume. Uma pequena alíquota dos sedimentos foi retirada, acondicionada em potes coletores de plástico rígido e liofilizada. A extração do MeHg foi baseada nos protocolos desenvolvidos por EPA 1630 (US-EPA 2001) e Pichet et al., (1999); foi pesado 0,5 g de sedimento e foi adicionado 3 mL de hidróxido de potássio 25% em meio metanol. As amostras foram aquecidas em estufa a cerca de 70°C durante 4 h. As amostras permaneceram dois dias em temperatura ambiente e realizaram-se a etilação aquosa do MeHg com tetraetilborato de sódio (50 µL) na presença de solução tampão de acetato de sódio (300 µL) para detecção e quantificação por CG-AFS.

#### 2.3.2.3. Peixes

A análise de MeHg foi realizada segundo a metodologia de EPA 1630 (US-EPA 2001) e Pichet et al. (1999). Foi adicionado 3 mL de hidróxido de potássio 25% em meio metanol à 0,1 g de amostra. Em seguida as amostras foram aquecidas em estufa à 70°C durante 6 h. As amostras permaneceram dois dias em temperatura ambiente e realizaram-se a etilação aquosa do MeHg com tetraetilborato de sódio (50 µL) na presença

de solução tampão de acetato de sódio (300 µL) para detecção e quantificação por CG-AFS.

### **2.3.3. Controle de qualidade analítica**

Para avaliar a precisão das metodologias analíticas, as amostras foram analisadas em duplicata. Foi considerado aceitável um coeficiente de variação de até 20% entre as réplicas de cada amostra. Para controle de contaminação, foram utilizados brancos dos reagentes e da garrafa utilizada na coleta de água. Para avaliar a exatidão analítica na análise de água, foi utilizada a técnica de adição de padrão (*Spike*), que consiste em adicionar à amostra de água uma concentração conhecida de metilmercúrio. Para avaliar a exatidão das metodologias de análise de sedimento e peixe foram utilizadas amostras de referência certificada, IAEA 356, BCR 463 (TUNA FISH). Todos os reagentes utilizados apresentam de grau analítico de alta pureza (Merck e Sigma) e todas as diluições foram realizadas utilizando água ultrapura.

### **2.3.4. Análise de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias**

A coloração das extensões sanguíneas foi realizada com Giemsa e tampão fosfato pH 5,6 (FERRARO et al., 2004). Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz com aumento de 1000X. Duas lâminas de cada indivíduo foram analisadas de forma cega por um único observador. A frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias foi determinada após a observação de 2000 eritrócitos periféricos por indivíduo (CARRASCO et al., 1990; UDROIU, 2006). Foram considerados como micronúcleos os corpos redondos ou ovais intracitoplasmáticos não ligados ao núcleo principal, com um diâmetro 1/30-1/3 do núcleo principal e no mesmo plano óptico (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975; FENECH, 2000; BOMBAIL et al., 2001).

Foram classificadas como ANE (anormalidades nucleares eritrocitárias), todos os núcleos que não apresentaram o formato oval considerado normal para eritrócitos de peixes. Os diferentes tipos de ANE foram classificados nas seguintes categorias (adaptado de CARRASCO et al., 1990):

- Forma de rim: núcleos com uma pequena invaginação em forma de fenda bem definida, de largura uniforme na membrana nuclear que se estende a uma profundidade apreciável para dentro do núcleo.



- Lobado: núcleos que apresentam formato irregular em consequência de evaginações que podem ser visualizadas como pequenas a grandes projeções da membrana nuclear, podendo formar dois ou mais lobos conectados.
- Segmentado: núcleos cuja estrutura aparece dividida em duas partes nitidamente separadas e delimitadas pela membrana nuclear. A região compreendida entre os segmentos parece estar destituída de material cromatínico.
- Vacuolado: núcleos que apresentam uma região clara destituída de qualquer material cromatínico visível no seu interior.

### **2.3.5. Análises histológicas**

Após a fixação, as amostras de fígado foram desidratadas em série crescente de etanol, infiltradas e emblocadas em Paraplast Plus. Para observação, foram realizados cortes com espessura de 5  $\mu$ m e coloração com hematoxilina e eosina. Os resultados foram expressos por meio de índices de lesão de acordo com o protocolo de Bernet et al. (1999). O índice foi obtido a partir da atribuição de um valor numérico (0, 2, 4 ou 6) que representa o grau de extensão de cada lesão observada. Posteriormente o valor foi multiplicado por uma outra pontuação (1, 2 ou 3) que representa o fator de importância da lesão. Segundo os autores, as lesões podem ser classificadas em: 1) importância patológica mínima; 2) importância patológica moderada e 3) importância patológica grave. Os índices de cada lesão foram somados obtendo-se assim o índice de lesão do órgão.

### **2.3.6. Análises bioquímicas**

A concentração de metalotioneína (MT) hepática foi estimada por meio da concentração de grupamentos sulfidrilas (VIARENGO et al., 1997). A homogeneização foi realizada em tampão TRIS-HCL 20 mM pH 8,6, contendo sacarose 0,5 M e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01%. A concentração de metalotioneína foi quantificada utilizando-se o reagente de Ellman em espectrofotômetro em 412 nm e expressa em  $\mu$ M GSH.

## **2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Antes da aplicação dos testes estatísticos foram avaliados os critérios de normalidade e homocedasticidade dos dados, a transformação dos dados foi realizada quando necessário. O tamanho amostral mínimo que foi utilizado para os testes estatísticos foi igual a três. O nível de significância considerado foi 0,05; contudo valores

de p maiores que 0,05 até 0,10 foram considerados como sugestivos, de acordo com Murtaugh (2014).

Para avaliar a influência de variáveis limnológicas, época do ano e distância do local de coleta para o Rio Solimões sobre a concentração de metilmercúrio na água do Lago Janauacá foi feita uma análise de componentes principais (PCA). Posteriormente foram realizadas análises de correlação de Pearson entre as variáveis limnológicas mais relevantes detectadas nos componentes principais 1 e 2 com a concentração de metilmercúrio da água e do sedimento. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a concentração de MeHg na água ou no sedimento entre os períodos sazonais e entre as regiões norte e sul do lago.

Foram realizadas análises de ANCOVA para as espécies de *P. pardalis* e *H. malabaricus* (não foi realizada para *Cichla* spp. pois não houve correlação entre a concentração de MeHg e o comprimento padrão) a fim de avaliar se existia diferença na bioacumulação de MeHg entre os locais de amostragem. O comprimento padrão foi a covariável utilizada nessas análises após ser detectado por meio da correlação de Pearson que as duas variáveis (comprimento padrão e concentração de MeHg no músculo dos peixes) tinham uma forte associação positiva. Para os espécimes de *Cichla* spp. foi aplicado o teste t de Student para comparar as concentrações de MeHg entre os locais de amostragem.

Para avaliar a influência das concentrações de metilmercúrio no músculo dos peixes sobre os biomarcadores de efeito toxicológico, foi realizada uma regressão linear para cada biomarcador utilizado. Também foram realizados testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e teste t de Student para verificar se havia diferença entre os locais para cada biomarcador.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. DINÂMICA DO METILMERCÚRIO NO AMBIENTE

##### 3.1.1. Descrição das condições limnológicas

A profundidade média do lago na seca foi  $0,62 \pm 0,28$  m, enquanto na cheia foi  $8,06 \pm 0,82$  m. A seca neste período de amostragem foi muito pronunciada e a profundidade do lago na cheia foi menor do que em anos anteriores. Na seca, a água do lago apresentou alta carga de material particulado em suspensão de maneira que a transparência média foi  $0,12 \pm 0,02$  m. Na cheia, a turbidez foi bem menor e a transparência média foi  $1,45 \pm 0,30$  m (Tabela 1).

O pH da água não variou muito ao longo da coluna d'água nos dois períodos de amostragem. As médias foram  $5,9 \pm 0,3$  para a seca e  $6,1 \pm 0,3$  para a cheia. Todavia durante a cheia os quatro locais classificados como sul do lago apresentaram o pH ligeiramente mais ácido no fundo.

Durante a seca, a temperatura foi uniforme ao longo da coluna d'água e o fundo do lago estava oxigenado. Na cheia foi observada a estratificação térmica e química ( $O_2$ ) da coluna d'água. O hipolímnio estava hipóxico na profundidade de 6 m e provavelmente anóxico em profundidades maiores. Essas condições foram mais pronunciadas no sul do lago.

Na seca, a condutividade elétrica da água do lago foi menor nos quatro locais classificados como sul do lago. Não houve grande variação entre os dados coletados na superfície e no fundo do lago. Na cheia, a condutividade elétrica foi mais homogênea na água superficial ao longo do lago, porém no hipolímnio dos quatro locais ao sul a condutividade elétrica foi ligeiramente menor.

A concentração de COD foi maior na cheia. Na seca, a concentração média de COD na água superficial foi  $4,8 \pm 0,7$  mg/L. Os valores foram ligeiramente maiores nos quatro locais do sul do lago. Na cheia, a concentração média de COD na água superficial foi  $8,12 \pm 3,03$  mg/L, enquanto no fundo foi  $10,77 \pm 2,89$  mg/L. A concentração de COD foi homogênea ao longo do lago e na maioria dos locais de amostragem do lago apresentou maiores valores no hipolímnio.

Tabela 1. Variáveis limnológicas mensuradas na superfície e fundo do Lago Janauacá nos períodos de seca e cheia. Os locais de amostragem 1 a 4 foram classificados como região sul e os locais 5 a 8 como região norte. Prof.= profundidade, Temp.= temperatura, Cond.Elét.= condutividade elétrica, Oxi. Dis.= oxigênio dissolvido e COD= carbono orgânico dissolvido. As linhas com “-” significam ausência de dados, pois a medida não foi realizada. As linhas sombreadas correspondem aos resultados obtidos na água superficial do lago enquanto as que não estão sombreadas correspondem aos resultados obtidos na água de fundo do lago.

Locais de amostragem	Prof. (m)		Disco de secchi (m)		pH		Temp. (°C)		Cond. Elét. (µS/cm)		Oxi. Dis. (mg/L)		COD (mg/L)	
	Seca	Cheia	Seca	Cheia	Seca	Cheia	Seca	Cheia	Seca	Cheia	Seca	Cheia	Seca	Cheia
1	0,15	0,15	0,15	1,80	5,84	6,68	30,5	30,6	12,3	36,5	5,7	6,3	5,6	12,1
	1,00	9,50	-	-	5,85	5,92	30,1	28,5	12,8	32,3	4,5	2,5	5,0	14,1
2	0,15	0,15	0,12	1,40	5,48	6,66	31,6	30,5	14,7	38,3	6,8	5,6	5,1	6,2
	0,25	8,00	-	-	5,42	5,86	30,2	28,1	15,2	34,1	5,8	1,2*	-	12,3
3	0,15	0,15	0,12	1,80	6,34	6,40	32,8	30,7	17,6	37,7	8,2	5,8	5,2	5,5
	1,00	8,00	-	-	6,09	5,89	30,0	27,8	18,6	30,8	4,5	1,7*	5,1	13,1
4	0,15	0,15	0,12	1,50	5,57	6,59	30,8	30,7	19,0	38,5	5,6	5,5	5,4	10,2
	0,40	8,00	-	-	5,62	5,84	30,4	27,7	18,6	33,1	4,6	0,7*	-	10,7
5	0,15	0,15	0,10	1,30	6,13	6,78	30,0	30,7	68,1	39,0	3,2	5,8	4,0	10,7
	0,50	8,00	-	-	6,14	6,36	30,0	28,3	68,4	37,7	3,1	2,7	-	10,0
6	0,15	0,15	0,10	1,60	5,78	6,33	31,3	29,5	75,0	37,9	4,0	4,2	4,7	4,9
	0,51	8,00	-	-	5,82	6,53	31,3	28,7	74,4	45,0	3,8	2,5	-	6,0
7	0,15	0,15	0,11	0,90	6,32	6,50	28,3	29,9	63,0	38,3	4,1	4,4	3,7	10,5
	0,51	8,50	-	-	5,75	6,35	28,3	28,4	63,3	39,2	4,0	3,0	-	7,2
8	0,15	0,15	0,10	1,30	5,79	6,55	30,8	30,3	21,3	38,8	4,8	5,5	4,7	4,8
	0,80	6,50	-	-	6,29	6,43	30,8	28,8	21,5	39,5	4,7	3,1	-	12,8

\*Em profundidades superiores a 6 m os dados de oxigênio dissolvido e temperatura podem não corresponder à profundidade indicada na tabela porque a correnteza arrastou o sensor do multiparâmetro no momento da coleta e fez com que a medida ocorresse acima da profundidade indicada.

### 3.1.2. Relação entre as variáveis limnológicas e a concentração de metilmercúrio na água

O primeiro componente principal explicou 52% da variância dos dados e o segundo componente 21%. No primeiro componente foram agrupadas as seguintes variáveis: concentração de MeHg, profundidade, COD, temperatura e oxigênio dissolvido. O pH e a condutividade elétrica ficaram mais relacionados com o segundo componente. Foi observada a formação de grupos entre os locais de amostragem, de acordo com a sazonalidade, profundidade coletada e região do lago amostrada (os locais do norte – 5 a 8 – ficaram separados dos locais do sul – 1 a 4 – na maioria das vezes, Figura 5).

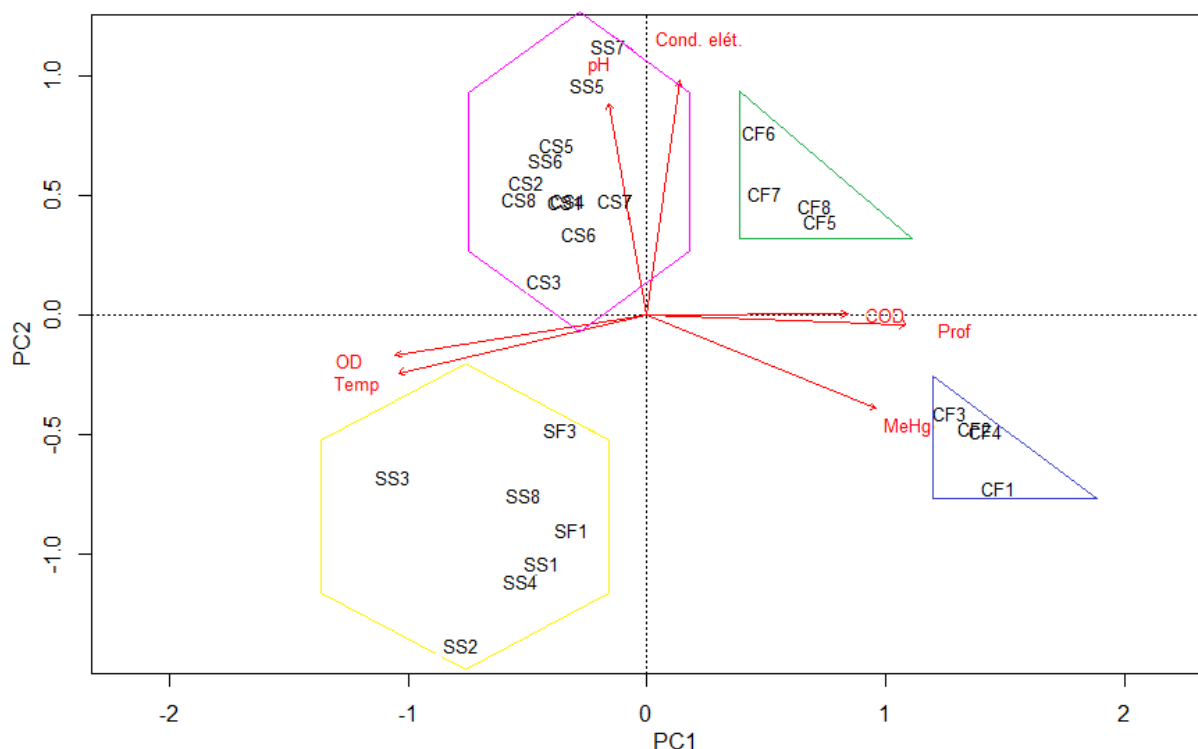


Figura 5 Análise de componentes principais dos parâmetros: concentração de metilmercúrio na água (MeHg), profundidade (Prof), oxigênio dissolvido (OD), carbono orgânico dissolvido (COD), temperatura (Temp), pH e condutividade elétrica (Cond. Elét). Cada local amostrado foi representado por duas letras que significam o período – seca (S) e cheia (C) – e a profundidade de amostragem –superfície (S) e fundo (F) – seguidas pelo número do local de amostragem (conforme mostrado na Figura 1). As formas geométricas foram utilizadas para separar os grupos observados. O triângulo azul compreende os locais de amostragem de 1 a 4 classificados como sul e amostrados na cheia e no fundo do lago. O triângulo verde compreende os locais de amostragem de 5 a 8 classificados como norte que também foram amostrados na cheia e no fundo do lago. O hexágono amarelo é constituído pelos locais de amostragem de 1 a 4 (classificados como sul) e 8 (classificados como norte) amostrados no período seco na superfície e fundo do lago. Já o hexágono rosa é constituído por todos locais amostrados (norte e sul) na superfície no período de cheia e pelos locais 5 a 7 (classificados como norte) amostrados na seca e superfície do lago.

Na seca, o pH, a temperatura e a condutividade elétrica não apresentaram correlação com as concentrações MeHg na água (Tabela 2). O oxigênio dissolvido apresentou correlação positiva e sugestiva com a concentração de MeHg na água. O carbono orgânico dissolvido teve uma correlação positiva com as concentrações de MeHg na água.

Na cheia, nenhuma das variáveis limnológicas analisadas apresentou correlação significativa com as concentrações de MeHg na água superficial, as correlações, quando ocorreram, foram observadas com os dados obtidos no fundo. O pH e a condutividade elétrica apresentaram correlação negativa com as concentrações de MeHg da água do hipolímnio do lago. O oxigênio dissolvido teve uma correlação negativa e sugestiva com a concentração de MeHg na água do hipolímnio. O COD teve correlação positiva com as concentrações de MeHg na água do hipolímnio do lago.

Tabela 2. Correlação entre diferentes variáveis limnológicas com as concentrações de metilmercúrio na água do Lago Janauacá de amostras coletadas nos períodos hidrológicos de seca e cheia.

	Seca – superfície		Cheia – superfície		Cheia – fundo	
	r	p	R	P	R	p
pH	0,19	0,65	-0,40	0,33	-0,89	0,00
Condutividade elétrica	-0,58	0,13	-0,42	0,30	-0,81	0,02
Temperatura	0,41	0,32	0,34	0,41	-0,45	0,26
Oxigênio dissolvido	0,62	0,10	0,26	0,53	-0,61	0,11
COD	0,78	0,02	-0,16	0,71	0,75	0,03

### 3.1.3. Relação ente as variáveis limnológicas e a concentração de metilmercúrio no sedimento

O primeiro componente principal explicou 54% da variância dos dados, o segundo componente 17% e o terceiro 14%. Ao primeiro componente estão relacionadas as seguintes variáveis: profundidade, concentração de MeHg na água e no sedimento, COD, temperatura e oxigênio dissolvido. A condutividade elétrica ficou relacionada com o segundo componente e o pH com o terceiro. Foi observada a formação de grupos entre os locais de amostragem, de acordo com a sazonalidade e região do lago amostrada (os locais de amostragem do norte – 5 a 8 – ficaram separados daqueles do sul – 1 a 4 – na maioria das vezes; Figura 6).

Uma investigação acerca da existência de correlação entre os parâmetros presentes no componente 1 com a concentração de MeHg no sedimento também foi realizada (Tabela 3). Contudo nenhuma das variáveis apresentou correlação significativa ou sugestiva com as concentrações de MeHg no sedimento.

Tabela 3. Correlação entre diferentes variáveis limnológicas com as concentrações de metilmercúrio (MeHg) no sedimento do Lago Janauacá de amostras coletadas nos períodos hidrológicos de seca e cheia.

	Seca		Cheia	
	r	P	R	P
pH	-0,12	0,79	-0,13	0,75
Condutividade elétrica	0,00	1,00	0,06	0,89
Temperatura	0,58	0,13	-0,27	0,52
Oxigênio dissolvido	0,54	0,17	-0,32	0,44
COD	0,39	0,34	-0,34	0,42
MeHg na água	0,45	0,26	-0,18	0,66

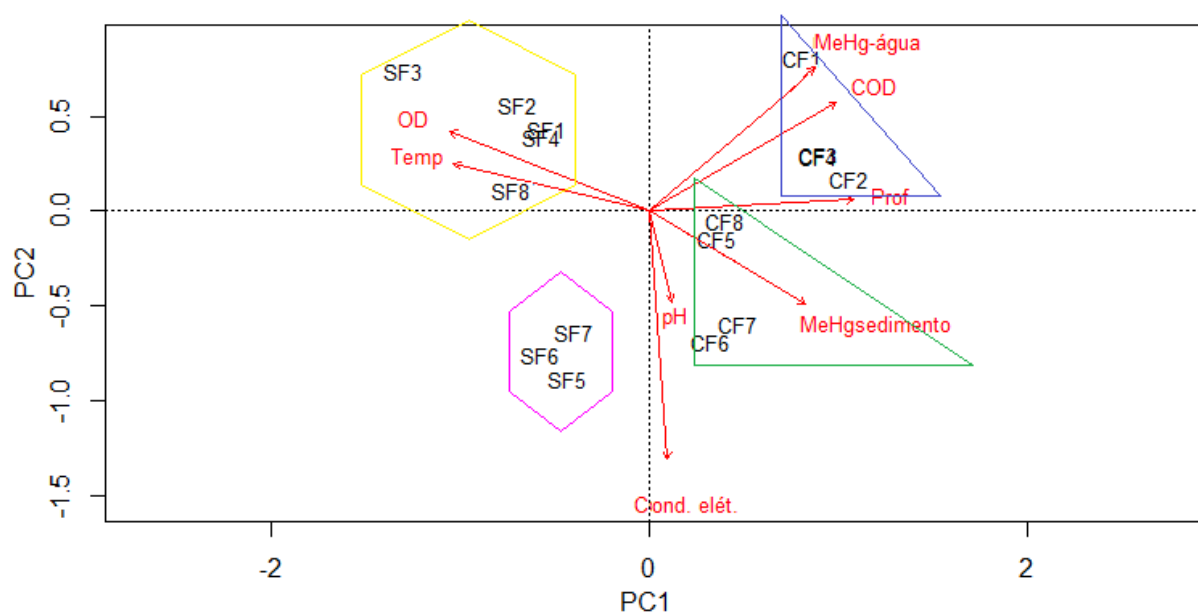


Figura 6 Análise de componentes principais dos parâmetros: concentração de metilmercúrio (MeHg), profundidade (Prof), oxigênio dissolvido (OD), carbono dissolvido (OD), temperatura (Temp), pH e condutividade elétrica (Cond. Elét). Cada local amostrado foi representado por duas letras que significam o período – seca (S) e cheia (C) – e a profundidade de amostragem – fundo (F) – seguidas pelo número do local de amostragem (para localização dos locais veja Figura 1). As formas geométricas foram utilizadas para separar os grupos observados. O triângulo azul compreende os locais de amostragem de 1 a 4 classificados como sul e amostrados na cheia. O triângulo verde compreende os locais de amostragem de 5 a 8 classificados como norte que também foram amostrados na cheia. O hexágono amarelo é constituído pelos locais de amostragem de 1 a 4 (classificados como sul) e 8 (classificados como norte) amostrados no período seco. Já o hexágono rosa é constituído pelos locais 5 a 7 (classificados como norte) amostrados na seca.

### 3.1.4. Controle de qualidade analítica

Os resultados obtidos nos parâmetros de qualidade analítica adotados foram satisfatórios. As porcentagens de recuperação das amostras de referência certificada variaram entre 91 e 99% e os coeficientes de variação ficaram abaixo de 20% (Tabela 4). A porcentagem de recuperação dos *spikes* utilizados para análise de MeHg nas amostras de água variaram de 80 a 98% (Tabela 5).

Tabela 4 Resultados das medidas de controle de qualidade analítica para as análises de metilmercúrio no sedimento e nos peixes do Lago Janauacá.

Sedimento e nos peixes do Lago Vandaele									
Período		Branco de reagentes	Certificada	Valor de referência das certificadas	Resultados encontrados	Recuperação	Coeficiente de variação (%)		
		PPM		PPM	PPM	%	Amostras	Certificadas	Branco
Sedimento	Seca	0,00001	IAEA 356	0,0054	0,0049	91	4 a 18	8	0
Sedimento	Cheia	0,00001	IAEA 356	0,0054	0,0050	92	0 a 18	2	0
Peixe	Seca	0,00001	BCR 463 (Tuna Fish)	3,04	3,00	99	0 a 19	8	0

Tabela 5 Resultados das medidas de controle de qualidade analítica para as amostras de água.

Período	Branco	Branco das garrafas de campo	Recuperação dos <i>spikes</i>	Desvio padrão relativo
	PPT	PPT	%	
Seca	0,00001	0,00001	82 a 98	0 a 30
Cheia	0,00108	0,009825	80 a 90	2 a 23

### 3.1.5. Concentração de metilmercúrio na água

Na seca, a concentração de metilmercúrio na água superficial do Lago Janauacá variou de 0,01 a 0,22 ng/L (Tabela 6). Os maiores valores de MeHg foram observados nos quatro locais de amostragem ao sul do lago. Na cheia, a concentração de MeHg na água superficial do Lago Janauacá variou de 0,03 a 0,31 ng/L, enquanto no hipolímnio variou de 0,04 a 1,21 ng/L. Embora os valores tendam a ser mais elevados na região sul do lago, a concentração de MeHg na água superficial foi estatisticamente similar entre as regiões norte e sul do lago para os períodos amostrados ( $p=0,11$  e  $0,06$ , respectivamente, Figura 4). Quanto à sazonalidade, a concentração de MeHg na água superficial foi maior no período de cheia do que no período de seca na região norte ( $p=0,029$ ), mas não houve diferença na região sul ( $p=0,89$ , Figura 7). Durante a cheia, na água do hipolímnio as concentrações de MeHg foram maiores na região sul do que na região norte do lago ( $p=0,029$ , Figura 8).

Tabela 6. Concentração de metilmercúrio (ng/L) na água de locais de amostragem classificados como regiões norte e sul do Lago Janauacá. As linhas com “-” significam ausência de dados, pois a medida não foi realizada.

Locais de amostragem,	Região	Profundidade da coluna d'água	Seca	Cheia
1	Sul	Superfície	0,22	0,11
	Sul	Fundo	0,10	1,21
2	Sul	Superfície	0,02	0,07
	Sul	Fundo	-	0,87
3	Sul	Superfície	0,19	0,31
	Sul	Fundo	0,05	0,68
4	Sul	Superfície	0,07	0,09
	Sul	Fundo	-	0,88
5	Norte	Superfície	0,01	0,04
	Norte	Fundo	-	0,23
6	Norte	Superfície	0,02	0,06
	Norte	Fundo	-	0,14
7	Norte	Superfície	0,01	0,08
	Norte	Fundo	-	0,04
8	Norte	Superfície	0,03	0,03
	Norte	Fundo	-	0,30



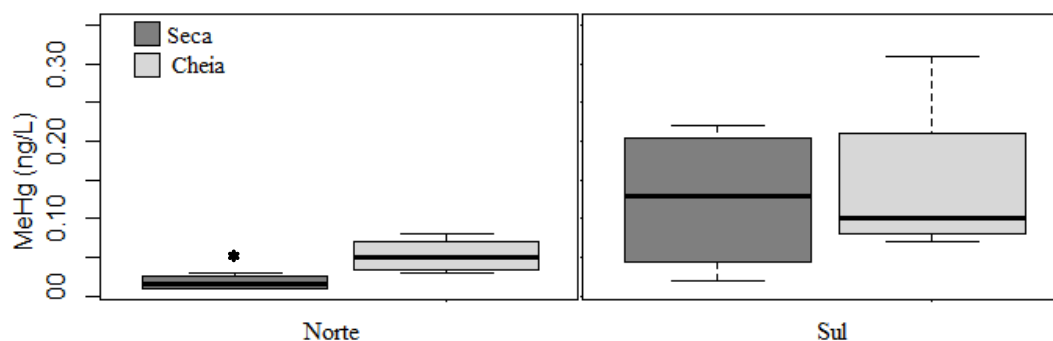


Figura 7 Concentração de metilmercúrio (MeHg) na água superficial do Lago Janauacá nos períodos de seca e cheia. O asterisco representa diferença estatística significativa entre a seca e cheia na região norte do lago. Estão representados no gráfico de *box plot*, a mediana (linha em negrito dentro do retângulo), o intervalo interquartil (retângulo) e os valores mínimos e máximos (linhas horizontais fora dos retângulos).

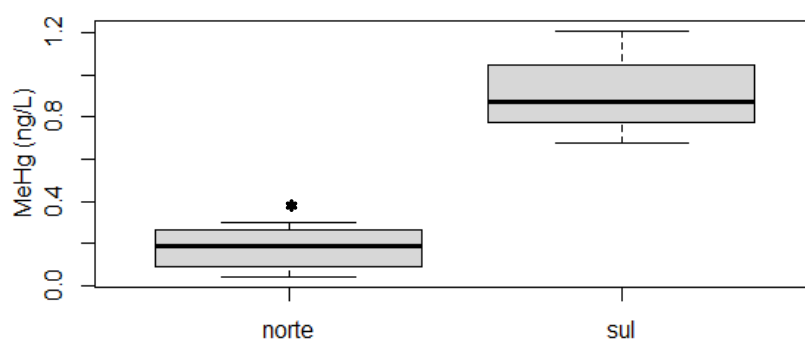


Figura 8 Concentração de metilmercúrio (MeHg) na água do hipolímnio do Lago Janauacá no período de cheia. O asterisco foi utilizado para representar a diferença estatística significativa. Estão representados no gráfico de *box plot*, a mediana (linha em negrito dentro do retângulo), o intervalo interquartil (retângulo) e os valores mínimos e máximos (linhas horizontais fora dos retângulos).

### 3.1.6. Concentração de metilmercúrio no sedimento

Na seca, a concentração de MeHg no sedimento variou de 0,18 a 0,29  $\mu\text{g/kg}$ . Enquanto na cheia variou de 0,20 a 0,56  $\mu\text{g/kg}$  (Tabela 7). Os valores de MeHg não diferiram significativamente entre os locais de amostragem em ambos os períodos amostrados ( $p=0,34$  e  $0,89$ , respectivamente). Também não foram observadas diferenças significativas na concentração de MeHg entre a seca e a cheia nas regiões norte ( $p=0,11$ ) e sul ( $p=0,34$ ) do lago, embora os maiores valores tenham sido observados na cheia (Figura 9).

Tabela 7. Concentração de metilmercúrio ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no sedimento do Lago Janauacá das regiões classificadas como norte e sul do Lago Janauacá

Locais de amostragem	Região	Seca	Cheia
1	Sul	0,21	0,20
2	Sul	0,26	0,56
3	Sul	0,29	0,41
4	Sul	0,25	0,34
5	Norte	0,24	0,22
6	Norte	0,26	0,39
7	Norte	0,21	0,53
8	Norte	0,18	0,27

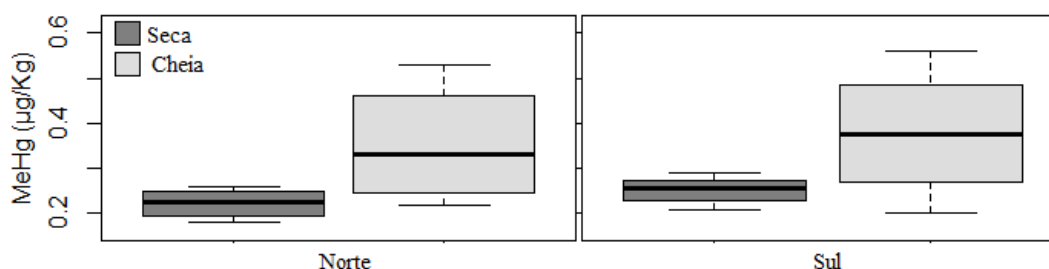


Figura 9 Concentração de metilmercúrio (MeHg) no sedimento do Lago Janauacá nos períodos de seca e cheia. Estão representados no gráfico de *box plot*, a mediana (linha em negrito dentro do retângulo), o intervalo interquartil (retângulo) e os valores mínimos e máximos (linhas horizontais fora dos retângulos).

### 3.2. BIOACUMULAÇÃO DE METILMERCÚRIO NOS PEIXES

Foram coletados 119 espécimes, distribuídos em três espécies: *Pterygoplichthys pardalis*, *Hoplias malabaricus* e *Cichla* spp. (Tabela 8). Os espécimes de *P. pardalis* foram coletados sobretudo na região norte do Lago Janauacá, enquanto os espécimes de *Cichla* spp. foram coletados exclusivamente na região sul do lago. A única espécie que apresentou ocorrência nas regiões norte e sul do lago foi *H. malabaricus*.

Além disso, o número reduzido de amostras para análise dos biomarcadores também ocorreu em função da mortalidade de vários espécimes logo após a retirada do apetrecho de pesca, embora tenham sido utilizados bomba com aeração e caixas isotérmicas para manutenção dos organismos durante o transporte até a base de campo.

Tabela 8. Número de espécimes de cada espécie de peixe analisados por local de amostragem no Lago Janauacá.

Locais de amostragem	Região do lago	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	<i>Cichla spp.</i>	<i>Hoplias malabaricus</i>
1	Sul	0	7	0
2	Sul	1	5	0
3	Sul	0	3	7
4	Sul	0	2	2
5	Norte	19	0	2
6	Norte	20	0	18
7	Norte	19	0	0
8	Norte	14	0	0
Total		73	17	29

A concentração média de MeHg em *Pterygoplichthys pardalis* foi  $0,02 \pm 0,01$  mg/kg; em *Hoplias malabaricus* foi  $0,47 \pm 0,27$  mg/kg; em *Cichla spp.* foi  $0,66 \pm 0,31$  mg/kg. A concentração de MeHg no músculo apresentou correlação positiva com o comprimento padrão de *P. pardalis* ( $p=0,026$ , Figura 10) e de *H. malabaricus* ( $p=0,00$ , Figura 11), mas não houve correlação com o comprimento padrão de *Cichla spp.* ( $p=0,42$ , Figura 12).

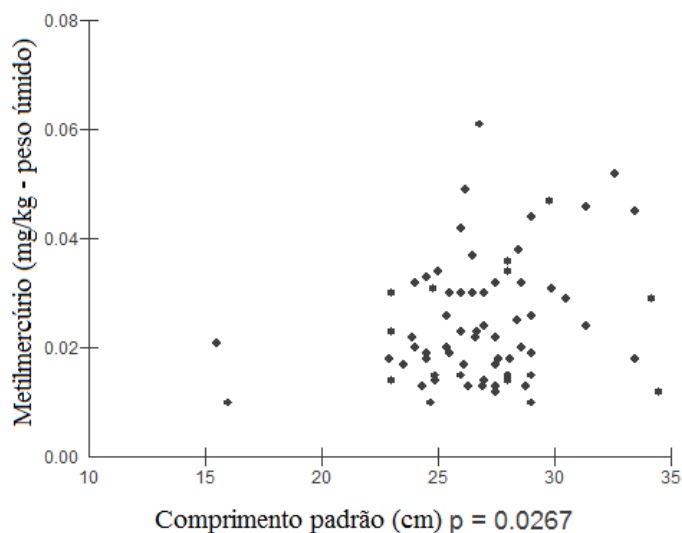


Figura 10 Correlação entre a concentração de metilmercúrio e o comprimento padrão em *Pterygoplichthys pardalis*.

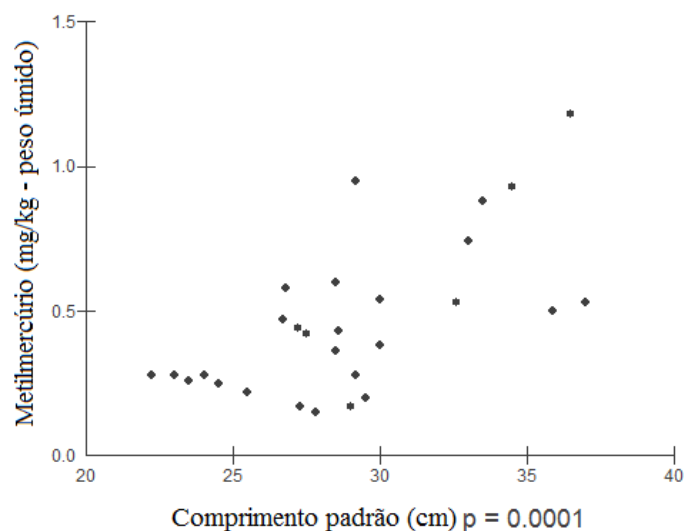


Figura 11 Correlação entre a concentração de metilmercúrio e o comprimento padrão em *Hoplias malabaricus*.

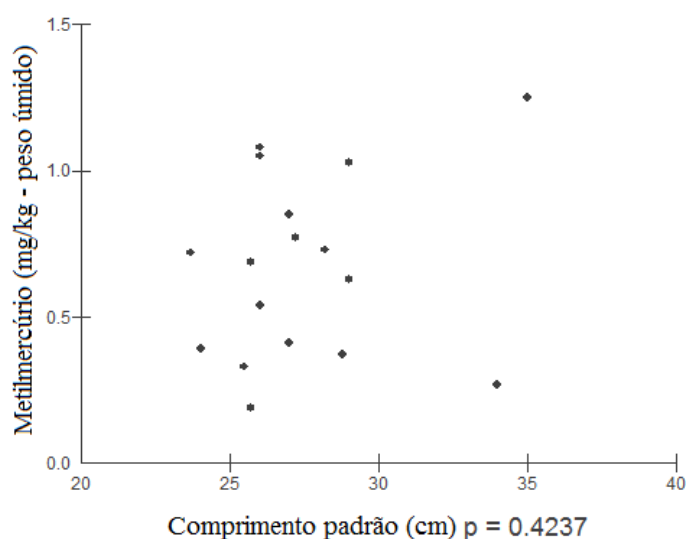


Figura 12 Correlação entre a concentração de metilmercúrio e o comprimento padrão em *Cichla* spp

As concentrações de MeHg nos espécimes de *Cichla* spp. foram similares na região sul do lago (loais de amostragem 1 e 2;  $p=0,87$ ). Da mesma forma o local não foi uma variável que influenciou as concentrações de MeHg nos espécimes de *H. malabaricus* ( $p=0,67$ ) e *P. pardalis* ( $p>0,41$ ). Contudo, o comprimento padrão teve uma importância significativa nas concentrações de MeHg ( $p=0,03$ ) nos espécimes de *H. malabaricus* e de *P. pardalis* ( $p=0,07$ ). Na figura 13 é possível observar a amplitude de valores de bioacumulação entre as três espécies, com *H. malabaricus* (painel C) e *Cichla* spp. (painel B) apresentando valores mais elevados do que *P. pardalis* (painel A).

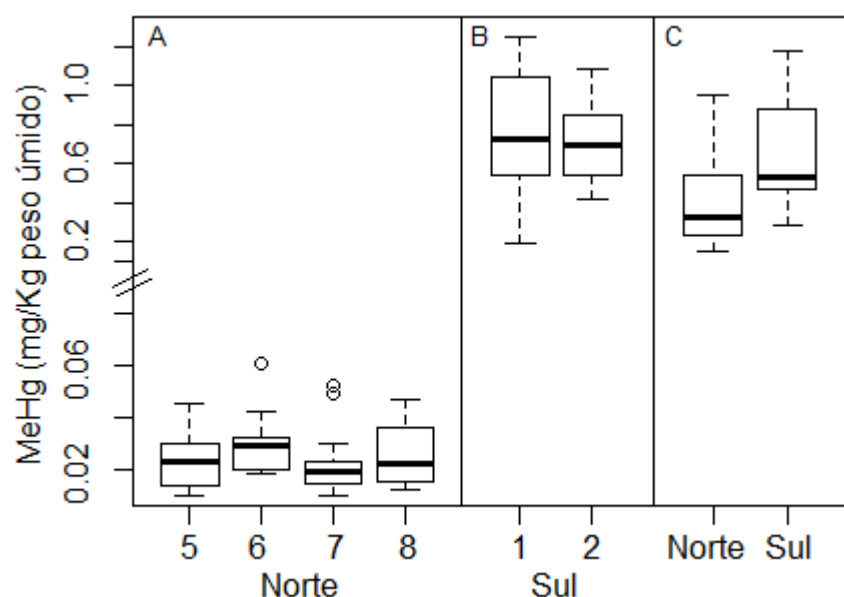


Figura 13 Concentração de metilmercúrio (MeHg) no músculo dos peixes das espécies *Pterygoplichthys pardalis* (A), *Cichla* spp. (B) e *Hoplias malabaricus* (C) em diferentes regiões do Lago Janauacá. Os locais de amostragem 1 e 2 foram classificados como região sul do lago e os locais 5 a 8 como região norte do lago. Estão representados no gráfico de *box plot*, a mediana (linha em negrito dentro do retângulo), o intervalo interquartil (retângulo) e os valores mínimos e máximos (linhas horizontais fora dos retângulos). Os *outliers* quando presentes foram simbolizados por círculos acima do *box plot*.

### 3.3. BIOMARCADORES

#### 3.3.1. Anormalidades nucleares eritrocitárias

Foram observadas as seguintes anormalidades nucleares eritrocitárias nos espécimes de *P. pardalis* (n=35) e *H. malabaricus* (n=5): núcleos reniformes, vacuolados, lobados, segmentados e binucleados (Figura 14). Dessas, a alteração mais frequente nos espécimes de *P. pardalis* foi o núcleo reniforme (n=8), seguido do segmentado (n=4), lobado (n=4) e vacuolado (n=1). Nenhum dos exemplares avaliados de ambas as espécies apresentou ocorrência de micronúcleos. Dos 35 espécimes de *P. pardalis* que foram avaliados 11 apresentaram um ou mais tipos de ANE. As frequências de ANE nos espécimes de *P. pardalis* foram similares entre os locais de amostragem ( $p=0,79$ , Tabela 9).

As alterações mais frequentes nos espécimes de *H. malabaricus* foram núcleo segmentado (n=4) e lobado (n=4), seguido de núcleo reniforme (n=3) e núcleo binucleado (n=1). As frequências médias de cada uma dessas alterações foram respectivamente:  $0,06 \pm 0,05\%$ ;  $0,12 \pm 0,12\%$ ;  $0,07 \pm 0,08\%$ ;  $0,01 \pm 0,02\%$ . A frequência de ANE em *H. malabaricus* foi  $0,26 \pm 0,19\%$ . Não houve relação entre a bioacumulação de MeHg no tecido muscular e a frequência de ANE nos espécimes de *P. pardalis* ( $R^2=0,20$ ;  $p=0,42$ ) e *H. malabaricus* ( $R^2=0,02$ ;  $p=0,84$ ). A qualidade dos esfregaços sanguíneos não

foi satisfatória para as amostras de *Cichla* spp., o que inviabilizou a contagem de MN e ANEs.

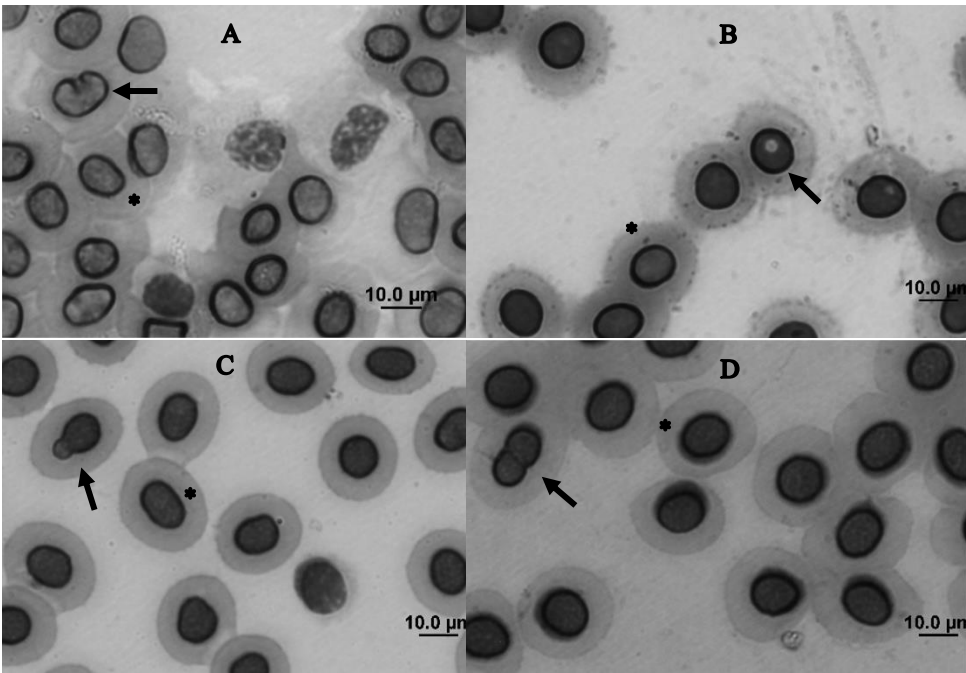


Figura 14 Anormalidades nucleares eritrocitárias observadas nos espécimes de peixe de *Pterygoplichthys pardalis*. A - Núcleo reniforme. B - Núcleo vacuolado. C - Núcleo lobado. D - Núcleo segmentado. Também é possível observar células com núcleos com formato normal (\*).

Tabela 9. Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE, %) nos peixes da espécie *Pterygoplichthys pardalis* nos locais amostrados na região norte do Lago Janauacá. O número de peixes avaliados (n), a quantidade de espécimes que apresentaram alterações e o valor de p do teste de Kruskal-Wallis comparando os locais também são descritos.

Locais de amostragem	Reniforme	Segmentado	Lobado	Vacuolado	Ane total
5 (n=4)	0,03±0,05	0,04±0,08	0,01±0,03	0,01±0,03	0,09±0,12
6 (n=4)	0,09±0,18	0,06±0,13	0,05±0,10	0,00±0,00	0,20±0,40
7 (n=18)	0,05 ±0,13	0,01±0,03	0,01±0,03	0,00±0,00	0,06±0,14
8 (n=9)	0,01±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,01±0,02
Todos os quatro acima (n total=35)	8	4	4	1	11
Valor de p	0,99	0,41	0,45	0,89	0,79

### 3.3.2. Metalotioneína

A concentração média de MT nos espécimes de *P. pardalis* (n=72) foi 2,77 ± 0,97 µg/mg de proteína; nos espécimes de *Cichla* spp. (n=11) foi 1,33 ± 0,58 µg/mg de proteína; e nos espécimes de *H. malabaricus* (n=8) foi 1,83 ± 0,76 µg/mg de proteína (Figura 15). Foi observada diferença na concentração de MT dos espécimes de *P. pardalis* entre os pontos amostrados (p<0,01) na região norte. Sendo que o local de amostragem 7

foi diferente de todos os outros locais ( $p < 0,05$ ) apresentando a menor concentração média de MT – 2,07  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína. Não foi observada diferença na concentração de MT dos espécimes de *Cichla* spp. entre os locais 1 e 2 amostrados ( $p = 0,73$ ) na região sul. A concentração de MT em *H. malabaricus* foi maior nos espécimes coletados na região sul quando comparados aos do norte ( $p = 0,03$ ). Não houve relação entre a bioacumulação de MeHg no tecido muscular com a concentração de MT nos espécimes de *P. pardalis* ( $R^2 = 0,01$ ;  $p = 0,53$ ); *H. malabaricus* ( $R^2 = 0,03$ ;  $p = 0,71$ ) e *Cichla* spp. ( $R^2 = 0,24$ ;  $p = 0,12$ ).

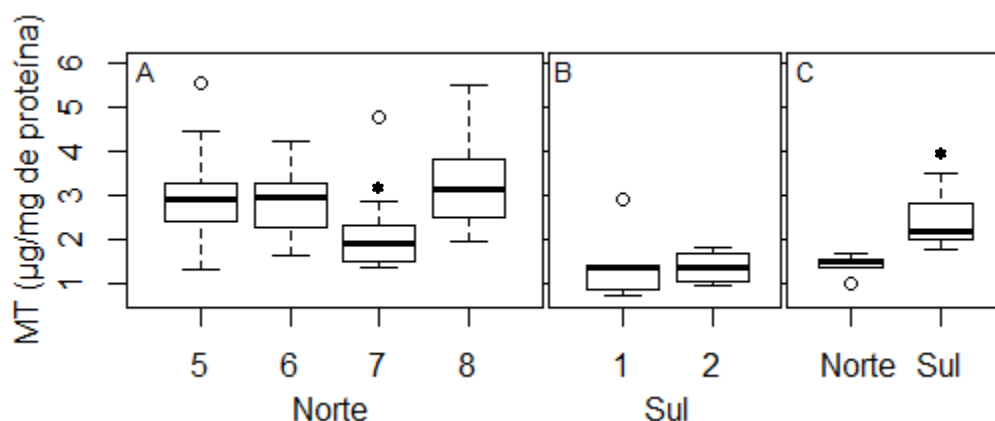


Figura 15 Concentração de metalotioneína (MT) no fígado dos peixes das espécies *Pterygoplichthys pardalis* (A), *Cichla* spp. (B) e *Hoplias malabaricus* (C) em diferentes regiões do Lago Janauacá. Os locais de amostragem 1 e 2 foram classificados como região sul do lago e os locais 5 a 8 como região norte do lago. O asterisco foi utilizado para representar a diferença estatística significativa. Estão representados no gráfico de box plot, a mediana (linha em negrito dentro do retângulo), o intervalo interquartil (retângulo) e os valores mínimos e máximos (linhas horizontais fora dos retângulos). Os outliers quando presentes foram simbolizados por círculos acima do box plot.

### 3.3.3. Histopatologia

O hepatócito é a principal célula do tecido hepático (cerca de 80%). Apresenta formato poliédrico com um ou dois núcleos volumosos e nucléolo visível. A disposição dos hepatócitos forma cordões diversamente orientados e anastomosados – por sinusóides, capilares, arteríolas, vênulas, artéria hepática e veia porta. Entre os hepatócitos estão situados os canalículos biliares. Foram observadas as seguintes alterações: vacuolização, dilatação de sinusóides, invasão leucocitária e necrose no tecido hepático das diferentes espécies de peixes amostradas (Figura 16). O índice de lesão dos espécimes de *P. pardalis* ( $n = 71$ ) não variou significativamente entre os peixes coletados nos pontos amostrais da região norte do lago ( $p = 0,67$ ). A similaridade nos índices de lesão também ocorreu entre os espécimes de *Cichla* spp. ( $n = 1$ ) coletados nos pontos amostrais da região sul do lago ( $p = 0,41$ ). Já para os espécimes de *H. malabaricus* ( $n = 8$ ) foram



observados maiores valores de índice de lesão nos espécimes coletados na região sul ( $p=0,04$ , Figura 17). Não houve relação entre a bioacumulação de MeHg no tecido muscular com os índices de lesão hepática nos espécimes de *P. pardalis* ( $R^2=0,03$ ;  $p=0,18$ ); *H. malabaricus* ( $R^2=0,06$ ;  $p=0,57$ ) e *Cichla* spp. ( $R^2=0,12$ ;  $p=0,30$ ).

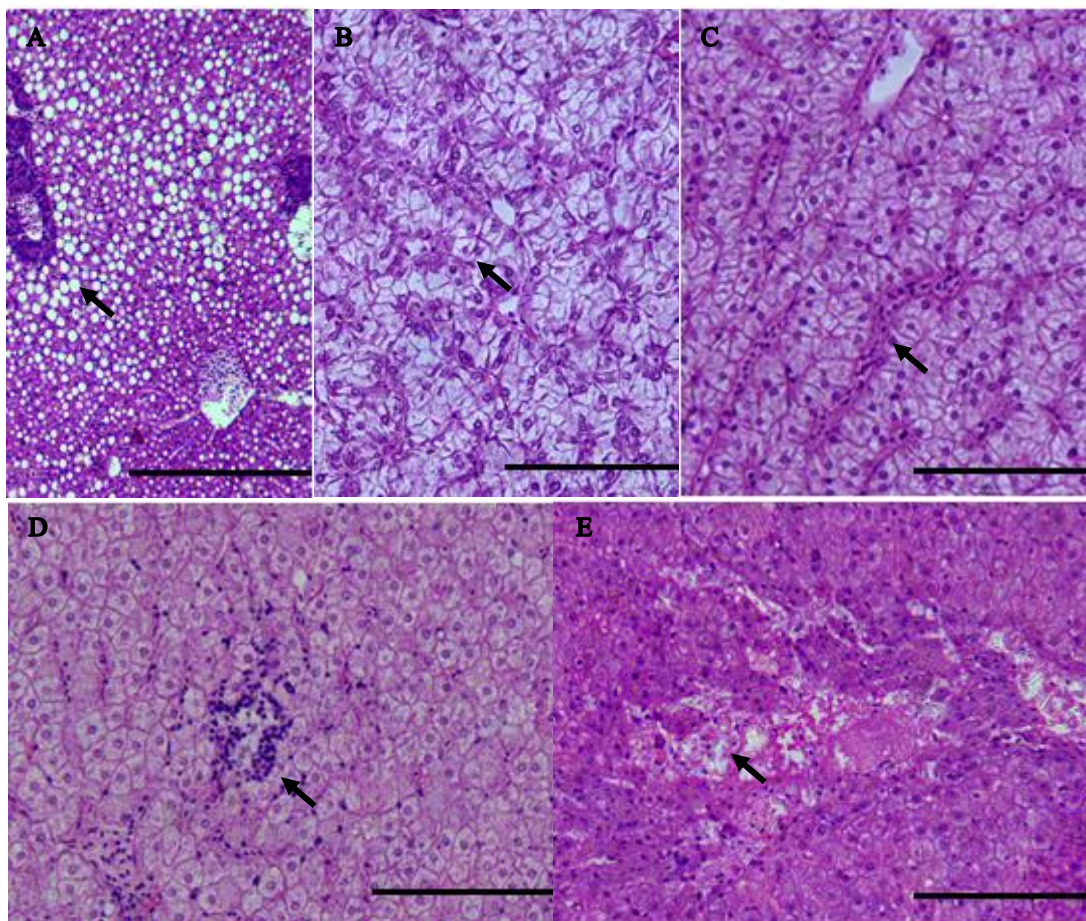


Figura 16 Alterações observadas no tecido hepático dos peixes avaliados. A – Vacuolização lipídica em *Cichla* spp. B – Vacuolização por glicogênio em *Pterygoplichthys pardalis*. C – Dilatação dos sinusóides em *Pterygoplichthys pardalis*. D – Infiltração por leucócitos em *Hoplias malabaricus*. E – Necrose em *Cichla* spp. A barra foi utilizada para representar a escala (100  $\mu$ m).



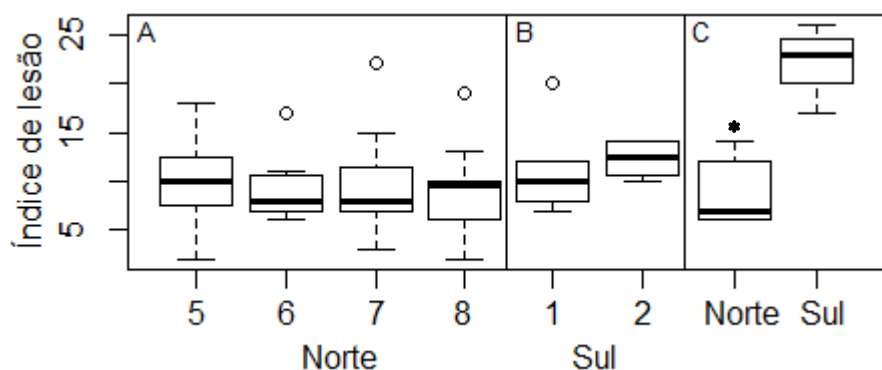


Figura 17 Índices de lesão hepática em *Pterygoplichthys pardalis* (A), *Cichla* spp. (B) e *Hoplias malabaricus* (C) em diferentes regiões do Lago Janauacá. Os locais de amostragem 1 e 2 foram classificados como região sul do lago e os locais 5 a 8 como região norte do lago. O asterisco foi utilizado para representar a diferença estatística significativa. Estão representados no gráfico de *box plot*, a mediana (linha em negrito dentro do retângulo), o intervalo interquartil (retângulo) e os valores mínimos e máximos (linhas horizontais fora dos retângulos). Os *outliers* quando presentes foram simbolizados por círculos acima do *box plot*.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. DINÂMICA DO METILMERCÚRIO NO AMBIENTE

A produção de metilmercúrio no ambiente aquático não é uma simples função da concentração de mercúrio total no sistema (RAVICHANDRAN, 2004). Vários fatores ambientais (temperatura, pH, potencial redox, atividade e estrutura da comunidade bacteriana, e a presença de agentes complexantes orgânicos e inorgânicos) são reportados na literatura como determinantes para a formação do metilmercúrio. No presente estudo as variáveis COD, pH, OD e condutividade elétrica foram as mais relevantes. Tais variáveis também foram estudadas por outros autores e alguns resultados encontrados na literatura são conflitantes (principalmente em relação ao COD e ao pH). Há autores que relatam a ausência de correlação entre o mercúrio total e o COD e há autores que observaram correlação negativa entre estes parâmetros, inclusive em um mesmo estudo que avaliou diferentes tipos de corpos d'água amazônicos (MAIA et al., 2009). Estes autores argumentaram que existem diferentes fontes e níveis de degradação da matéria orgânica no Lago Curuai, também situado na bacia do Rio Solimões, que podem controlar o transporte do mercúrio dissolvido. Sendo assim, diferenças significativas podem ser esperadas na reatividade do COD com o Hg total dependendo das características químicas e estruturais da matéria orgânica dissolvida do local de estudo.

De acordo com Ravichandran (2004) uma das razões pelas quais o Hg e a matéria orgânica interagem fortemente é devido à ligação do Hg com os grupos funcionais da matéria orgânica que contém enxofre. Em geral, uma correlação positiva entre o Hg

total e o COD pode ser esperada em casos onde o Hg é primariamente derivado de solos e áreas alagáveis, onde o Hg é liberado e transportado junto com a matéria orgânica. Por outro lado, em sistemas onde o mercúrio na coluna d'água é derivado primariamente de fontes diretas da atmosfera, uma correlação entre Hg e COD pode não estar presente. Numa análise da dinâmica de MeHg em sistemas fluviais norte americanos, Brigham et al. (2009) encontraram fortes correlações positivas entre MeHg e ambos COD e a densidade de áreas alagáveis à montante do ponto de coleta. Eles concluíram que áreas alagáveis vegetadas eram a fonte de MeHg e também do COD, e que os dois eram co-exportados destes ambientes. As correlações entre MeHg e COD encontradas neste estudo em ambos períodos hidrológicos também apontam para as áreas alagáveis como uma provável fonte de MeHg no Lago Janauacá. As extensas áreas de florestas e herbáceas inundadas presentes no lago no período da cheia, são possivelmente fontes de MeHg (uma vez que têm condições propícias à metilação) e COD neste período, enquanto, na seca, a mais provável fonte de COD e MeHg seriam os solos hidromórfios presentes nas cabeceiras da bacia local, especialmente na região sul do lago (VASCONCELOS, 2014; BRITO et al., 2017). Entretanto, num lago, como o Janauacá, a metilação também pode ocorrer em ambientes de água aberta favoráveis a este processo como o sedimento e o hipolímnio. Brito et al. (2017) observaram maiores concentrações de MeHg na água do hipolímnio dos ambientes de água aberta quando comparado com o epilímnio (o que pode indicar que a metilação pode estar ocorrendo neste ambiente ou no sedimento e o MeHg estar passando do sedimento para o hipolímnio).

O sedimento constitui um compartimento importante na avaliação da biogeoquímica do mercúrio. No presente estudo, as concentrações de MeHg no sedimento foram semelhantes ao longo de todo o lago e os valores mais altos foram registrados na cheia quando as condições hipóxicas no fundo do lago foram propícias à metilação. Muresan et al. (2008) destacaram a contribuição significativa do sedimento na produção de MeHg bem como sua exportação para o hipolímnio. Situação similar também foi relatada por Eckley & Hintelmann (2006) nos lagos boreais. No entanto, Guimarães et al. (2000) observaram que a taxa de metilação que ocorre no sedimento de água aberta de um lago é inferior da observada no sedimento abaixo de herbáceas ou florestas inundadas. Portanto, os sedimentos destas regiões de água aberta também podem estar contribuindo para a metilação e mais durante a cheia. Mas provavelmente em uma menor taxa quando comparadas com os solos hidromórficos, ou os sedimentos de florestas e herbáceas supracitados.

Áreas alagáveis tendem a ter maior conteúdo de matéria orgânica e também são produtoras e exportadoras significativas de MeHg (RAVICHANDRAN, 2004; BRIGHAM et al., 2009). Belger e Forsberg (2006) encontraram uma forte correlação entre a porcentagem de áreas alagáveis e as concentrações de mercúrio em peixes predadores na bacia do Rio Negro. Eles sugeriram que esses locais são potenciais sítios de metilação. Roulet et al. (2000) também relataram a influência da inundação nos processos de metilação na bacia do Rio Tapajós.

Ainda não existe consenso na comunidade científica a respeito da relação entre o pH e a formação do MeHg no ambiente aquático (PARANJAPÉ & HALL, 2017). Já foram encontradas tanto correlações positivas entre o Hg e o pH (BELGER & FORSBERG, 2006) quanto correlações negativas (SILVA-FORSBERG et al., 1999; BRITO et al., 2017). Embora existam autores que defendam a hipótese de que ambientes mais ácidos favorecem a disponibilidade de metais, tais como o mercúrio e que propiciam uma maior metilação (ULLRICH et al 2001), nossos resultados sugerem que a metilação do Hg também pode ocorrer em ambientes com pH próximo do neutro. Correia et al. (2012) também observaram lagos tropicais com potencial para metilação que apresentaram pH neutro.

Tanto em regiões de clima temperado (ECKLEY & HINTELMANN, 2006) quanto em ambientes tropicais (COQUERY et al., 2003; HYLANDER et al., 2006; MURESAN et al., 2008; ALMEIDA, 2012; KASPER et al., 2014; BRITO et al., 2017) tem sido relatada uma maior metilação promovida pela atividade bacteriana (COQUERY et al., 2003) em ambientes anóxicos. Dentre as bactérias reconhecidas como responsáveis pela metilação biótica, destacam-se as bactérias redutoras de sulfato (ULLRICH et al., 2001; MURESAN et al., 2008; CORREIA et al., 2012). A hipóxia ou anóxia no hipolímnio pode ocorrer em função da estratificação térmica e química que é mais estável e duradora quando a coluna de água é mais profunda. Como esperado, a estratificação observada na presente pesquisa foi observada na cheia, período em que a profundidade foi maior. A estratificação termal efetivamente isola o hipolímnio da atmosfera e da zona eufótica, impedindo a entrada de oxigênio por difusão e fotossíntese priorizando assim o consumo de O<sub>2</sub> por respiração bacteriana (ESTEVES, 2011).

Em regiões temperadas a estratificação química (O<sub>2</sub>) é condicionada principalmente pela estratificação térmica. Já em regiões tropicais, nas quais a estratificação termal é mais fraca (e.g., a amplitude de variação entre as camadas de água é menor), o perfil vertical de O<sub>2</sub> depende mais das características morfométricas do lago,

que favorecem ou dificultam a ação do vento na distribuição de O<sub>2</sub> (ESTEVES, 2011). Brito et al. (2017) destacaram a importância da profundidade e do *fetch* (comprimento linear máximo) para a formação do MeHg na região de água aberta do Lago Janauacá. Em Brito et al. (2017) e no presente estudo foram observados os maiores valores de MeHg no período da cheia quando o lago era mais profundo no ponto mais distante do Rio Solimões, onde o *fetch* e a ação do vento sobre a coluna de água eram menores. Almeida (2012) e Kasper et al. (2014) também observaram que no período em que o nível da água é mais elevado a concentração de MeHg foi mais alta em lagos no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel (RO) e no Rio Uatumã, respectivamente.

Existem poucas informações na literatura a respeito da relação da condutividade elétrica com mercúrio. No sistema fluvial amazônico, esse parâmetro é associado principalmente aos íons inorgânicos dissolvidos, derivados do intemperismo químico dos solos superficiais (STALLARD & EDMOND, 1983). Brito et al. (2017) argumentaram que a correlação negativa da condutividade elétrica com MeHg indica que o MeHg e seu substrato, Hg<sup>+2</sup>, não são derivados do mesmo processo. É provável que isso também justifique a correlação observada no presente estudo.

#### 4.2. BIOACUMULAÇÃO DE METILMERCÚRIO NOS PEIXES

Na maioria das espécies de peixes, mais de 95% do mercúrio está presente na forma de metilmercúrio (PORCELLA, 1994; RAVICHANDRAN, 2004), uma neurotoxina que tem tendência de bioacumular e biomagnificar. No presente estudo, foram observados percentuais médios de MeHg variando entre 75% a 87% (resultados não mostrados). Geralmente os peixes assimilam o MeHg, principalmente, através da alimentação (JERNELÖV & LANN, 1971; SCHETAGNE et al., 2000; SAMPAIO DA SILVA et al., 2005). Dessa maneira, as espécies pertencentes ao topo da cadeia alimentar, como *Cichla spp.* e *Hoplias malabaricus*, com hábito alimentar carnívoro e/ou piscívoro concentram mais Hg do que aquelas que pertencem a outras categorias alimentares, como, por exemplo, detritívoros como *Pterygoplichthys pardalis* (BARBOSA et al., 2003; SAMPAIO DA SILVA et al., 2006; BASTOS et al. 2007; BASTOS et al., 2008; BELTRAN-PEDREROS et al., 2011). As concentrações de MeHg observadas nestas espécies foram semelhantes às encontradas na literatura (MALM et al., 1995; GUIMARÃES et al., 1999; KEHRIG et al., 2008; ROACH et al., 2013; SOUZA-ARAUJO et al., 2016).

Em geral, a bioacumulação do MeHg no músculo tende a aumentar com o tamanho, o peso e a idade do peixe (OLSSON, 1976; PAL et al., 2012). No presente estudo, observamos que a concentração de MeHg aumentou com o tamanho nos espécimes de *H. malabaricus* e *P. pardalis*. O comprimento padrão foi selecionado por ser uma medida mais conservativa do que o peso pois independe de variações relacionadas à disponibilidade de alimentos e de fenômenos fisiológicos temporais de cada espécie como o período reprodutivo (SAMPAIO DA SILVA et al., 2006). Beltran-Pedreiros et al. (2011) encontraram correlação positiva entre a taxa de bioacumulação de Hg com comprimento padrão em *Cichla monoculus*, mas não observaram isso em outras espécies de peixes predadores. Belger e Forsberg (2006) também observaram uma correlação positiva entre a concentração de mercúrio e o tamanho em *Cichla* spp. No presente estudo não foi encontrada correlação entre o MeHg e o comprimento padrão nos espécimes de *Cichla* spp. Isso pode ter ocorrido em virtude da baixa amplitude de comprimento padrão (e.g., 24 a 35 cm, e a maioria dos espécimes entre 25 e 30 cm) observada nos peixes coletados.

Ao comparar as concentrações de metilmercúrio observadas em *H. malabaricus* com as recomendações de consumo humano observa-se que cerca de 89% dos espécimes de *H. malabaricus* coletados na região sul do lago apresentaram concentrações acima do que a USEPA (2001, 2010) recomenda como limite para o consumo pela população humana (0,3 mg/Kg). Enquanto no norte do lago 50% dos peixes apresentaram concentrações acima de 0,3 mg/Kg. Levando em consideração os limites menos conservadores estabelecidos pela comissão Codex Alimentarius (UNEP & WHO, 2008) para peixes predadores (1 mg/Kg), apenas 11% dos espécimes coletados no sul apresentaram concentração acima do recomendado, enquanto no norte do lago nenhum espécime apresentou concentrações acima desse limite. Cerca de 88% dos espécimes de *Cichla* spp., todos amostrados no sul do lago, apresentaram concentrações acima de 0,3 mg/Kg e cerca de 23% acima de 1,0 mg/Kg.

Os limites dessas agências foram estabelecidos com base nos resultados de estudos epidemiológicos realizados nas Ilhas Seychelles, Ilhas Faroé e na Nova Zelândia (BURGER et al. 2001; RICE, 2004; MAYCOCK & BENFORD, 2007). Foi determinado como um valor de referência por essas organizações um limite de ingestão diária de metilmercúrio de 0,1 µg/kg de peso corpóreo/dia (USEPA, 2001). Uma estimativa da dose de referência (RFD) de exposição diária que provavelmente não terá efeito deletério, mesmo que a exposição contínua ocorra ao longo da vida (USEPA, 2001).

Passos et al. (2008) observaram que a estimativa de ingestão diária de Hg em algumas localidades da Amazônia (e.g., bacia do Rio Tapajós) variou de 0 a 11,8 µg/kg de peso corpóreo/dia. Esses autores também observaram que o consumo de peixes variou de 80 a 206 g por refeição. Asefi e Zamani-Ahmadmahmoodi (2015), após estudo realizado no Rio Maroon, na província Khuzestan, no Irã, observaram que a taxa máxima de consumo de peixes (e.g., *B. grypus* – onívoro – e *B. luteus* – invertívoro) com concentrações de mercúrio em torno de 0,37 e 0,25 µg/g para uma pessoa adulta com peso médio de 71,5 kg é de 44 a 92 g/dia (obs: nos cálculos realizados os autores assumem que o Hg era 100% MeHg). Com base nesses resultados também foi estimado que o consumo máximo permitido para um adulto com peso médio de 75,5 kg é de 6 a 12 refeições de peixe por mês. Um estudo realizado por Vieira et al. (2015) apontou que, mesmo considerando uma única refeição de peixe de 50 g por semana, o RFD da USEPA seria superado, desencadeado por valores acima de 0,84 µg/g de MeHg em peixes, e isso ocorreu mesmo estando abaixo dos níveis permitidos de até 1,0 µg/g de MeHg no consumo de peixe! Segundo esses autores o nível de exposição ao MeHg depende (i) do tipo e da quantidade de peixe ingerido por unidade de tempo (como dia ou semana); (ii) das concentrações de MeHg nos peixes; e (iii) do peso corporal dos consumidores de peixe. Os mesmos autores alertaram que para a obtenção de um nível de exposição mais seguro, que não ultrapassasse o RFD de 0,1 µg/kg de peso corpóreo/dia, o tamanho do peixe na refeição deveria ser inversamente proporcional a concentração máxima de MeHg nesse peixe.

Ao comparar os resultados apresentados por Passos et al. (2008), Asefi e Zamani-Ahmadmahmoodi (2015) e Vieira et al. (2015) com os resultados de MeHg observados nos espécimes de peixes avaliados no presente estudo e levando em consideração que a dieta de populações ribeirinhas é baseada principalmente no consumo de peixes (DÓREA, 2003; PASSOS et al., 2003, 2007), pode ser apontada a seguinte preocupação: será que o consumo de espécimes de *H. malabaricus* e *Cichla* spp. do Lago Janauacá constitui um risco à saúde? A resposta a essa indagação dependerá da frequência com que esses peixes são consumidos e em quais quantidades. É muito importante que se tenha cautela na interpretação dos dados referentes à bioacumulação do metilmercúrio e nas comparações com os limites que são estabelecidos por diferentes órgãos para o consumo de pescado contendo o MeHg. A ingestão de outros itens alimentares é um fator que também deve ser levado em consideração. Passos et al. (2003; 2007; 2008) observaram que as pessoas (na Bacia do Tapajós) que comiam frutas com mais frequência

tinham concentrações mais baixas de mercúrio. Os nutrientes presentes nos diferentes tipos de frutas podem afetar a biodisponibilidade, a toxico-dinâmica, o transporte para órgãos alvo e influenciar as respostas funcionais imunológicas, bioquímicas ou citológicas ao mercúrio (CHAPMAN & CHAN, 2000).

As concentrações de metilmercúrio sutilmente mais elevadas nos espécimes de *H. malabaricus* no sul do lago indicam a possibilidade desses peixes bioacumularem o MeHg de maneira mais intensa devido às maiores concentrações de MeHg observadas na água e sedimento dessa região se comparada à região norte do lago. A continuidade de estudos nesta região será importante para confirmar se os peixes da região sul do lago teriam condições mais propícias a bioacumular MeHg do que os da região norte do lago.

#### 4.3. BIOMARCADORES

##### 4.3.1. Anormalidades nucleares eritrocitárias

A frequência de micronúcleos em peixes normalmente é baixa (FERRARO et al., 2004). Melo et al., (2013) reuniram dados de vários estudos e elaboraram uma tabela com as frequências espontâneas de MN e ANE (Tabela 10). Eles observaram que frequências em espécies nativas da América do Sul variaram de 0% a 1,86%. Já nas espécies não nativas (*C. carpio*, *O. niloticus*, *B. plebejus* e *O. mykiss*), comumente usadas em ensaios de laboratório as frequências variaram de 0,05% a 0,94%.

Tabela 10. Frequências espontâneas de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) obtidas de tratamentos controles em laboratório e estudos de campo. Fonte: Melo et al. (2013)

Espécies	Hábito alimentar	MN	ANE	Referência
<i>Prochilodus nigricans</i>	Detritívoro	0,01	-	Porto et al. (2005)
<i>Mylossoma duriventris</i>	Onívoro	0,01	-	Porto et al. (2005)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Piscívoro	0,006	-	Porto et al. (2005)
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Onívoro	0,013	-	Pantaleão et al. (2006)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Piscívoro	0,033	-	Pantaleão et al. (2006)
<i>Astyanax jacuhiensis</i>	Onívoro	0,021-0,019	-	De Lemos et al. (2008)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Onívoro/Detritívoro	0,05	-	Rocha et al. (2009)
<i>Steindachnerina insculpta</i>	Onívoro/Detritívoro	0,70	3,27	Grisolia et al. (2009)
<i>Geophagus brasiliensis</i>	Onívoro	0,86	5,86	Grisolia et al. (2009)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Onívoro/Detritívoro	0,87	3,29	Grisolia et al. (2009)
<i>Cyprinus carpio</i>	Algívoro	0,94	5,51	Grisolia et al. (2009)
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Onívoro	1,13	1,2	Grisolia et al. (2009)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Piscívoro	1,80	1,89	Grisolia et al. (2009)
<i>Cichla temensis</i>	Piscívoro	1,86	9,15	Grisolia et al. (2009)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Onívoro/Detritívoro	0,65	2,20	Souza & Fontanetti (2006)
<i>Cyprinus carpio</i>	Algívoro	0,40	-	Buschini et al. (2004)
<i>Prochilodus lineatus</i>	Detritívoro	0,00	-	Cavalcante et al. (2008)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Onívoro	0,18	-	Ayllón and Garcia-Vasquez (2001)
<i>Barbus plebejus</i>	Bentívoro	0,50	-	Minissi and Rizzoni (1996)

No presente estudo não foi detectada a presença de MN em nenhum dos eritrócitos dos espécimes avaliados. Algumas possíveis explicações para a ausência de MN observada no presente estudo são: i) provavelmente a pressão antrópica exercida até o momento ainda não foi tão forte para causar efeitos genotóxicos detectáveis. Ou esses efeitos ocorrerão futuramente, já que um dos danos iniciais, a formação de ANE, foi observado, mesmo que em baixas frequências quando comparado com a literatura. ii) Os peixes conseguem tolerar os níveis aos quais estão expostos e ativam os mecanismos de reparo necessários sem apresentar muitos prejuízos em sua saúde. Podem ser levadas em consideração questões fisiológicas como a taxa de reparação do DNA (PACHECO & SANTOS, 2002a,b; BARBOSA et al., 2010), substituição ou eliminação de células com micronúcleo ou formato irregular e taxa de hematopoiese (eritropoese reduzida)



(PACHECO & SANTOS, 1997; PACHECO & SANTOS, 2002a,b; UDROIU, 2006; GUILHERME et al., 2008). iii) Possível presença de selênio atuando na inibição dos efeitos do Hg. Embora a relação destes elementos ainda não esteja plenamente compreendida, diversos autores apontaram para possibilidade de haver um mecanismo de proteção do Se contra os efeitos tóxicos do Hg (BELZILE et al., 2006, 2009; KWAANSA-ANSAH et al., 2013; SAMPAIO DA SILVA et al., 2013; PENGLASE et al., 2014; OUÉDRAOGO et al., 2015).

As frequências de ANE observadas neste estudo estão de acordo com os valores relatados na literatura para áreas não poluídas (BOLOGNESI et al., 2006; SILVA SOUZA & FONTANETTI, 2006; KIRSCHBAUM et al., 2009; AZEVEDO et al., 2012;) e tratamentos controles em pesquisas realizadas por meio de bioensaios com poluentes (ÇAVAŞ & GÖZÜKARA, 2003; BARŠIENE et al., 2006; ROCHA et al., 2011; CRUZ et al., 2013; SERIANI et al., 2015). Outros autores também relataram que a frequência de ANE geralmente é maior do que a frequência de MN (CARRASCO et al., 1990; FERRARO et al., 2004; ROCHA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2011) e sugeriram que as ANE são respostas primárias que antecedem a formação dos micronúcleos (CARRASCO et al., 1990; AYLLON & GARCIA-VAZQUEZ, 2000; KIRSCHBAUM et al., 2009; SERIANI et al., 2011; BARŠIENĖ et al., 2015). Portanto, elas seriam ferramentas muito úteis e até mais sensíveis na detecção de danos genotóxicos do que a ocorrência de MN (PACHECO E SANTOS, 1997; CAVAS & GÖZÜKARA, 2003; KIRSCHBAUM et al. 2009; ROCHA et al., 2010; SERIANI et al., 2015).

Embora as frequências de ANE relatadas no presente estudo sejam baixas e os MN não tenham sido detectados, existe evidência na literatura de que diferentes espécies químicas do mercúrio induzem ao aumento da incidência de danos genotóxicos em peixes (NEPOMUCENO et al., 1997; AYLLÓN & GARCIA-VASQUEZ, 2000; ÇAVAŞ, 2008; GUILHERME et al., 2008; ROCHA et al., 2011; AZEVEDO et al., 2012). Na região amazônica, trabalhos que investigam os efeitos genotóxicos do mercúrio e outros poluentes no ambiente natural ainda são escassos. É importante destacar o estudo realizado por Porto et al. (2005) que pode ser considerado como pioneiro para a região. Esses autores avaliaram três diferentes espécies de peixes com diferentes hábitos alimentares – *Prochilodus nigricans* (detritívoro), *Mylossoma duriventris* (onívoro) e *Hoplias malabaricus* (piscívoro) – em dois grandes rios da bacia amazônica: Rio Madeira (considerado como área poluída devido à utilização do Hg no garimpo de ouro) e Rio Solimões (considerado como área não poluída). Foi observado que os peixes do Rio

Madeira apresentaram maiores frequências de MN, principalmente os espécimes piscívoros. Isso foi justificado tanto pelo histórico de contaminação de Hg presente na região quanto pelas características da espécie em questão, que possui maior nível de Hg em função de estar no topo da cadeia alimentar. Ao estudar as bacias dos rios Negro e Solimões-Amazonas, Ferreira (2013) detectou a ocorrência de micronúcleos e anormalidades nucleares em *H. malabaricus*, sendo que os efeitos genotóxicos foram significativamente maiores nos peixes do Rio Negro que possui concentrações de Hg naturalmente mais elevadas do que o Solimões-Amazonas (Silva-Forsberg et al, 2000).

Embora as frequências de anormalidades nucleares obtidas nesta pesquisa tenham sido similares entre os espécimes de bodó e traíra, outros pesquisadores encontram variações no perfil de genotoxicidade entre diferentes espécies de peixes. Algumas espécies são menos sensíveis do que outras como bioindicadoras de efeitos genotóxicos, em razão do metabolismo, eficiência nos mecanismos de reparo do DNA, mecanismos de defesa e nível trófico na cadeia alimentar (RODRIGUEZ-CEA et al., 2003; GRISOLIA et al., 2009; BOLOGNESI & HAYASHI, 2011; MELO et al., 2013;). Segundo Grisolia et al. (2009), as diferenças observadas nas frequências basais de micronúcleos e nos índices de danos no DNA entre as espécies que vivem no mesmo ambiente demonstram que devemos estar conscientes da sensibilidade diferencial dos organismos aquáticos aos agentes genotóxicos e suas respostas e das suas relações no ecossistema aquático. Esses autores relataram que os peixes no topo da cadeia alimentar e os detritívoros bioacumulam e concentram poluentes, alcançando níveis que podem estar associados à genotoxicidade mais elevada. Contudo no presente estudo, *P. pardalis*, detritívoro, apresentou baixa concentração de MeHg e baixa frequência de MN e ANE. *H. malabaricus*, carnívoro, embora tenha apresentado maior concentração de MeHg também apresentou baixa ocorrência de danos genotóxicos. Jesus et al. (2016) e Porto et al. (2005) encontraram maiores frequências de ANE e/ou MN em *H. malabaricus*. Grisolia et al. (2009) encontraram maior índice de danos no DNA nos espécimes de *H. malabaricus* e *Cichla temensis*. Indicando que peixes de topo de cadeia como os do gênero *Hoplias* e *Cichla* representam bons modelos biológicos para avaliação de efeito genotóxico.

A ausência de relação entre as concentrações de mercúrio e a frequência de ANE ou MN também foi relatada por outros autores. Carrasco et al. (1990) relataram não haver encontrado correlação entre as frequências de ANE e MN com as concentrações de hidrocarboneto aromáticos medidas na bile de *Genyonemus lineatus*. Esses autores

apontaram três possibilidades para tal situação: i) as frequências de lesões nucleares de eritrócitos identificadas como micronúcleos ou como análises genotóxicas não são indicadores válidos de exposição aos contaminantes químicos específicos medidos; ii) *Genyonemus lineatus* não foi realmente exposto aos contaminantes químicos medidos; iii) o tamanho amostral não foi muito amplo para avaliação de áreas marginalmente poluídas. Também foi argumentado pelos autores que a possibilidade de uma relação significativa entre as frequências de lesões nucleares e os contaminantes que não foram medidos em seu estudo não poderia ser excluída. Essas duas últimas possibilidades sugeridas também podem ser aplicadas no presente estudo. Guilherme et al. (2008) não encontraram nenhuma indução de anormalidades nucleares durante o inverno, apesar da alta concentração de mercúrio total observada no sangue de *Liza aurata*, na bacia do Laranjo (Aveiro, Portugal). Esses autores justificaram que possivelmente alterações hematológicas dinâmicas, tais como, eritropoese reduzida e/ou aumento da eliminação de eritrócitos, poderiam ter mascarado a expressão da genotoxicidade. Silva et al. (2012) encontraram baixas frequência de ANE em peixes com concentrações de Hg consideradas elevadas. Como explicação os autores sugeriram uma regulação positiva dos mecanismos de reparo, de modo que a exposição a níveis de mercúrio mais altos resultaram em taxas mais eficientes de reparo do DNA ou apoptose celular, levando a uma diminuição do número de eritrócitos circulantes maduros com segregação cromossômica anormal. Segundo Pacheco e Santos (2002a) a ausência circunstancial de um efeito tóxico específico nem sempre revela a ausência de contaminação, mas pode refletir um comprometimento particular da função biológica que pode ocultar a resposta fisiológica real.

O fato das frequências de ANE terem sido similares entre os locais de amostragem pode ser justificado pelos seguintes argumentos: i) é possível que os locais na região norte estejam sobre os mesmos efeitos antrópicos – de metais, ou seja provavelmente não existe um local com maior contaminação que outro. A área referida é homogênea, o que pode ser comprovado por meio das características limnológicas, que não variaram muito entre aqueles pontos, bem como pela observação dos valores de MeHg na água e no sedimento. ii) O tamanho amostral obtido pode não ter sido amplo o suficiente para detectar diferenças mais sutis, principalmente se for considerado que naturalmente as frequências são baixas.

#### 4.3.2. Metalotioneína

As concentrações de MT observadas no presente estudo foram semelhantes às observadas nos espécimes de peixe da espécie *Solea senegalensis* dos tratamentos controle em ensaio com exposição ao Cd realizado por Kalman et al. (2010). Fonseca et al. (2011) também encontraram resultados semelhantes nos espécimes de peixe das espécies *Dicentrarchus labrax* e *Solea senegalensis* em alguns pontos localizados em dois sistemas estuarinos na costa de Portugal, ambos sujeitos a pressão antrópica.

As concentrações de metalotioneína foram ligeiramente maiores nos espécimes de *P. pardalis*. Fernandes et al. (2008) associaram maiores concentrações de MT e metais (Zn, Cd, Cr e Hg) em *Lepidorhombos boscii* com o seu hábito de vida bentônico, atribuindo ao sedimento a fonte de metais. Todavia, essa associação não seria aplicável ao presente estudo tendo em vista que geralmente os peixes carnívoros possuem maiores concentrações de Hg que os detritívoros, e a concentração de MeHg no sedimento foi homogênea ao longo do lago. A possibilidade de algum outro metal ter influenciado as concentrações de MT não pode ser descartada. As MT podem ser induzidas por outros metais (LINDE et al., 2001) além do Hg, como cobre (BOECK et al., 2003), cádmio (MIGLIARINI et al., 2005), arsênio (ROY & BHATTACHARYA, 2005) e zinco (ZHANG & WANG, 2005) representando um mecanismo de sequestro intracelular de metais para proteção à sua toxicidade.

Nos espécimes de *H. malabaricus* as maiores concentrações de MT foram observadas no sul do Lago Janauacá, que por sua vez, também apresentaram maiores concentrações de MeHg na água e nos peixes. Oliveira et al. (2010) encontraram uma correlação positiva entre a MT hepática e a concentração de Hg na água. De acordo com esses autores a alta concentração de MT exibida nos ambientes contaminados revelou uma forte capacidade de defesa de *Liza aurata* contra a toxidade dos metais. O papel de proteção desta proteína contra toxidade dos metais também foi apontado por outros pesquisadores (ASCHNER et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2010; SISCAR et al., 2013). Segundo Aschner et al., (1997) a potente indução de MT sugere que ela desempenha um papel importante na neurotoxicidade induzida pelo Hg, provavelmente por meio da proteção celular pelo menos durante os estágios iniciais de intoxicação.

Com respeito à relação do Hg com a metalotioneína, ainda não existe consenso e pleno entendimento dos mecanismos envolvidos. A inexistência de relação entre a concentração de MT e a concentração de MeHg também foi observada por outros

autores. Nenhum dos tecidos (brânquias, sangue, fígado, cérebro, rim e músculo) investigados por Mieiro et al. (2011) nos espécimes de peixe *Dicentrarchus labrax* apresentou correlações significativas entre as concentrações de Hg total e MT. Os autores chegaram a questionar a aplicabilidade do teor de MT nos tecidos de peixes como biomarcador da exposição ao mercúrio. Walker et al. (2014) também levantaram questionamentos similares após observar a ausência de relação entre a concentração de Hg total e os níveis de MT muscular ou hepático em *Sphyrna tiburo* (elasmobrânquio). Esses autores também apontaram outros possíveis caminhos para explicar os resultados obtidos: i) as diferenças na exposição a outros metais ou fatores como gênero animal, estágio de maturidade, tempo de captura e condições ambientais (por exemplo, salinidade) no momento da captura influenciaram a produção de MT obscurecendo possíveis relações entre os níveis desta proteína e a exposição ao Hg; ii) a natureza semi-quantitativa da análise de MT utilizada não foi suficientemente sensível para detectar diferenças finas na expressão de MT; iii) as concentrações de Hg em *S. tiburo* estavam abaixo do limiar fisiológico necessário para induzir a MT nesses peixes. Outros autores observaram a relação de dependência entre a dose ou concentração crítica de mercúrio e a indução da MT (ROMÈO et al., 1997; SINAIE et al., 2010).

Correlações negativas entre a MT e o Hg também já foram observadas (BEBIANNO et al., 2007; GEHRINGER et al., 2013). Alguns estudos realizados por meio de bioensaios demonstraram a indução de MT pelo Hg (BERNTSSSEN et al., 2004; CHEUNG et al., 2004; JEBALI et al., 2008) e correlações positivas entre a concentração de MT e de Hg foram encontradas (NAVARRO et al., 2009; SINAIE et al., 2010). Todavia, em estudos de campo, o número de trabalhos que relataram essa associação positiva é reduzido (BEBIANNO et al., 2007; NAVARRO et al., 2009; SISCAR et al., 2013). Segundo Gehring et al. (2013) a relação da MT com a exposição ao MeHg não é bem compreendida e pode ser complexa, caso exista.

#### **4.3.3. Histopatologia**

Levando em consideração a classificação desenvolvida por Zimmerli et al. (2007), que posteriormente foi adaptada por Van Dyk et al. (2009) as alterações observadas no tecido hepático dos peixes avaliados no Lago Janauacá podem ser classificadas em três categorias: peixes saudáveis, peixes com modificações leves e peixes com modificações moderadas (Tabela 11). Foi indicado por esses autores que para a interpretação adequada dos resultados da avaliação histopatológica é importante

perceber que uma condição de controle saudável não é caracterizada pela ausência completa de traços histopatológicos, mas pode apresentar alterações discretas, como distúrbios estruturais menores ou reações inflamatórias suaves.

Tabela 11. Ocorrência (%) de peixes com alterações segundo classificação proposta para os valores de índices de lesão.

Índice de lesão (Bernet et al., 1999)	Classificação de Zimmerli et al. 2007	<i>P. pardalis</i> (n=72)	<i>Cichla</i> spp. (n=11)	<i>H. malabaricus</i> (n=8)
Até 10	Peixes saudáveis	68,1	36,4	37,5
11 a 20	Modificações leves	30,6	63,6	37,5
21 a 30	Modificações moderadas	1,4	-	25,0
31 a 40	Modificações pronunciadas	-	-	-
> 40	Modificações severas	-	-	-
Índice de lesão	Adaptado por Van Dyk et al. 2007	<i>P. pardalis</i>	<i>Cichla</i> spp.	<i>H. malabaricus</i>
<10	Modificações leves	58,3	18,2	37,5
10 a 25	Modificações moderadas	40,3	81,8	50,0
26 a 35	Modificações pronunciadas	1,4	-	12,5
> 35	Modificações severas	-	-	-

Bernet et al. (2004) encontraram índice médio de lesão hepática igual a  $3,1 \pm 2,9$  em peixes (*Salmo trutta*) no tratamento controle. Enquanto que em peixes provenientes de área contaminada por águas residuais de tratamento de esgoto os índices médios variaram de  $10,5 \pm 4,9$  a  $16,3 \pm 7,2$  de acordo com o grau de contaminação. A maioria dos espécimes de *P. pardalis* do presente estudo também apresentaram baixos índices de lesão semelhantes aos observados por Bernet et al. (2004) para os indivíduos do tratamento controle. Enquanto a maioria dos espécimes de *Cichla* spp. e *H. malabaricus*, coletados no sul do lago, apresentaram índices mais elevados semelhantes aos observados por Bernet et al., (2004) nos espécimes coletados em área contaminada.

As alterações observadas no presente estudo também têm sido relatadas na literatura como consequência da exposição a diferentes poluentes orgânicos e inorgânicos (RABITTO et al., 2005; VAN DYK et al., 2007; WANGSONGSAK et al., 2007; TRIEBSKORN et al., 2008; VALDEZ DOMINGOS et al., 2009; VELMURUGAN et al., 2009; MELA et al., 2013). Adams et al. (2010) observaram que os espécimes de peixes da espécie *Cynoscion nebulosus* coletados em área mais impactada (região costeira no sul da Flórida) apresentaram dentre outras alterações, infiltração por leucócitos e necroses. Já nos espécimes coletados na área com menor impacto antropogênico (*Indian River lagoon*) foram mais comuns: vacuolização lipídica e por glicogênio. Os autores sugeriram

que os resultados poderiam ser associados com o Hg, visto que os peixes que apresentaram alterações mais profundas apresentaram concentrações mais altas desse metal. Ou também poderiam estar relacionados com outros estressores ambientais, tais como infecção por micropatógenos ou uma combinação de vários outros fatores não relatados ou medidos. Costa et al. (2011) encontraram alterações similares em estudo realizado com sedimento de área contaminada por vários poluentes orgânicos e metais pesados, inclusive Hg, cuja concentração nos sedimentos foi aproximadamente seis vezes maior do que o local de referência avaliado.

Observamos maior ocorrência de peixes com alterações moderadas nos espécimes de *Cichla* spp. e *H. malabaricus*, em especial da região sul, que apresentaram maiores concentrações de MeHg na água e nos peixes (Tabela 9). Alguns pesquisadores tem relatado pronunciadas alterações no tecido hepático de peixes exposto naturalmente ou artificialmente (bioensaio) à espécies de Hg. Oliveira Ribeiro et al. (2002) não encontraram alterações significativas no tecido hepático dos espécimes de *Salvelinus alpinus* expostos a Hg inorgânico. Contudo os espécimes expostos ao MeHg, mesmo em baixas doses, apresentaram redução dos estoques de lipídeos no citoplasma dos hepatócitos, necrose massiva e infiltração por células fagocitárias. Essas lesões também foram observadas em *H. malabaricus*, *Cichla* spp. e *P. pardalis*. Mela et al. (2007) também observaram a presença de múltiplas áreas de necroses em *H. malabaricus* confirmando os efeitos prejudiciais do MeHg mesmo em baixa exposição trófica. Foi sugerido por esses autores que as lesões e danos aos tecidos poderiam ser resultado de mecanismos de defesa muito lentos naquelas células para imobilizar ou eliminar o metilmercúrio ingerido, demonstrando que a sensibilidade das células de peixes à exposição ao mercúrio é maior do que foi descrita anteriormente na literatura.

Poucos estudos avaliaram o efeito da exposição crônica (em campo) do Hg em espécies de peixes da Amazônia, e estes dados tornam-se ainda mais escassos no que se refere ao uso de biomarcadores nesta avaliação. Rabitto et al. (2011) associaram lesões histopatológicas no fígado de *Cichla monoculus*, coletados em um reservatório na Amazônia, com a exposição crônica ao Hg e DDT. Silva et al. (2012) também investigaram a exposição crônica ao Hg no mesmo ambiente descrito anteriormente, porém em espécimes de *H. malabaricus*. Foram encontradas diversas alterações celulares como vacuolizações e focos necróticos em todas as amostras, além de infiltrações leucocitárias. Segundo os autores citados, esses achados histológicos, que também foram

observados no presente estudo, fornecem evidência de que o mercúrio pode comprometer a qualidade de vida dos organismos cronicamente expostos.

Mesmo que as lesões histopatológicas não tenham apresentado relação específica com o MeHg, este tipo de abordagem tem sido uma ferramenta largamente utilizada em biomonitoramento na avaliação da qualidade da água de áreas consideradas impactadas (VALDEZ DOMINGOS et al., 2009). As interpretações dos efeitos em animais nativos são bastante difíceis principalmente devido à presença de outros poluentes e as interações entre eles ainda são um desafio para os ecotoxicologistas (RABITTO et al., 2011). Conseguir encontrar uma relação direta entre um agente estressor e uma resposta biológica em uma avaliação em campo onde muitos múltiplos agentes estressores estão presentes pode ser considerado mais uma exceção do que a regra (ZIMMERLI et al., 2007). Para uma melhor compreensão dos efeitos tóxicos do MeHg em peixes ainda são necessários mais estudos, principalmente em uma região tão dinâmica quanto a Amazônia, onde os peixes dispõem de diferentes estratégias fisiológicas e de forrageio para sobreviver em um ambiente que muda muito ao longo do ano e estão expostos a concentrações de Hg que são consideradas nocivas e são muito influenciadas pelas características físico-químicas dos diferentes tipos da água. Em concordância com pesquisas anteriores a espécie *H. malabaricus* mostrou-se a mais indicada neste tipo de avaliação e um tamanho amostral mais amplo é recomendado para maior elucidação dos efeitos do MeHg.



## CONCLUSÕES

- No período de cheia foram detectadas concentrações mais elevadas de metilmercúrio na água e no sedimento do Lago Janauacá. Atribuímos isso à uma maior taxa de metilação que deve ocorrer neste período hidrológico sob influência das seguintes variáveis: profundidade da coluna d'água, oxigênio dissolvido, carbono orgânico dissolvido, pH e condutividade elétrica.
- A região sul do Lago Janauacá apresentou maiores concentrações de metilmercúrio na água e nos peixes porque provavelmente possui uma maior taxa de metilação e o metilmercúrio biodisponível pode ser facilmente bioacumulado e biomagnificado nos peixes topo de cadeia.
- Dentre as espécies de peixe estudadas, *Hoplias malabaricus* foi a única espécie com ocorrência nas regiões norte e sul do lago. Portanto, apresentou-se como melhor espécie bioindicadora para avaliação da bioacumulação de metilmercúrio e biomarcadores do que *Pterygoplichthys pardalis* e *Cichla* spp. no Lago Janauacá.
- Dos biomarcadores avaliados, a concentração de metalotioneína e os índices de lesão hepática indicam que os peixes da região sul do Lago Janauacá podem estar sob maior estresse ambiental que os da região norte.
- O Lago Janauacá apresenta heterogeneidade espaço-temporal. Nossos resultados indicam que a dinâmica do mercúrio, a bioacumulação e os efeitos nos peixes foram mais expressivos na região sul do lago. Assim sugere-se considerar a região sul do lago como área de maior suscetibilidade e a cheia como período de maior vulnerabilidade para a proposição de medidas de manejo e conservação quando necessário.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. H. et al. 2010. "Mercury Contamination in Spotted Seatrout, *Cynoscion Nebulosus*: An Assessment of Liver, Kidney, Blood, and Nervous System Health." *Science of the Total Environment* 408(23): 5808–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.019>.
- ADAMS, S. M. et al. 1989. "The Use of Bioindicators for Assessing the Effects of Pollutant Stress on Fish." *Marine Environmental Research* 28(1–4): 459–64.
- AGAMY, E. 2012. "Histopathological Changes in the Livers of Rabbit Fish (*Siganus Canaliculatus*) Following Exposure to Crude Oil and Dispersed Oil." *Toxicologic Pathology*: 1128–40.
- AHMED, Md K. et al. 2013. "Arsenic Induced Toxicity and Histopathological Changes in Gill and Liver Tissue of Freshwater Fish, Tilapia (*Oreochromis Mossambicus*)." *Experimental and Toxicologic Pathology* 65(6): 903–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2013.01.003>.
- AITIO, A., A. BERNARD, B. F. FOWLER, and G. NORDBERG. 2007. "Biological Monitoring and Biomarkers." In *Handbook on the Toxicology of Metals*, ed. G. F. et al. NORDBERG. New York: Elsevier, 65–78.
- AL-SABTI, K. 1994. "Micronuclei Induced by Selenium, Mercury, Methylmercury and Their Mixtures in Binucleated Blocked Fish Erythrocyte Cells." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 320(1–2): 157–63.
- AL-SABTI, K., and C. D. METCALFE. 1995. "Fish Micronuclei for Assessing Genotoxicity in Water." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 343(2–3): 121–35.
- AL-SABTI, K., and J. HARDIG. 1990. "Micronucleus Test in Fish for Monitoring the Genotoxic Effects of Industrial Waste Products in the Baltic Sea, Sweden." *Comp. Biochem. Physiol. [C]* 97(1): 179–82.
- ALMEIDA, R. 2012. "Estudo da Origem, Mobilização e Organificação do Mercúrio no Reservatório da UHE - Samuel, RO." Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- AMORIM, L. C. A. 2003. "Os Biomarcadores E Sua Aplicação Na Avaliação Da Exposição Aos Agentes Químicos Ambientais." *Revista Brasileira de Epidemiologia* 6: 158–70.
- ARKHIPCHUK, V. V., and N. N. GARANKO. 2005. "Using the Nucleolar Biomarker and the Micronucleus Test on in Vivo Fish Fin Cells." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62(1): 42–52.

- ASCHNER, M. et al. 1997. "Metallothionein Induction in Fetal Rat Brain and Neonatal Primary Astrocyte Cultures by in Utero Exposure to Elemental Mercury Vapor (Hg<sup>0</sup>).” *Brain Research* 778(1): 222–32.
- ASEFI, M., and R. ZAMANI-AHMADMAHMOODI. 2015. "Mercury Concentrations and Health Risk Assessment for Two Fish Species, *Barbus Grypus* and *Barbus Luteus*, from the Maroon River, Khuzestan Province, Iran.” *Environmental Monitoring and Assessment* 187(10).
- AU, D. W. T. 2004. "The Application of Histo-Cytopathological Biomarkers in Marine Pollution Monitoring: A Review.” *Marine Pollution Bulletin* 48(9–10): 817–34.
- AYLLON, F., and E. GARCIA-VAZQUEZ. 2000. "Induction of Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in European Minnow *Phoxinus Phoxinus* and Mollie *Poecilia Latipinna*: An Assessment of the Fish Micronucleus Test.” *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 467(2): 177–86.
- AZEVEDO, J. S., E. S. BRAGA, and C. A. OLIVEIRA RIBEIRO. 2012. "Nuclear Abnormalities in Erythrocytes and Morphometric Indexes in the Catfish *Cathorops Spixii* (Ariidae) from Different Sites on the Southeastern Brazilian Coast.” *Brazilian Journal of Oceanography* 60(3): 323–30.
- BAATRUP, E. 1991. "Structural and Functional Effects of Heavy Metals on the Nervous System, Including Sense Organs, of Fish.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100(1–2): 253–57. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/074284139190163N>.
- BARBOSA, A. C. et al. 2003. "Mercury Biomagnification in a Tropical Black Water, Rio Negro, Brazil.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45(2): 235–46.
- BARBOSA, J. S. et al. 2010. "Genotoxicity Assessment in Aquatic Environment Impacted by the Presence of Heavy Metals.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(3): 320–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.10.008>.
- BARRON, M. G. 1995. "Bioaccumulation and Bioconcentration in Aquatic Organism.” In *Handbook of Ecotoxicology*, ed. D. J. et al. HOFFMAN. Boca Raton: LEWIS, 220–40.
- BARŠIENE, J. et al. 2006. "Investigation of Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Peripheral Blood and Kidney of Marine Fish Treated with Crude Oil.” *Aquatic Toxicology* 78(SUPPL.): 99–104.
- BARŠIENĖ, J., L. BUTRIMAVIČIENĖ, A. MICHAILOVAS, and W. GRYGIEL. 2015.

- “Assessing the Environmental Genotoxicity Risk in the Baltic Sea: Frequencies of Nuclear Buds in Blood Erythrocytes of Three Native Fish Species.” *Environmental Monitoring and Assessment* 187(1): 1–12.
- BARTELL, S. 2006. “Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment - A Brief Review and Evaluation.” *Environmental Bioindicators* 1(1): 60–73.
- BASTOS, W. R., L. D. and LACERDA. 2004. “A Contaminação Por Mercúrio Na Bacia Do Rio Madeira: Uma Breve Revisão.” *Geochimi Brasil* 18(2): 99–114.
- BASTOS, W. R., R. ALMEIDA, J. G. DÓREA, and A.C. BARBOSA. 2007. “Annual Flooding and Fish-Mercury Bioaccumulation in the Environmentally Impacted Rio Madeira (Amazon).” *Ecotoxicology* 16(3): 341–46.
- BASTOS, W. R. et al. 2008. “A Description of Mercury in Fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil.” *Acta Amazonica* 38(3): 431–38.
- BEBIANNO, M. J. et al. 2007. “Hg and Metallothionein-like Proteins in the Black Scabbardfish *Aphanopus Carbo*.” *Food and Chemical Toxicology* 45(8): 1443–52.
- BELGER, L., and B. R. FORSBERG. 2006. “Factors Controlling Hg Levels in Two Predatory Fish Species in the Negro River Basin, Brazilian Amazon.” *Science of the Total Environment* 367(1): 451–59.
- BELTRAN-PEDREROS, S. et al. 2011. “Mercury Bioaccumulation in Fish of Commercial Importance from Different Trophic Categories in an Amazon Floodplain Lake.” *Neotropical Ichthyology* 9(4): 901–8.
- BELZILE, N. et al. 2006. “The Effect of Selenium on Mercury Assimilation by Freshwater Organisms.” *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63: 1–10.
- . 2009. “Selenium Bioaccumulation in Freshwater Organisms and Antagonistic Effect against Mercury Assimilation.” 4(April 2014): 203–21.
- BENSON, W.H., K.N. BAER, and C.F. WATSON. 1990. “Metallothionein as a Biomarker of Environmental Metal Contamination.” In *Biomarkers of Environmental Contamination*, ed. L. R. MCCARTHY, J. F., SHUGART. Boca Raton: Lewis Publishers, 255–65.
- BERNET, D. et al. 1999. “Histopathology in Fish: Proposal for a Protocol to Assess Aquatic Pollution.” *Journal of Fish Diseases* 22(1): 25–34.
- BERNET, D., H. SCHMIDT-POSTHAUS, T. WAHLI, and P. BURKHARDT-HOLM. 2004. “Evaluation of Two Monitoring Approaches to Assess Effects of Waste Water Disposal on Histological Alterations in Fish.” *Hydrobiologia* 524(1): 53–66.

- BERNTSSEN, M. H. G. et al. 2004. "Maximum Limits of Organic and Inorganic Mercury in Fish Feed." *Aquaculture Nutrition* 10(2): 83–97.
- BOECK, G., T. T. H. NGO, K. V. CAMPENHOUT, and R. BLUST. 2003. "Differential Metallothionein Induction Patterns in Three Freshwater Fish during Sublethal Copper Exposure." *Aquatic Toxicology* 65(4): 413–24.
- BOLOGNESI, C. et al. 2006. "Assessment of Micronuclei Induction in Peripheral Erythrocytes of Fish Exposed to Xenobiotics under Controlled Conditions." *Aquatic Toxicology* 78(SUPPL.): 93–98.
- BOLOGNESI, C., and M. HAYASHI. 2011. "Micronucleus Assay in Aquatic Animals." *Mutagenesis* 26(1): 205–13.
- BOMBAIL, V., D. AW, E. GORDON, and J. BATTY. 2001. "Application of the Comet and Micronucleus Assays to Butterfish (*Pholis Gunnellus*) Erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland." *Chemosphere* 44(3): 383–92.
- BONNET, M. P. et al. 2017. "Amazonian Floodplain Water Balance Based on Modelling and Analyses of Hydrologic and Electrical Conductivity Data." *Hydrological Processes* 31(9): 1702–18.
- BRITO, B. C. et al. 2017. "The Influence of Inundation and Lake Morphometry on the Dynamics of Mercury in the Water and Plankton in an Amazon Floodplain Lake." *Hydrobiologia* 790(1): 35–48.
- BURGEOT, T. et al. 2001. "Monitoring of Biological Effects of Pollutants." In *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach.*, ed. P. H. et al. GARRIGUES. Elsevier Science, 179–213.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444829139500092>.
- BURGER, J., K. F. GAINES and M. GOCHFELD. 2001. Ethnic differences in risk from mercury among Savannah River. *Fishermen Risk Anal.* 21:533–544.  
doi:10.1111/0272-4332.213130
- CARMO, C. A., D. M. S. ABESSA, and J. G. M. NETO. 2011. "Metais Em Águas, Sedimentos E Peixes Coletados No Estuário de São Vicente-SP, Brasil." *Mundo da Saude* 35(1): 64–70.
- CARRASCO, K. R., K. L. TILBURY, and M. S. MYERS. 1990. "Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in Situ." (3).
- CAVALCANTE, A.L. M. 2009. "Parâmetros Sanguíneos de Tilápia (*Oreochromis Niloticus*) No Monitoramento Ambiental Do Chumbo." : 59.
- ÇAVALAŞ, T. 2008. "In Vivo Genotoxicity of Mercury Chloride and Lead Acetate:

- Micronucleus Test on Acridine Orange Stained Fish Cells.” *Food and Chemical Toxicology* 46(1): 352–58.
- ÇAVAŞ, T., and S. ERGENE-GÖZÜKARA. 2003. “Micronuclei, Nuclear Lesions and Interphase Silver-Stained Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) as Cytogenotoxicity Indicators in *Oreochromis Niloticus* Exposed to Textile Mill Effluent.” *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 538(1–2): 81–91.
- CHAPMAN, L., and H. M. CHAN. 2000. “The Influence of Nutrition on Methyl Mercury Intoxication.” *Environmental Health Perspectives* 108(March 2000): 1–17.
- CHEUNG, A. P. L., T. H. J. LAM, and K. M. CHAN. 2004. “Regulation of Tilapia Metallothionein Gene Expression by Heavy Metal Ions.” *Marine Environmental Research* 58(2–5): 389–94.
- CHOVANEC, A., R.; HOFER, and F. SCHIEMER. 2003. “Fish as Bioindicators.” In *Bioindicators & Biomonitoring Principles, Concepts and Applications*, ed. H. G. MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER. Elsevier Science, 639–76.
- COQUERY, M. et al. 2003. “Methylmercury Formation in the Anoxic Waters of the Petit-Saut Reservoir (French Guiana) and Its Spreading in the Adjacent Sinnamary River.” *Journal De Physique Iv* 107(June 1999): 327–31.
- CORREIA, R. R. S., M. R. MIRANDA, and J. R. D. GUIMARÃES. 2012. “Mercury Methylation and the Microbial Consortium in Periphyton of Tropical Macrophytes: Effect of Different Inhibitors.” *Environmental Research* 112: 86–91.
- COSSON, R. P. 1994. “Heavy Metal Intracellular Balance and Relationship with Metallothionein Induction in the Gills of Carp. After Contamination by Ag, Cd, and Hg Following Pretreatment with Zn or Not.” *Biol. Trace Elem. Res.* 46(3): 229–45.
- COSTA, P. M. et al. 2011. “Estuarine Ecological Risk Based on Hepatic Histopathological Indices from Laboratory and in Situ Tested Fish.” *Marine Pollution Bulletin* 62(1): 55–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.09.009>.
- CRETÌ, P., F. TRINCHELLA, and R. SCUDIERO. 2010. “Heavy Metal Bioaccumulation and Metallothionein Content in Tissues of the Sea Bream *Sparus Aurata* from Three Different Fish Farming Systems.” *Environmental Monitoring and Assessment* 165(1–4): 321–29.
- CRUZ, Z. M. A. et al. 2013. “Biochemical and Cellular changes in *Oreochromis Niloticus* Related to the Water Pollution of a Degraded River.” *Acta Scientiarum - Biological Sciences* 35(3): 419–27.

- DIZER, H. H. C. SILVA DE ASIS, and P. D. HANSEN. 2001. "Cholinesterase Activity as a Bioindicator for Monitoring Marine Pollution in the Baltic Sea and the Mediterranean Sea." In *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach*, ed. P. H. et al. GARRIGUES. Elsevier Science B.V, 237–57.
- DOREA, J. G. 2003. "Fish Are Central in the Diet of Amazonian Riparians: Should We Worry about Their Mercury Concentrations?" *Environmental Research* 92(3): 232–44.
- DUNNE, T. et al. 1998. "Exchanges of Sediment between the Flood Plain and Channel of the Amazon River in Brazil." *Bulletin of the Geological Society of America* 110(4): 450–67.
- ESTEVEES, F. A. 2011. *Fundamentos de Limnologia*. 3<sup>a</sup>. ed. Ed. Interciência. Rio de Janeiro.
- FADINI, P. S., and W. F. JARDIM. 2001. "Is the Negro River Basin (Amazon) Impacted by Naturally Occurring Mercury?" *Science of the Total Environment* 275(1–3): 71–82.
- FALFUSHYNSKA, H. I., L. L. GNATYSHYNA, O. B. STOLIAR, and Y. K. NAM. 2011. "Various Responses to Copper and Manganese Exposure of *Carassius Auratus* Gibelio from Two Populations." *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 154(3): 242–53.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.06.001>.
- FARELLA, N., M. LUCOTTE, P. LOUCHOUARN, and M. ROULET. 2001. "Deforestation Modifying Terrestrial Organic Transport ' S , Brazilian Amazon in the Rio Tapajo." 32: 1443–58.
- FENECH, M. 2000. "The in Vitro Micronucleus Technique." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455(1–2): 81–95.
- FERNANDES, D., M. J. BEBIANNO, and C. PORTE. 2008. "Hepatic Levels of Metal and Metallothioneins in Two Commercial Fish Species of the Northern Iberian Shelf." *Science of the Total Environment* 391(1): 159–67.
- FERRARO, M. V. M et al. 2004. "Mutagenic Effects of Tributyltin and Inorganic Lead (Pb II) on the Fish *H. Malabaricus* as Evaluated Using the Comet Assay and the Piscine Micronucleus and Chromosome Aberration Tests." *Genetics and Molecular Biology* 27(1): 103–7.
- FERREIRA, M. R. S. 2013. "Perfil Genotóxico E Bioacumulação de Metais Em *Hoplias Malabaricus* Amazônicas de Tributários Dos Rios Negro E Solimões." Instituto

- Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- FISHER, T. R., and P. E. PARSLEY. 1979. "Amazon Lakes: Water Storage and Nutrient Stripping by Algae." *Limnology and Oceanography* 24(3): 547–53.
- FONSECA, V. F. et al. 2011. "Multi-Biomarker Responses to Estuarine Habitat Contamination in Three Fish Species: *Dicentrarchus Labrax*, *Solea Senegalensis* and *Pomatoschistus Microps*." *Aquatic Toxicology* 102(3–4): 216–27.
- FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. 2005. "The Use of Biomarkers in Aquatic Toxicology Studies." *Revista Portuguesa de Zootecnia* XII(1): 67–86.
- FORSBERG, B.R. et al. 1988. "Factors Controlling Nutrient Amazon Floodplain Lakes'." *Energia Nuclear* 33(1): 41–56.
- FOSTIER, A. H. et al. 1999. "Mercury Accumulation in Natural Forested Amazonian Soils." In *Proceedings of the Fifth International Conference on Mercury as a Global Pollutant.*, Rio de Janeiro, 557.
- FREIRE, M. M., V. G. SANTOS, I. S. F. GINUINO, and A. R. L. ARIAS. 2008. "Biomarcadores Na Avaliação Da Saúde Ambiental Dos Ecossistemas Aquáticos." *Oecologia Australis* 12(3): 347–54.  
<http://www.oecologiaaustralis.org/ojs/index.php/oa/article/view/111/37>.
- GARVEY, J. S. 1990. "Metallothionein: A Potential Biomonitor of Exposure to Environmental Toxins." In *Biomarkers of Environmental Contamination*, ed. L. R. MCCARTHY, J. F., SHUGART. Boca Raton: Lewis Publishers, 3–14.
- GEHRINGER, Daphne B. et al. 2013. "Assessing Mercury Exposure and Biomarkers in Largemouth Bass (*Micropterus Salmoides*) from a Contaminated River System in California." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64(3): 484–93.
- GERNHÖFER, Maike et al. 2001. "Ultrastructural Biomarkers as Tools to Characterize the Health Status of Fish in Contaminated Streams." *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8(3–4): 241–60.
- GOMES, M. V. T., and Y. SATO. 2011. "Rio São Francisco À Jusante Da Represa De Três Marias , Minas Evaluation of Heavy Metal Contamination in Fish of the São Francisco River , Downstream From the Três Marias Dam , Minas Gerais , Brazil." *Saúde e Ambiente* 6(1): 24–30.
- GRISOLIA, C. K. et al. 2009. "Profile of Micronucleus Frequencies and DNA Damage in Different Species of Fish in a Eutrophic Tropical Lake." *Genetics and Molecular Biology* 32(1): 138–43.



- GUARDIOLA, F. A. et al. 2013. "Accumulation, Histopathology and Immunotoxicological Effects of Waterborne Cadmium on Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*).” *Fish and Shellfish Immunology* 35(3): 792–800. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.011>.
- GUILHERME, S. et al. 2008. "Erythrocytic Nuclear Abnormalities in Wild and Caged Fish (*Liza Aurata*) along an Environmental Mercury Contamination Gradient.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70(3): 411–21.
- GUIMARÃES, J. R. D. et al. 1999. "Mercury in Human and Environmental Samples from Two Lakes in Amapá, Brazilian Amazon.” *Ambio* 28(4): 296–301.
- GUIMARÃES, J. R. D., M. ROULET, M. LUCOTTE, and D. MERGLER. 2000. "Mercury Methylation along a Lake-Forest Transect in the Tapajos River Floodplain, Brazilian Amazon: Seasonal and Vertical Variations.” *Science of the Total Environment* 261(1–3): 91–98.
- HAGGER, J. A. et al. 2008. "Application of Biomarkers for Improving Risk Assessments of Chemicals under the Water Framework Directive: A Case Study.” *Marine Pollution Bulletin* 56(6): 1111–18.
- HANDY, R. D. 1996. "Dietary Exposure to Toxic Metals in Fish.” *Toxicology, molecular and cellular approaches*: 29–60.
- HANSEN, P. D. 2003. "Biomarkers.” In *Bioindicators and Biomonitors*, ed. H. G. MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER. Elsevier Science, 203–20.
- HEATH, D D. 1995. "Water Pollution and Fish Physiology.” second: 79–123.
- HEDAYATI, A. 2013. "Acute Toxicity Test of Mercuric Chloride ( $HgCl_2$ ), Lead Chloride ( $PbCl_2$ ) and Zinc Sulphate ( $ZnSO_4$ ) in Common Carp (*Cyprinus Carpio*).” *Journal of Clinical Toxicology* 3(1): 2–5. <http://www.omicsonline.org/2161-0495/2161-0495-3-156.digital/2161-0495-3-156.html>.
- HEDDLE, J. A. 1973. "A Rapid in Vivo Test for Chromosomal Damage.” *Mutation research* 18(2): 187–90.
- HESS, L. L. et al. 2003. "Dual-Season Mapping of Wetland Inundation and Vegetation for the Central Amazon Basin.” *Remote Sensing of Environment* 87(4): 404–28.
- HODSON, P. V. 1988. "The Effect of Metal Metabolism on Uptake, Disposition and Toxicity in Fish.” *Aquatic Toxicology* 11(1–2): 3–18.
- HYLANDER, L. D. et al. 2006. "Fish Mercury Increase in Lago Manso, a New Hydroelectric Reservoir in Tropical Brazil.” *Journal of Environmental Management* 81(2): 155–66.

- IRION, G., W.J. JUNK, and J. A. S. N. de MELLO. 1997. "The Large Central Amazonian River Floodplains near Manaus: Geological, Climatological, Hydrological and Geomorphological Aspects." *The Central Amazon floodplain: ecology of a pulsing system* 126: 23–46.
- JEBALI, J. et al. 2008. "Metallothionein Induction by Cu, Cd and Hg in *Dicentrarchus Labrax* Liver: Assessment by RP-HPLC with Fluorescence Detection and Spectrophotometry." *Marine Environmental Research* 65(4): 358–63.
- JERNELÖV, A., and H. LANN. 1971. "Mercury Accumulation in Food Chains." *Oikos* 22: 403–6.
- JESUS, I. S., M. M. CESTARI, M. A. BEZERRA, and P. R. A. M. AFFONSO. 2016. "Genotoxicity Effects in Freshwater Fish from a Brazilian Impacted River." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 96(4): 490–95.
- JESUS, T. B., and C. E. V. CARVALHO. 2008. "Utilização de Biomarcadores Em Peixes Como Ferramenta Para Avaliação de Contaminação Ambiental Por Mercúrio (Hg)." *Oecologia Brasiliensis* 12(4): 680–93.
- JOBLING, M.G. 1995. 14 *Environmental Biology of Fishes*. London.: CHAPMAN AND HALL, NEW YORK, NY (USA).
- JUNK, W. J. 1997. "General Aspects of Floodplain Ecology with Special Reference to Amazonian Floodplains." *Ecological Studies* 126: 1–20.  
<http://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=1eMWTwL4rbEC&pgis=1>.
- KALMAN, J., I. RIBA, T. Á. DELVALLS, and J. BLASCO. 2010. "Comparative Toxicity of Cadmium in the Commercial Fish Species *Sparus Aurata* and *Solea Senegalensis*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(3): 306–11.
- KASPER, D. et al. 2014. "Reservoir Stratification Affects Methylmercury Levels in River Water, Plankton, and Fish Downstream from Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas, Brazil." *Environmental Science and Technology* 48(2): 1032–40.
- KASPER, D., E. F. A. PALERMO, C. W. C. BRANCO, and O. MALM. 2012. "Evidence of Elevated Mercury Levels in Carnivorous and Omnivorous Fishes Downstream from an Amazon Reservoir." *Hydrobiologia* 694(1): 87–98.
- KEHRIG, H. A, B. M. HOWARD, and O. MALM. 2008. "Methylmercury in a Predatory Fish (*Cichla* Spp.) Inhabiting the Brazilian Amazon." *Environmental Pollution* 154(1): 68–76.
- KIRSCHBAUM, A. A. et al. 2009. "Cytogenotoxicity Biomarkers in Fat Snook *Centropomus Parallelus* from Cananéia and São Vicente Estuaries, SP, Brazil."

- Genetics and Molecular Biology* 32(1): 151–54.
- KOCHHANN, D., M. M. JARDIM, F. X. VALDEZ DOMINGOS, and A. . VAL. 2015. “Biochemical and Behavioral Responses of the Amazonian Fish *Colossoma Macropomum* to Crude Oil: The Effect of Oil Layer on Water Surface.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111: 32–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.016>.
- KWAANSA-ANSAH, E. E., N. K; ASARE-DONKOR, A. ADIMADO, and D. NAM. 2013. “Evaluation of Mercury and Selenium Concentrations in the Edible Tissue of Freshwater Fish from the Volta Lake in Ghana.” *Journal of Environmental and Occupational Science* 2(3): 109–18. <http://www.scopemed.org/?mno=43106>.
- LAM, P. K S, and J. S. GRAY. 2003. “The Use of Biomarkers in Environmental Monitoring Programmes.” *Marine Pollution Bulletin* 46(2): 182–86.
- LAM, P. K S. 2009. “Use of Biomarkers in Environmental Monitoring.” *Ocean and Coastal Management* 52(7): 348–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2009.04.010>.
- LAWRENCE, A., and K. HEMINGWAY. 2003. *The Progressive Fish-Culturist Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses*. [http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8640\(1936\)320\[1:EOPOF\]2.0.CO;2](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8640(1936)320[1:EOPOF]2.0.CO;2).
- LESACK, L. F.W., and J. M. MELACK. 1995. “Flooding Hydrology and Mixture Dynamics of Lake Water Derived from Multiple Sources in an Amazon Floodplain Lake.” *Water Resources Research* 31(2): 329–45.
- LINDE, A. R., S. SÁNCHEZ-GALÁN, P. VALLÉS-MOTA, and E. GARCÍA-VÁZQUEZ. 2001. “Metallothionein as Bioindicator of Freshwater Metal Pollution: European Eel and Brown Trout.” *Ecotoxicology and environmental safety* 49: 60–63.
- LINS, J. A. P. N., P. G. KIRSCHNIK, V. S. QUEIROZ, and S. M. CIRIO. 2010. “Uso de Peixes Como Biomarcadores Para Monitoramento Ambiental Aquático.” *Rev. Acad., Ciênc. Agrár Ambient* 8(4): 469–84.
- MACKAY, D. 1982. “Correlation of Bioconcentration Factors.” *Environmental Science & Technology* 16(5): 274–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257252>.
- MAIA, P. D. et al. 2009. “Mercury Distribution and Exchanges between the Amazon River and Connected Floodplain Lakes.” *Science of the Total Environment* 407(23): 6073–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.08.015>.

- MALM, O., PFEIFFER, W. C., SOUZA, C. M., & REUTHER, R. 1990. "Mercury Pollution due to Gold Mining in the Madeira River Basin, Brazil." *Ambio* 19(1): 11–15. <http://www.cabdirect.org/abstracts/19902070147.html>.
- MALM, O. et al. 1995. "Mercury and Methylmercury in Fish and Human Hair from the Tapajós River Basin, Brazil." *Science of the Total Environment* 175(2): 141–50.
- MARTINELLI, L. A., J. R. FERREIRA, B. R. FORSBERG, and R. L. VICTORIA. 1988. "Mercury Contamination in the Amazon : A Gold Rush Consequence." *Ambio* 17(4): 252–54.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jrurstud.2014.11.007>  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.08.015>  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08941920.2015.1014606>  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2009.10.020>  
<http://www.sciencedirect.com/sci>.
- MATSUMOTO, S. T. et al. 2006. "Genotoxicity and Mutagenicity of Water Contaminated with Tannery Effluents as Evaluated by the Micronucleus Test and Comet Assay Using the Fish *Oreochromis Niloticus* and Chromosome Aberrations in Onion Root-Tips." *Genetics and Molecular Biology* 29(1): 148–58.
- MAURICE-BOURGOIN, L., I. QUIROGA, J. CHINCHEROS, and P. COURAU. 2000. "Mercury Distribution in Waters and Fishes of the Upper Madeira Rivers and Mercury Exposure in Riparian Amazonian Populations." *Science of the Total Environment* 260(1): 73–86.
- MAYCOCK, B.J., D.J. BENFORD. 2007. Risk assessment of dietary exposure to methylmercury in fish in the UK. *Hum Exp Toxicol.* 26:185–190.  
[doi:10.1177/0960327107070565](https://doi.org/10.1177/0960327107070565)
- MCCARTHY, J. F., and L. R. SHUGART. 1990. "Biological Markers of Environmental Contamination." In *Biomarkers of Environmental Contamination.*, ed. Stuart LR McCarthy JF. Florida: Lewis Publishers, 3–14.
- MCCARTY, L.S., and K.R. MUNKITTRICK. 1996. "Environmental Biomarkers in Aquatic Toxicology: Fiction, Fantasy, or Functional?" *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 2(2): 268–74.
- MELA, M. et al. 2007. "Effects of Dietary Methylmercury on Liver and Kidney Histology in the Neotropical Fish *Hoplias Malabaricus*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68(3): 426–35.
- . 2013. "Effects of the Herbicide Atrazine in Neotropical Catfish (*Rhamdia Quelen*)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93: 13–21.

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.026>.
- MELACK, J. M., and T. R. FISHER. 1990. "Comparative Limnology of Tropical Floodplain Lakes with an Emphasis on The. Central Amazon." *Acta Limnologica Brasiliensia* 3: 1–48.
- MELACK, J. M. et al. 2009. "Floodplain Ecosystem Processes in Amazonia and Global Change." *Geophysical Monograph Series* 186: 525–41.
- MELACK, J. M., and B. R. FORSBERG. 2001. "The Biogeochemistry of the Amazon Floodplain Lakes and Associated Wetlands." *The Biogeochemistry of the Amazon Basin and its Role in a Changing World*: 235–76.
- MELANCON, Mark J. 1995. "Bioindicators Used in Aquatic and Terrestrial Monitoring." In *Handbook of Ecotoxicology*, ed. D. J. et al HOFFMAN. Boca Raton: Lewis.
- MELO, K. M. et al. 2013. "Profile of Micronucleus Frequencies and Nuclear Abnormalities in Different Species of Electric Fishes (Gymnotiformes) from the Eastern Amazon." *Genetics and Molecular Biology* 36(3): 425–29.
- MIEIRO, C. L. et al. 2012. "Evaluation of Species-Specific Dissimilarities in Two Marine Fish Species: Mercury Accumulation as a Function of Metal Levels in Consumed Prey." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 63(1): 125–36.
- MIEIRO, C. L., A. C. DUARTE, M. E. PEREIRA, and M. PACHECO. 2011. "Mercury Accumulation Patterns and Biochemical Endpoints in Wild Fish (*Liza Aurata*): A Multi-Organ Approach." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(8): 2225–32.
- MIGLIARINI, B. et al. 2005. "Effects of Cadmium Exposure on Testis Apoptosis in the Marine Teleost *Gobius Niger*." *General and Comparative Endocrinology* 142(1–2 SPEC. ISS.): 241–47.
- MILLER, L. L., F. WANG, V. P. PALACE, and A. HONTELA. 2007. "Effects of Acute and Subchronic Exposures to Waterborne Selenite on the Physiological Stress Response and Oxidative Stress Indicators in Juvenile Rainbow Trout." *Aquatic Toxicology* 83(4): 263–71.
- MIRANDA, E. C. A. O. 2013. "Influência Do Pulso de Inundação Do Rio Solimões Sobre Os Processos Geoquímicos E Comunidade Fitoplanctônica Do Lago Janauacá, Amazonas, Brasil." : 125.
- MIRANDA, M. R.; et al. 2007. "Mercúrio Em Sistemas Aquáticos: Fatores Ambientais Que Afetam a Metilação." *Oecologia Brasiliensis* 11(2): 240–51.
- MONTEIRO, D. A., F. T. RANTIN, and A. L. KALININ. 2010. "Inorganic Mercury

- Exposure: Toxicological Effects, Oxidative Stress Biomarkers and Bioaccumulation in the Tropical Freshwater Fish Matrinxã, Brycon Amazonicus (Spix and Agassiz, 1829)." *Ecotoxicology* 19(1): 105–23.
- MONTEIRO, V. et al. 2011. "In Vivo and in Vitro Exposures for the Evaluation of the Genotoxic Effects of Lead on the Neotropical Freshwater Fish Prochilodus Lineatus." *Aquatic Toxicology* 104(3–4): 291–98.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.002>.
- MOORE, M. N, and M. C. SIMPSON. 1992. "Molecular and Celular Pathology in Environmental Impact Assessment." *Aquatic Toxicology* 22: 313–22.
- MOREL, F. M. M., A. M. L. KRAEPIEL, A. M. L., M. AMYOT. 1998. " The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury" *Annual Review of Ecology Systematics.*, 29, 543–566,
- MUHVICH, A.G., R.T. JONES, and A.S. KANE. 1995. "Effects of Chronic Copper Exposure on the Macrophage Chemiluminescent Response and Gill Histology in Goldfish ( Carassius Auratus L.)." *Fish & Shellfish ...*: 251–64.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464885700253>.
- MURANLI, F. D.G., and U. GÜNER. 2011. "Induction of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Erythrocytes of Mosquito Fish (Gambusia Affinis) Following Exposure to the Pyrethroid Insecticide Lambda-Cyhalothrin." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 726(2): 104–8.
- MURESAN, B., D. COSSA, S. RICHARD, and Y. DOMINIQUE. 2008. "Monomethylmercury Sources in a Tropical Artificial Reservoir." *Applied Geochemistry* 23(5): 1101–26.
- MURTAUGH, P. A. 2014. "In Defense of P Values." *Ecology* 95(3): 611–17.
- NAVARRO, A. et al. 2009. "Physiological Responses to Mercury in Feral Carp Populations Inhabiting the Low Ebro River (NE Spain), a Historically Contaminated Site." *Aquatic Toxicology* 93(2–3): 150–57.
- NEPOMUCENO, J. C., Íris' FERRARI, M. A. SPANÓ, and A. J. CENTENO. 1997. "Detection of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of Cyprinus Carpio Exposed to Metallic Mercury." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30(3): 293–97.
- NUNN, J.W., D.R. LIVINGSTONE, and J.K. CHIPMAN. 1996. "Effect of Genetic Toxicants in Aquatic Organisms." In *Toxicology and Aquatic Pollution: Physiological, Molecular and Cellular Approaches*, ed. E. W. TAYLOR. Cambridge University, 225–251.

- OLIVEIRA, M. et al. 2010. "Hepatic Metallothionein Concentrations in the Golden Grey Mullet (*Liza Aurata*) - Relationship with Environmental Metal Concentrations in a Metal-Contaminated Coastal System in Portugal." *Marine Environmental Research* 69(4): 227–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.10.012>.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., L. BELGER, É. PELLETIER, and C. ROULEAU. 2002. "Histopathological Evidence of Inorganic Mercury and Methyl Mercury Toxicity in the Arctic Charr (*Salvelinus Alpinus*)." *Environmental Research* 90(3): 217–25.
- OLSSON, M., 1976. "Mercury level as function of size and age in northern pike, one and five years after the mercury ban in Sweden'." *Ambio*. 5, 73–76.
- OLSSON, P.E. 1996. "Metallothioneins in Fish: Induction and Use in Environmental Monitoring." In *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Molecular and Cellular Approaches*, ed. TAYLOR E. W. Cambridge: Cambridge Univ Press, 29–60.
- OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. 2011. *Cooperação Técnica Entre Brasil, Bolívia E Colômbia: Teoria E Prática Para O Fortalecimento Da Vigilância Em Saúde de Populações Expostas a Mercúrio*.
- OUÉDRAOGO, O., J.CHÉTELAT, and M. AMYOT. 2015. "Bioaccumulation and Trophic Transfer of Mercury and Selenium in African Sub-Tropical Fluvial Reservoirs Food Webs (Burkina Faso)." *PLoS ONE* 10(4): 1–22.
- PACHECO, M., and M. A. SANTOS. 2002a. "Naphthalene and  $\beta$ -Naphthoflavone Effects on *Anguilla Anguilla* L. Hepatic Metabolism and Erythrocytic Nuclear Abnormalities." *Environment International* 28(4): 285–93.
- PACHECO, M., and M. A. SANTOS. 2002b. "Biotransformation, Genotoxic, and Histopathological Effects of Environmental Contaminants in European Eel (*Anguilla Anguilla* L.)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53(3): 331–47.
- PACHECO, M., and M. A SANTOS. 1997. "Induction of EROD Activity and Genotoxic Effects by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Resin Acids on the Juvenile Eel (*Anguilla Anguilla* L.)." *Ecotoxicology and environmental safety* 38(3): 252–59.
- PAL, M., S. GHOSH, M. MUKHOPADHYAY, and M. GHOSH. 2012. "Methyl Mercury in Fish - A Case Study on Various Samples Collected from Ganges River at West Bengal." *Environmental Monitoring and Assessment* 184(6): 3407–14.
- PARANJAPE, A. R., and B. D. HALL. 2017. "Recent Advances in the Study of Mercury Methylation in Aquatic Systems." *Facets* 2(1): 85–119. <http://facetsjournal.com/article/facets-2016-0027/>.

- PASSOS, C. J. S. et al. 2003. "Eating Tropical Fruit Reduces Mercury Exposure from Fish Consumption in the Brazilian Amazon." *Environmental Research* 93(2): 123–30.
- PASSOS, C. J. S. et al. 2007. "Epidemiologic Confirmation That Fruit Consumption Influences Mercury Exposure in Riparian Communities in the Brazilian Amazon." *Environmental Research* 105(2): 183–93.
- PASSOS, C. J. S. et al. 2008. "Daily Mercury Intake in Fish-Eating Populations in the Brazilian Amazon." *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 18(1): 76–87. <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.jes.7500599>.
- PENGLASE, S., K. HAMRE, and S. ELLINGSEN. 2014. "Selenium Prevents Downregulation of Antioxidant Selenoprotein Genes by Methylmercury." *Free Radical Biology and Medicine* 75: 95–104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.019>.
- PFEIFFER, W. C., and L. D. LACERDA. 1988. "Mercury Inputs into the Amazon Region, Brazil." *Environmental Technology Letters* 9(4): 325–30.
- PHILLIPS, D. J. H. 1993. "Bioaccumulation." In *Handbook of Ecotoxicology*, ed. P. CALOW. , 378–96.
- PICHET, P., K. MORRISON, I. RHEAULT, and A. TREMBLAY. 1999. "Analysis of Total Mercury and Methylmercury in Environmental Samples." In *Mercury in the Biogeochemical Cycle: Natural Environments and Hydroelectric Reservoirs of Northern Québec (Canada)*, eds. Marc Lucotte et al. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 41–52. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60160-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60160-6_3).
- PORCELLA, D. 1994. "Mercury in the environment: Biogeochemistry." In: Watras, C.J., Huckabee, J.W. (Eds.), *Mercury Pollution: Integration and Synthesis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 3–19.
- PORTO, J. I. R., C. S. O. ARAUJO, and E. FELDBERG. 2005. "Mutagenic Effects of Mercury Pollution as Revealed by Micronucleus Test on Three Amazonian Fish Species." *Environmental Research* 97(3): 287–92.
- RABITTO, I. S. et al. 2005. "Effects of Dietary Pb(II) and Tributyltin on Neotropical Fish, *Hoplias Malabaricus*: Histopathological and Biochemical Findings." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60(2): 147–56.
- RABITTO, I. S. et al. 2011. "Mercury and DDT Exposure Risk to Fish-Eating Human Populations in Amazon." *Environment International* 37(1): 56–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.07.001>.



- RAVICHANDRAN, M. 2004. "Interactions between Mercury and Dissolved Organic Matter - A Review." *Chemosphere* 55(3): 319–31.
- RICE, D. C. 2004. The US EPA reference dose for methylmercury: sources of uncertainty. *Environ Res.* 95:406–413.doi:10.1016/j.envres.2003. 08.013
- ROACH, K. a et al. 2013. "Gold Mining and Mercury Bioaccumulation in a Floodplain Lake and Main Channel of the Tambopata River, Perú." *Journal of Environmental Protection* 4(January): 51–60.  
<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?paperID=27180>.
- ROCHA, C. A. M. et al. 2011. "Studies of Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Red Blood Cells of Colossoma Macropomum Exposed to Methylmercury." *Genetics and Molecular Biology* 34(4): 694–97.
- ROCHA, C. A. M., V. H. C. ALMEIDA, R. H. S. PINHEIRO, and L. A. CUNHA. 2010. "Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Acará Aequidens Tetramerus ( Perciforms: Cichlidae ) Exposed to Copper Sulfate." 6: 57–66.
- RODRIGUEZ-CEA, A., F. AYLLON, and E. GARCIA-VAZQUEZ. 2003. "Micronucleus Test in Freshwater Fish Species: An Evaluation of Its Sensitivity for Application in Field Surveys." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56(3): 442–48.
- ROESIADI, G., and W. E. ROBINSON. 1993. "Metal Regulation in Aquatic Animals: Mechanisms of Uptake, Accumulation and Release." In *Molecular Mechanisms in Aquatic Toxicology*, ed. G. MALINS, D.C.; OSTRANDER. New York: Lewis Publishers, 387–420.
- ROMÈO, M. et al. 1997. "Metallothionein Determination in the Liver of the Sea Bass Dicentrarchus Labrax Treated with Copper and B ( a ) P." *Marine Environmental Research* 44(3): 275–84.
- ROULET, M. et al. 1999. "Effects of Recent Human Colonization on the Presence of Mercury in Amazonian Ecosystems." *Water, Air, and Soil Pollution* 112(3–4): 297–313.
- ROULET, M., and M. LUCOTTE. 1995. "Geochemistry of Mercury in Pristine and Flooded Ferralitic Soils of a Tropical Rain Forest in French Guiana, South America." *Water, Air, and Soil Pollution* 80(1–4): 1079–88.
- ROY, S., and S. BHATTACHARYA. 2005. "Arsenic-Induced Histopathology and Synthesis of Stress Proteins in Liver and Kidney of Channa Punctatus." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65(2): 218–29.

- SAMPAIO DA SILVA, D et al. 2006. "Mercury in Fish of the Tapajós River in the Brazilian Amazon." *Journal on Integrated Management of Occupational Health and Environment* 1: 1–33.
- SAMPAIO DA SILVA, D. et al. 2013. "Inverse Mercury and Selenium Concentration Patterns between Herbivorous and Piscivorous Fish in the Tapajos River, Brazilian Amazon." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97: 17–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.025>.
- SAMPAIO DA SILVA, D. et al. 2005. "Trophic Structure and Bioaccumulation of Mercury in Fish of Three Natural Lakes of the Brazilian Amazon." *Water, Air, and Soil Pollution* 165(1–4): 77–94.
- SANDERS, B. 1990. "Stress Proteins Potential as Multi Tiered Biomarkers." In *Biomarkers of Environmental Contamination*, eds. J. F. MCCARTHY and L. R. SHUGART. Boca Raton: Lewis Publishers, 165–91.
- SANTOS, G., E. FERREIRA, and J. ZUANON. 2006. Peixes Comerciais de Manaus. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea.
- SCHETAGNE, R., J. FOURNIER, and J. DOYON. 2000. "Export of Mercury Downstream from Reservoirs." *The Science of the Total Environment* 260: 135–45.
- SCHLENK, D. 1999. "Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments." *Marine Pollution Bulletin* 39: 48–53.
- . 2008. "Biotransformation in Fishes." *The Toxicology of Fishes*: 153–234. <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203647295.ch4>.
- SCHMID, W. 1975. "The Micronucleus Test." *Mutation Research* 31(1): 9–15.
- SILVA, G. et al. 2012. "Potential Risks of Natural Mercury Levels to Wild Predator Fish in an Amazon Reservoir." *Environmental Monitoring and Assessment* 184(8): 4815–27.
- SERIANI, R. et al. 2015. "Hematological Changes and Cytogenotoxicity in the Tilapia *Oreochromis Niloticus* Caused by Sub-Chronic Exposures to Mercury and Selenium." *Fish Physiology and Biochemistry* 41(1): 311–22.
- SERIANI, R., M. J. T. RANZANI-PAIVA, Â. T. SILVA-SOUZA, and S. R. NAPOLEÃO. 2011. "Hematological Characteristics, Frequency of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Peripheral of Fish from São Francisco River Basin, Minas Gerais State, Brazil." *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 33(1): 107–12.
- SHUGART, L.R. 1990. "Biological Monitoring: Testing for Genotoxicity." In *Biomarkers of Environmental Contamination*., Boca Raton: Lewis Publishers, 205–

- SILVA-FORSBERG, M. C., B. R. FORSBERG, and V. K. ZEIDEMANN. 1999. "Mercury Contamination in Humans Linked to River Chemistry in the Amazon Basin." *Ambio* 28(6): 519–21.
- SILVA SOUZA, T., and C. S. FONTANETTI. 2006. "Micronucleus Test and Observation of Nuclear Alterations in Erythrocytes of Nile Tilapia Exposed to Waters Affected by Refinery Effluent." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 605(1–2): 87–93.
- SINAIE, M. et al. 2010. "Metallothionein Biosynthesis as a Detoxification Mechanism in Mercury Exposure in Fish, Spotted Scat (*Scatophagus Argus*)." *Fish Physiology and Biochemistry* 36(4): 1235–42.
- SISCAR, R., A. TORREBLANCA, A. PALANQUES, and M. SOLÉ. 2013. "Metal Concentrations and Detoxification Mechanisms in Solea Solea and Solea Senegalensis from NW Mediterranean Fishing Grounds." *Marine Pollution Bulletin* 77(1–2): 90–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.026>.
- SOUZA-ARAUJO, J., T. GIARRIZZO, M. O. LIMA, and M. B. G. SOUZA. 2016. "Mercury and Methyl Mercury in Fishes from Bacajá River (Brazilian Amazon): Evidence for Bioaccumulation and Biomagnification." *Journal of Fish Biology* 89(1): 249–63.
- STALLARD, R. F., and J. M. EDMOND. 1983. "Geochemistry of the Amazon: 2. The Influence of Geology and Weathering Environment on the Dissolved Load." *Journal of Geophysical Research*. 88(14): 9671–88.
- STENTIFORD, G. D. et al. 2003. "Histopathological Biomarkers in Estuarine Fish Species for the Assessment of Biological Effects of Contaminants." *Marine Environmental Research* 55(2): 137–59.
- TEH, S. J., S. M. ADAMS, and D. E. HINTON. 1997. "Histopathologic Biomarkers in Feral Freshwater Fish Populations Exposed to Different Types of Contaminant Stress." *Aquatic Toxicology* 37(1): 51–70.
- THOPHON, S. et al. 2003. "Histopathological Alterations of White Seabass, Lates Calcarifer, in Acute and Subchronic Cadmium Exposure." *Environmental Pollution* 121(3): 307–20.
- TORRES DE LEMOS, C., P. M. RÖDEL, N. R. TERRA, and B. ERDTMANN. 2001. "Evaluation of Basal Micronucleus Frequency and Hexavalent Chromium Effects in Fish Erythrocytes." *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6): 1320–24.

- <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620200621%5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1002/etc.5620200621>.
- TRIEBSKORN, R. et al. 2008. "Monitoring Pollution in River Mureş, Romania, Part II: Metal Accumulation and Histopathology in Fish." *Environmental Monitoring and Assessment* 141(1–3): 177–88.
- TUNDISI, J. G. et al. 1984. "Mixing Patterns in Amazon Lakes." *Hydrobiologia* 108(1): 3–15.
- UDROIU, I. 2006. "The Micronucleus Test in Piscine Erythrocytes." 79: 201–4.
- UNEP DTIE Chemicals Branch, and Zoonoses and Foodborne Diseases WHO Department of Food Safety. 2008. "Guidance for Identifying Populations At Risk From Mercury Exposure." *Exposure* (August): 176. [https://wedocs.unep.org/.../IdentifyingPopnatRiskExposuretoMercury\\_2008Web.pdf?..](https://wedocs.unep.org/.../IdentifyingPopnatRiskExposuretoMercury_2008Web.pdf?..)
- US-EPA. 1996. "Method 1669 Sampling Ambient Water for Trace Metals at EPA Water Quality Criteria Levels July 1996 U . S . Environmental Protection Agency Office of Water Engineering and Analysis Division ( 4303 ) Acknowledgments." *Environmental Protection* (July): 37.
- . 2001a. "Method 1630: Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, and CVAFS." *United States Environmental Protection Agency* (January): 1–49.
- USEPA. 2001b. "Water Quality Criterion for the Protection of Human Health : Methylmercury Final." *US Environmental Protection Agency, Washington, DC* EPA-823-R-(January): 303.
- . 2010. "Guidance for Implementing the January 2001 Methylmercury Water Quality Criterion. EPA 823-R-10-001. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC." : 1–207. <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/pollutants/methylmercury/upload/mercury2010.pdf>.
- VAL, A. L. et al. 2010. "Amazônia: Recursos Hídricos E Sustentabilidade." *Águas do Brasil: Análises Estratégias*: 95–109. <http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-812.pdf?>
- VALDEZ DOMINGOS, F. X., C. A. OLIVEIRA RIBEIRO, É. PELLETIER, and C. ROULEAU. 2011. "Tissue Distribution and Depuration Kinetics of Waterborne 14C-Labeled Light PAHs in Mummichog (Fundulus Heteroclitus)." *Environmental Science and Technology* 45(7): 2684–90.

- VALDEZ DOMINGOS, F.X. et al. 2009. "Anthropic Impact Evaluation of Two Brazilian Estuaries Trough Biomarkers in Fish." *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 4(1-3): 21-30.  
[http://ecotoxbrasil.org.br/index.php?option=com\\_rokdownloads&view=file&task=download&id=441:anthropic-impact-evaluation-of-two-brazilian-estuaries-trough-biomarkers-in-fish-pp&Itemid=53](http://ecotoxbrasil.org.br/index.php?option=com_rokdownloads&view=file&task=download&id=441:anthropic-impact-evaluation-of-two-brazilian-estuaries-trough-biomarkers-in-fish-pp&Itemid=53).
- VAN DER OOST, R., J. BEYER, and N. P. E. VERMEULEN. 2003. "Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2): 57-149.
- VAN DYK, J. C., G. M. PIETERSE, and J. H. J. VAN VUREN. 2007. "Histological Changes in the Liver of *Oreochromis Mossambicus* (Cichlidae) after Exposure to Cadmium and Zinc." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66(3): 432-40.
- VAN DYK, J. C., M. J. MARCHAND, N. J. SMIT, and G. M. PIETERSE. 2009. "A Histology-Based Fish Health Assessment of Four Commercially and Ecologically Important Species from the Okavango Delta Panhandle, Botswana." *African Journal of Aquatic Science* 34(3): 273-82.  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2989/AJAS.2009.34.3.9.985>.
- VASCONCELOS, M. R. R. 2014. "O Papel dos Podzóis Hidromórficos na Exportação e Bioacumulação de Metilmercúrio em Igarapés de Terra Firme na Amazônia Central." Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia –.
- VELMURUGAN, B., M. SELVANAYAGAM, E. I. CENGIZ, and E. UNLU. 2009. "Histopathological Changes in the Gill and Liver Tissues of Freshwater Fish, *Cirrhinus Mrigala* Exposed to Dichlorvos." *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52(5): 1291-96.
- VIARENGO, A. et al. 2001. "Sensitivity and Specificity of Metallothionein as a Biomarker for Aquatic Environment Biomonitoring." In *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach*, eds. Philippe Garrigues, Hartmut Barth, Colin H. Walker, and Jean François Narbonne. Elsevier Science, 29-43.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444829139500043>.
- VIARENGO, A., E. PONZANO, F. DONDERO, and R. FABBRI. 1997. "A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: An Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs." *Marine Environmental Research* 44(1): 69-84.
- VIEIRA, H. C., F. MORGADO, A. M.V.M. SOARES, and S. N. ABREU. 2015. "Fish

- Consumption Recommendations to Conform to Current Advice in Regard to Mercury Intake.” *Environmental Science and Pollution Research* 22(13): 9595–9602.
- WALKER, C. H., and D. Savva. 2001. “Biochemical Responses Of Crabs (*Carcinus* Spp) To Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) As The Basis For New Biomarker Assays.” In *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach*, eds. Ph. Garrigues, H. Barth, C.H. Walker, and J.F. Narbonne. Elsevier Science B.V, 409–29.
- WALKER, C. J., J. GELSLEICHTER, D. H. ADAMS, and C. A. MANIRE. 2014. “Evaluation of the Use of Metallothionein as a Biomarker for Detecting Physiological Responses to Mercury Exposure in the Bonnethead, *Sphyrna tiburo*.” *Fish Physiology and Biochemistry* 40(5): 1361–71.
- WANGSONGSAK, A. et al. 2007. “Alterations of Organ Histopathology and Metallothionein mRNA Expression in Silver Barb, *Puntius gonionotus* during Subchronic Cadmium Exposure.” *Journal of Environmental Sciences* 19(11): 1341–48.
- WIENER, J. G., D. P. KRABBENHOFT, G. H. HEINZ and A. M. SCHEUHAMMER. 2002. "Ecotoxicology Of Mercury." In *Handbook of Ecotoxicology*, Second Edition. Edited by David J. Hoffman, Barnett A. Rattner, G. Allen Burton Jr and John Cairns Jr. CRC Press , 409-463.
- YARSAN, E., and M. YIPEL. 2013. “The Important Terms of Marine Pollution “
- ZHANG, L., and W. X. WANG. 2005. “Effects of Zn Pre-Exposure on Cd and Zn Bioaccumulation and Metallothionein Levels in Two Species of Marine Fish.” *Aquatic Toxicology* 73(4): 353–69.
- ZIMMERLI, S. et al. 2007. “Assessment of Fish Health Status in Four Swiss Rivers Showing a Decline of Brown Trout Catches.” *Aquatic Sciences* 69(1): 11–25.