



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas



Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca

ANA CAROLINA BORGES DE ANDRADE

**BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS E CONCENTRAÇÃO DE
HG EM PIRANHAS (*Serrasalmus rhombeus*) E SEDIMENTO DE
FUNDO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DE UMA
REGIÃO DE MINERAÇÃO DA AMAZÔNIA, BRASIL**

Belém, PA

2013

ANA CAROLINA BORGES DE ANDRADE

**BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS E CONCENTRAÇÃO DE
HG EM PIRANHAS (*Serrasalmus rhombeus*) E SEDIMENTO DE
FUNDO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DE UMA
REGIÃO DE MINERAÇÃO DA AMAZÔNIA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientador a: Dr^a Rossineide Martins da Rocha
- ICB/UFPA

Co-orientador: José Francisco Berrêdo da Silva
Reis - CCTE/MPEG

Belém, PA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da
Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados
fornecidos pelo(a) autor(a)

- A553h Andrade, Ana Carolina Borges de
Histopatologia do fígado de piranhas (*Serrasalmus spp.*) como biomarcador da
qualidade da água de uma área de mineração / Ana Carolina Borges de Andrade.
— 2013
42 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e
Pesca (PPGEAP), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará,
Belém, 2013.
Orientação: Profa. Dra. Rossineide Martins
da Rocha Coorientação: Profa. Dra.
Francisco Berrêdo .
1. Mercúrio. 2. Toxicologia. 3. Peixe. 4. Sedimento. 5. Carajás. I. Rocha,
Rossineide Martins da, *orient.*
II. Título
-

CDD 571.954663

ANA CAROLINA BORGES DE ANDRADE

**Biomarcadores histopatológicos e concentração de Hg em piranhas
(*Serrasalmus* Spp.) e sedimento de fundo na avaliação da qualidade ambiental
de uma região de mineração da Amazônia, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca, cuja banca examinadora foi constituída pelos professores listados abaixo tendo obtido o conceito _____

Orientadora:

Profa. Dra. Rossineide Martins Rocha – Orientadora
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Co - Orientador:

Dr. José Francisco Berrêdo Reis da Silva
Centro de Ciências da Terra e Ecologia, Museu Paraense Emílio Goeldi

Banca examinadora:

Profa. Dra. Jussara Moretto Martinelli Lemos
Instituto de Ciências Biológicas/UFGA

Profa. Dra. Lílian Lund Amado
Instituto de Ciências Biológicas/UFGA

Profa. Dra. Silvana Allodi
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ

Dedico a minha mãe, que sempre me incentiva e apoia em minhas decisões; minha querida irmã, Anne Borges, pela compreensão e paciência diária; e aos professores Rossineide, Auxiliadora e Berrêdo pela paciência e orientação.

“O importante é não parar de questionar.”
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço sempre a Deus, pela dádiva da vida.

À minha mãe pelo exemplo de vida, dedicação, incentivo, paciência e confiança. Por

me apoiar nos momentos mais difíceis, pelos conselhos, por acreditar e torcer por um caminho vitorioso e cheio de alegrias na minha vida.

À minha irmã, Anne, pela amizade, paciência e carinho. Também agradeço o silêncio nos momentos impossíveis de compreender.

Ao meu pai pela paciência, incentivo e na convicção de crescimento contínuo.

Agradeço imensamente à professora Rossineide pela orientação e incentivo de crescimento científico contínuo, e, sobretudo, pela paciência e confiança.

Agradeço muitíssimo à professora Auxiliadora pelos momentos dedicados a mim, pela enorme contribuição com as técnicas de ultraestrutura, pela paciência em explicar detalhes imprescindíveis tanto na prática como na teoria.

Agradeço ao professor Berrêdo por sempre estar de portas abertas para mim e me receber como uma filha, pela atenção e preocupação, pelas palavras de incentivo, pelo apoio tanto com as coletas de campo como com as análises de metais. Muito obrigada pela valiosa co-orientação!!!

Agradeço eternamente à Caroline Montes pela magnífica amizade, pela aprendizagem, muitas vezes contribuindo como uma verdadeira orientadora, pela companhia e apoio de campo, pelas instruções no laboratório de técnicas histológicas, pela compreensão e paciência nos momentos mais difíceis, pela alegria e descontração nos momentos mais tensos... Muito obrigada Loira!!!

À minha mais nova e querida família, os amigos do laboratório Caroline, Liziane, Fabricia, Yanne, Ivana, Juliana M., Juliana P., Fernando e Rodrigo, pessoas especiais, que em diferentes e diversos momentos me doaram seu tempo e atenção!

Ao professor Tomasso por permitir minha participação e colaboração no projeto Carajás, pelo apoio e incentivo de campo e pela contribuição interinstitucional.

Agradeço às meninas do mercúrio (IEC), Érika, Diomar e Jamily, pela imensa paciência e inquestionável prestatividade.

À equipe de segurança florestal de Carajás, especialmente Seu Tatu e Haroldo, pelo mais que super apoio de campo e pelos cuidados dedicados à nossa segurança e sucesso da missão.

Ao Douglas Gasparetto pelo apoio técnico e orientações no uso de geoprocessamento, contribuindo para a aquisição do mapa de localização da área de estudo, além da paciência e oportunidade de aprendizagem.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa.

À pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca (UFPA).

Aos professores, que contribuíram muito para meu conhecimento e crescimento profissional.

Agradeço todos que contribuíram de forma indireta para a conclusão da dissertação.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	15
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 1 - Biomarcadores histológicos e ultraestruturais em piranha (<i>Serrasalmus rhombeus</i>) de uma área de mineração	19
Resumo	20
1. Introdução	21
2. Materiais e métodos	22
3. Resultados	26
4. Discussão	34
5. Conclusão	37
Referências	37

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios de sua existência, o homem, como qualquer outra espécie habitante do planeta, interage com o ambiente à sua volta, modificando-o e transformando-o de acordo com suas necessidades. Os resultados dessas ações são facilmente perceptíveis ao longo de toda a biosfera (CUNHA, 2005).

Os ecossistemas aquáticos são receptores finais de substâncias produzidas e liberadas no ambiente, sejam estas de origem natural ou antrópica, susceptíveis, portanto, a deposições atmosféricas, intemperismo de rochas, escoamento superficial, efluentes domésticos, agrícolas e industriais (BRAGA et al., 2003).

A vulnerabilidade do ambiente aquático a substâncias químicas depende das propriedades físicas e químicas dos contaminantes e dos produtos resultantes de sua transformação, da concentração dos contaminantes no ecossistema, da duração e do tipo de descarga dos contaminantes (descarga intermitente ou contínua), das propriedades do ecossistema, como a capacidade tamponante das águas e a concentração de matéria orgânica dissolvida nelas (SPERLING, 2005).

O descarte contínuo no ambiente de uma substância persistente pode levar a sua acumulação em níveis ambientais suficientes para resultar em toxicidade (LEBLANC, 2004). Substâncias que são tóxicas apresentam maior perigo quando são persistentes e bioacumulativas. Dentre estas substâncias destacam-se os metais (DeFOREST et al., 2007). Em geral, metais estão presentes em pequenas quantidades no ambiente aquático por ação de fenômenos naturais, mas podem ser despejados em quantidades significativas por atividades industriais, agrícolas e de mineração (BRAGA et al., 2003).

Alguns metais em particular são capazes de apresentar formas químicas estáveis em solução, que podem se acumular na coluna d'água atingindo concentrações relativamente elevadas e tóxicas. Por outro lado, os íons livres do metal podem ligar-se com matéria orgânica e reduzir a quantidade biodisponível no meio aquoso (MUNIZ & OLIVEIRA-FILHO, 2006; LACERDA & MALM, 2008). As propriedades físicas e químicas dos ecossistemas aquáticos podem afetar significativamente a atividade biológica e a disponibilidade de agentes químicos, podendo favorecer sua precipitação e acumulação no sedimento de fundo (COSTA et al., 2008),

Os sedimentos de fundo são considerados fonte e/ou sumidouro de poluentes na maioria dos sistemas aquáticos (BECKVAR et al., 1996), podem, portanto, tanto minimizar um problema existente quanto ser sua causa. Metais ligados ao sedimento podem dissolver-se na coluna d'água, possivelmente entrar na cadeia alimentar e provocar um impacto ambiental significativo (BECKVAR et al., 1996). Deve-se considerar, ainda, que constituintes inorgânicos inertes ou ambientalmente inofensivos podem degradar-se ou reagir com outros, de modo a formar elementos solúveis e potencialmente tóxicos, por exemplo, a conversão do mercúrio elementar para o metilmercúrio (HOROWITZ, 1985).

Mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e arsênio (As) são considerados metais não-essenciais. Diferentemente do manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu) e zinco (Zn), que são elementos essenciais importantes para as funções metabólicas no organismo. No entanto, não há dúvida de que todos os metais são potencialmente perigosos para os organismos vivos, não necessariamente em elevados níveis de exposição (FÖRSTNER & WITTMAN, 1983).

O mercúrio se destaca entre os vários metais pesados associados a contaminação do ambiente aquático devido a sua alta toxicidade e complexidade de seu ciclo biogeoquímico. Há três formas químicas principais que podem ser encontradas: 1- mercúrio elementar (Hg^0); 2- sais inorgânicos mercurioso (Hg_2^{2+}) e mercúrico (Hg^{2+}) e 3 - compostos orgânicos metilmercúrio (CH_3Hg) e dimetilmercúrio (CH_3HgCH_3) (COPE et al., 2004). Ele está naturalmente presente no ambiente através da desgaseificação da crosta terrestre, por meio dos gases vulcânicos e, provavelmente, pela evaporação dos oceanos (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

Na atmosfera aproximadamente 95% do mercúrio está na forma elementar, sofre oxidação, principalmente na interface sólido-líquido em neblina e gotículas de nuvens, e é lentamente transformado em Hg^{2+} , retornando ao ambiente aquático e terrestre carregado pela água da chuva ou adsorvido a pequenas partículas (MOREL et al., 1998).

No solo há uma elevada capacidade de retenção e armazenamento de mercúrio, devido ao forte acoplamento deste com o carbono presente. Porém, o mercúrio do ecossistema terrestre pode ser volatilizado retornando à atmosfera e pode ser ainda rapidamente ligado com material orgânico, especialmente ácidos húmicos, que são lixiviados por águas pluviais e lançados diretamente para os

corpos d'água (BISINOTI E JARDIM, 2004). Estes agentes orgânicos complexantes solúveis em água (humatos e fulvatos) podem quelar as espécies de mercúrio solúveis e insolúveis na água; os últimos precipitam-se diretamente da solução para o sedimento (STEIN et al., 1996).

Nos sedimentos a distribuição do mercúrio está relacionada com o conteúdo de carbono orgânico, argila, ferro, fósforo, potencial redox e enxofre, dentre outros (PARK e BHARTA, 1998). Nas camadas superiores do sedimento, que são biologicamente ativas, o Hg^{2+} é, em parte, metilado por bactérias bentônicas a metilmercúrio (CH_3Hg^+), onde irá se integrar a cadeia trófica, e/ou se as condições de pH forem apropriadas, dará origem ao dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$). Estima-se que até 2% da concentração de Hg total de sedimentos de rios amazônicos ocorre na forma de metilmercúrio (LACERDA e PFEIFFER, 1992). O dimetilmercúrio é insolúvel e muito volátil, o que favorece sua entrada à atmosfera, vindo a ser recolhido pelas águas das chuvas, e, se estas forem ácidas, o $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ transformar-se-á no CH_3Hg^+ , retornando ao meio aquático, e assim completando o ciclo (MOREL et al., 1998).

O metilmercúrio é a forma mais tóxica do mercúrio, principalmente devido à capacidade de ser bioacumulado ao longo de níveis tróficos na cadeia alimentar (WHO, 1990). Conseqüentemente, concentrações de mercúrio nas espécies carnívoras são mais elevadas do que em espécies não-carnívoras (BELTRAN-PEDREROS et al., 2011; CASTILHOS E BIDONE, 2000; DURRIEU et al., 2005).

É pela dieta a principal forma de exposição do homem ao mercúrio. A ingestão de peixes é a maior fonte de mercúrio no organismo humano, nos quais sua concentração total encontra-se em mais de 90% na forma de metilmercúrio (WHO, 1990). Vale ressaltar que as formas inorgânicas do mercúrio são pouco absorvidas pelo trato digestivo dos peixes (~ 10%) e sua meia-vida é baixa, ele não se acumula ao longo da cadeia alimentar biomagnificação (LACERDA e MALM, 2008). Por outro lado, a persistência do metilHg nos peixes é relativamente alta, devido à lenta metabolização e o tempo de meia vida ocorre em função da espécie, variando geralmente de um a três anos (NASCIMENTO e CHASIN, 2001). Espécies de alto nível trófico tendem a acumular as maiores concentrações de mercúrio (BECKVAR et al., 1996), bem como as espécies de maior tamanho (DÓREA et al., 2003).

Com base em tal fato a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece o limite de concentração de 0,5 mg/kg em peixes para o consumo. Da mesma forma a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 1998) estabelece o limite de tolerância máximo permitido para o consumo humano de 0,5 mg/kg em peixes não predadores e de 1,0 mg/kg em peixes predadores.

Os peixes vêm sendo frequentemente utilizados em programas de monitoramento ambiental, testes de toxicidade em laboratório e como bioindicadores da qualidade da água, pois interagem com as propriedades físicas, químicas e biológicas do ecossistema (FLORES & MALABARBA, 2007). Particularmente, brânquias, fígado e rim têm sido descritos como órgãos alvos afetados por poluentes aquáticos (ABDEL-MONEIM et al., 2012; BERNET et al., 1999; LIU et al., 2011).

O fígado é o mais recomendado como indicador de poluição do que qualquer outro órgão. Ele é um importante local de bioacumulação de poluentes como o mercúrio, e abriga uma série de enzimas de biotransformação (VAN DER OOST et al., 2003), é onde ocorre a desintoxicação e excreção de substâncias tóxicas do organismo (HINTON & LAUREN, 1990). Assim, as alterações histopatológicas no fígado tornam-se potenciais biomarcadores para avaliação de riscos da exposição crônica do mercúrio em peixes.

Os biomarcadores compreendem respostas biológicas adaptativas aos estressores sendo evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais, que possam ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos orgânicos, em organismos ou populações, possibilitando evidenciar exposição ou efeito de um ou mais poluentes químicos ou radiações (DeCAPRIO, 1997).

Como um indicador de exposição a contaminantes, a histologia é uma ferramenta sensível para avaliar o grau de poluição de um ambiente, particularmente para efeitos sub-letais e crônicos (BERNET et al., 1999). Além disso, representa uma resposta à médio prazo, fornecendo um método rápido para detectar os efeitos de substâncias irritantes, especialmente as crônicas, em vários tecidos e órgãos (JOHNSON et al., 1993). Bruslé & Anadon (1996) afirmam que a histologia de fígados de peixes podem servir como modelos para estudar as interações entre fatores ambientais e as estruturas hepáticas e suas funções.

Nesse contexto, destacam-se as piranhas (*Serrasalmus* spp.), espécies predadoras da Amazônia, e, sobretudo, endêmicas da região neotropical e amplamente distribuídas nos principais sistemas fluviais da América do Sul (HUBERT et al., 2007; ORTÍ et al., 2008). São peixes teleósteos Characiforme, da família Characidae, subfamília Serrasalminae, que possuem hábitos não-migratório (residentes) e são predominantemente carnívoros, alcançando cerca de 40 cm de comprimento em sua fase adulta (ARAUJO-LIMA E GOULDING, 1997; BARTHEM,1987), contudo, sua maturação sexual se dá com cerca de 16 cm, tanto machos como fêmeas (QUEIROZ et al., 2010). Além disso, possui um papel ecológico fundamental para o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, já que como espécies predadores de grande representatividade regulam a abundância de outras espécies de peixes (GOULDING, 1980; LOWE-McCONNELL, 1987).



Fig. 1. Espécime representante do gênero *Serrasalmus*. **Fonte:** Autor.

O histórico da área de estudo justifica a relevância desta pesquisa e alerta para necessidade de manutenção de ecossistemas amazônicos sob conservação. Por isso, vale lembrar que na década de 60 incentivos fiscais do governo federal, justificados pela integração da Amazônia, deram início à entrada de capital destinado a sua ocupação, com conseqüente atração dos grandes fluxos migratórios (MONTEIRO, 2005). Ainda, com a descoberta de ouro e o desenvolvimento do

garimpo em Serra Pelada, significativas mudanças ambientais e sociais foram geradas na região, culminando em um cenário marcado pela ampliação das atividades de exploração madeireira e pelo florescimento da garimpagem (SANTOS, 2002).

Em 1980, com a tentativa de minimizar o avanço populacional, foi criado pelo governo federal o Programa Grande Carajás (PGC), que visava uma maior coordenação da política de desenvolvimento da Amazônia Oriental (SANTOS, 2002). Dentre os projetos localizados na área de abrangência do PGC estava o Projeto Ferro Carajás da antiga Companhia Vale do Rio Doce (atual Vale). A CVRD passou a ser responsável pela defesa do ecossistema; amparo às populações indígenas existentes nas proximidades da área concedida, aproveitamento de jazidas minerais; e, proteção e conservação dos recursos hídricos existentes na área (IBAMA, 2003).

Todavia, para garantir a total e definitiva preservação de áreas florestadas do sudoeste paraense, o governo brasileiro, propôs a criação de uma unidade de conservação compatível com a realidade sócio-econômica e ambiental local (IBAMA, 2003). Assim, em 1998, a Floresta Nacional de Carajás foi criada, e somada a Área de Proteção Ambiental do Igarapé Gelado, a Reserva Biológica do Tapirapé, a Floresta Nacional de Itacaiúnas, a Floresta Nacional do Tapirapé-Aquiri e a Reserva Indígena Xikrin do Cateté, formaram um bloco contíguo de áreas protegidas envolvendo a Província Mineral de Carajás, conferindo-lhe as condições ideais de salvaguarda, com base na legislação aplicável às Unidades de Conservação (IBAMA, 2003).

No entanto, o aproveitamento mineral desenvolvido pela CVRD, como toda a atividade de mineração à céu aberto, é um processo que, pela própria natureza, envolve a remoção, o processamento e disposição de grandes volumes de pedras e dejetos. As perdas de metais pesados através da água ocorrem principalmente na liberação direta do metal no processo de extração e polimento, e das emissões na etapa de beneficiamento (NASCIMENTO E CHASIN, 2001). Fato este preocupante, pois, segundo Adams et al. (1989), substâncias tóxicas lançadas no ambiente aquático são capazes de interagir com o organismo vivo causando-lhes múltiplas alterações que podem gerar graves consequências desde nível molecular até atingir

ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição dessas substâncias.

Nesse sentido, considerando que a qualidade de um rio é reflexo do ambiente que o cerca, faz-se necessário um monitoramento de contaminação aquática eficaz para avaliar o rio Itacaiúnas, principal acidente geográfico que drena o mosaico de unidades de conservação de Carajás. Por isso, esta pesquisa buscou integrar ferramentas de monitoramento à nível biológico e análises físico-químicas da água do rio Itacaiúnas para avaliar seu grau de integridade ambiental. Para tanto, espécies de piranha (*Serrasalmus* spp.) foram utilizadas para investigar efeitos histopatológicos em seu tecido hepático, aliado a análise de mercúrio (Hg) nos seus tecidos muscular e hepático, e no sedimento de fundo do rio.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Utilizar histopatologias hepáticas e concentrações de mercúrio (Hg) em tecidos hepático e muscular de espécies de piranha (*Serrasalmus* spp.) e sedimento de fundo do rio Itacaiúnas para avaliar sua qualidade ambiental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar alterações histológicas no tecido hepático de *Serrassalmus* spp.
- Identificar alterações ultraestruturais no tecido hepático de *Serrassalmus* spp.
- Avaliar semi-quantitativamente alterações histológicas do tecido hepático de *Serrassalmus* spp.
- Determinar concentrações de mercúrio (Hg) nos tecidos muscular e hepático de *Serrassalmus* spp.
- Determinar concentrações de mercúrio (Hg) no sedimento de fundo do rio Itacaiúnas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A. M.; AL-KAHTANI, M. A.; ELMENSHAWY, O. M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**, 88, p. 1028–1035, 2012.
- ADAMS, S.M. et al. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environmental Research**, 28, p. 459-464, 1989.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **So fruitful a fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's Tambaqui**. New York: Columbia University Press, 192 p, 1997.
- AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. da M. **Metais: Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Editora Atheneu, cap.11. 299-352, 2003.
- BARTHEM, R. B. Uso de Redes de Espera no Estudo de Ritmos Circadianos de Algumas Espécies de Peixes nos Lagos de Várzea do Rio Solimões. **Revista Brasileira de Zoologia**, 3(7), vol. 31, p. 409-422, 1987.
- BECKVAR, N. et al. Contaminants in Aquatic Habitats at Hazardous Waste Sites: Mercury. NOAA Technica Memorandum NOS ORCA 100. Seattle: Hazardous Materials Response and Assessment Division, **National Oceanic and Atmospheric Administration**. 74 pp, 1996.
- BELTRAN-PEDREROS, S. et al. Mercury bioaccumulation in fish of commercial importance from different trophic categories in an Amazon floodplain lake. **Neotropical Ichthyology**, 9(4), p. 901-908, 2011.
- BERNET, D. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, 22, p. 25-34, 1999.
- BISINOTI, M. C. e JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química. Nova**, vol. 27, no. 4, p. 593-600, 2004.
- BRAGA, B. et al. **Introdução à Engenharia Ambiental: O desafio do desenvolvimento sustentável**. 2ª ed., São Paulo: Prentice Hall, 2003.
- BRUSLÈ, J.; ANADON, G. G. The structure and Function of Fish Liver. In: MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M. (Ed). **Fish Morphology – Horizon of new research**. Lebanon: Science Publishers, p. 77-93, 1996.
- COSTA, C. R. C. et al.. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação**. *Química Nova*, vol. 31, no. 7, 1820-1830, 2008.
- CASTILHOS, Z. C. & BIDONE, E. D. Hg Biomagnification in the Ichthyofauna of the Tapajós River Region, Amazonia, Brazil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** New York: Springer-Verlag, 64, p.693-700, 2000.
- CUNHA, S. B. da & GUEERA, A. J. T (Org.). **Avaliação e perícia ambiental**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2005.

DeCAPRIO, A.P. Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. **Environmental Science Technology**, 31, p. 1837-1848, 1997.

DeFOREST, K. D. et al. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. **Aquatic Toxicology**, 84, p. 236–246, 2007. D

DURRIEU, G., BRACHET-MAURY, R., & BOUDOU, A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *H. aimara* in French Guiana (Amazon Basin). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60, 315–323, 2005.

FLORES-LOPES, F. I.; MALABARBA, L. R. Revisão de alguns aspectos da assembléia de peixes utilizados em programas de monitoramento ambiental. **Vittale**, v. 19, n. 1, p. 45-58, 2007.

FÖRSTNER, U. & WITTMAN, G.T.W. **Metal pollution in the aquatic environment**. 2nd ed, Belin, New York: Springer-Verlag, 1983.

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

HINTON, D.E., & LAUREN, D.J. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, 8, p. 51-66, 1990.

HOROWITZ, Arthur J. **A primer on trace metal - Sediment chemistry**: U. S. Geological Survey Water Supply Paper, 2277, 1985.

HUBERT, N. et al. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, 16, p. 2115–2136, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Plano de Manejo para Uso Múltiplo da Floresta Nacional de Carajás**. Brasília, DF, 2003.

JOHNSON L.L. et al. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. **Environmental Science and Technology**, 27, p. 2759-2771, 1993.

LACERDA, L. D. & MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, 22 (63), 2008.

LACERDA, L. D.; PFEIFFER, W. C. Mercury from gold mining in the Amazon environmental – an overview. **Química Nova**, 15 (2), 1992.

LEBLANC, G. A. Basics of Environmental Toxicology. 2004. In: Hodgson, E. (Ed). **A Textbook of Modern Toxicology**. 3rd ed., John Wiley & Sons: New Jersey, cap. 26. p. 463-477, 2004.

LOWE-McCONNELL, R. H. Ecological studies in tropical fish communities. **Cambridge Tropical Biology Series**, 1987.

MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. dos R. Avaliação da degradação ambiental na Bacia do Rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. 2003. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: RiMA, 2003.

MONTEIRO, M. A. Meio século de mineração industrial na Amazônia e suas implicações para o desenvolvimento regional. **Estudos Avançados** 19 (53), 2005.

MOREL, F. M. M; KRAEPIEL, A. M.; AMYOT, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 29, 543–66, 1998. .

MUNIZ, D.H.F.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente**. Universitas: Ciências da Saúde, v. 4, n. 1 / 2, p. 83-100, 2006.

NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. A. M.; Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos, Salvador: CRA., 2001.

ORTÍ, G. et al. Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, 31, p. 343-351, 2008. Suppl 1.

PAK, K.-R AND BARTHA, R. Mercury Methylation by Interspecies Hydrogen and Acetate Transfer between Sulfidogens and Methanogens. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 1987–1990, 1998.

QUEIROZ, H. L.; SOBANSKI, M. B. & MAGURRAN, A. E. Reproductive strategies of Red-bellied Piranha (*Pygocentrus nattereri* Kner, 1858) in the white waters of the Mamirauá flooded forest, central Brazilian Amazon. **Environ. Biol. Fish**, 89, p. 11–19, 2010.

SANTOS, B. A. Recursos minerais da Amazônia. **Estudos Avançados**, v. 16 (45), 2002.

SPERLING, V. M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 3ª ed., vol.1, Belo Horizonte: Departamento de Engenharia sanitária e ambiental/Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

STEIN, E. D.; COHEN, Y.; WINER, A. M. Environmental distribution and transformation of mercury compounds. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** 26, 1-43, 1996.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, 13, p. 57-149, 2003.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Methylmercury in Environmental Health Criteria 101**. Geneva, 1990, vol. 118, 144p.

CAPÍTULO 1

BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS EM PIRANHA (*SERRASALMUS RHOMBEUS*) DE UMA ÁREA DE MINERAÇÃO

Biomarcadores histológicos e ultraestruturais em piranha (*Serrasalmus rhombeus*) de uma área de mineração

Ana Carolina Borges de Andrade^a, Caroline da Silva Montes^a, Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira^b, José Francisco Berrêdo^c, Rossineide Martins da Rocha^{a*}.

^a Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

^b Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Imunohistoquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

^c Departamento de Geoquímica, Centro de Ciências da Terra e Ecologia, Museu Paraense Emílio Goeldi

*Correspondência do autor. Tel.: + 55 91 3201 7875.

Endereço de e-mail: rmrocha@ufpa.br (R. M. Rocha)

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade das águas do rio Itacaiúnas em nível biológico, através da análise de alterações histológicas e ultraestruturais do fígado de piranhas (*Serrasalmus rhombeus*), em resposta às atividades de mineração desenvolvidas na área. Considerando a capacidade do mercúrio (Hg) se acumular na coluna d'água, sedimentos e em organismos aquáticos, concentrações de Hg no sedimento de fundo do rio Itacaiúnas e nos tecidos muscular e hepático de espécies predominantemente carnívoras (piranhas) foram quantificadas e associadas com alterações estruturais hepáticas observadas. Os valores de concentrações de Hg no sedimento de fundo estavam dentro da faixa da normalidade para a Amazônia. As concentrações de mercúrio entre os tecidos muscular e hepático não apresentaram correlação significativa. As concentrações de Hg no fígado foram significativamente diferentes entre os sítios amostrais. O tecido hepático foi analisado por técnicas de microscopia óptica e eletrônica, revelando que as alterações histológicas mais persistentes foram infiltração leucocitária, congestão de vasos, vacuolização e necrose; e as alterações ultraestruturais foram depleção de glicogênio e perda de cristas mitocondriais. Os índices histopatológicos do fígado não apresentaram diferenças significativas entre os três sítios amostrais, contudo, em nível de severidade da alteração, indicaram uma tendência de comprometimento do rio Itacaiúnas na ordem crescente de S2≤S1<S3. Em suma, os biomarcadores histológicos foram eficazes para o diagnóstico da qualidade das águas do rio Itacaiúnas, indicando riscos a longo prazo para a biota aquática e, portanto, sugerido a ser utilizado em ações preventivas de controle de poluição aquática.

Palavras-chave: Peixe, fígado, mercúrio, mineração, Amazônia.

1. Introdução

Os peixes vêm sendo frequentemente utilizados em programas de monitoramento ambiental, testes de toxicidade em laboratório e como bioindicadores da qualidade da água, pois interagem com as propriedades físicas, químicas e biológicas do ecossistema (Krull and Barros, 2012). Particularmente, brânquias, fígado e rim têm sido descritos como órgãos alvos afetados por poluentes aquáticos (Bernet et al., 2004; Liu et al., 2011; Abdel-Moneim et al., 2012). O fígado é um excelente indicador de poluição, pois tem papel fundamental na bioacumulação de poluentes, como o mercúrio, e abriga uma série de enzimas de biotransformação (Van der Oost et al., 2003), nele ocorre a desintoxicação e excreção de substâncias tóxicas do organismo (Hinton and Lauren, 1990). Assim, as alterações histopatológicas no fígado tornam-se potenciais biomarcadores para avaliação de riscos da exposição crônica do mercúrio em peixes.

A elevada concentração de mercúrio (Hg) em ambientes aquáticos da Amazônia é relatada como consequência de processos geológicos naturais, garimpo de ouro, transporte e deposição atmosférica, desmatamento devido agricultura e pecuária e mineração (Lacerda and Pfeiffer 1992; Mason et al., 1994; Roulet and Lucotte, 1995; Morel et al., 1998). Contudo, o mercúrio em contato com os ecossistemas aquáticos é capaz de interagir com o organismo vivo causando-lhe múltiplas alterações que podem gerar graves consequências desde nível molecular até ecossistemas, o que varia de acordo com o grau de contaminação e o tempo de exposição (Giari et al., 2008). Portanto, neste estudo foi utilizada a espécie de piranha *Serrasalmus rhombeus* devido ao seu nível trófico e importância ecológica, pois apresentam hábito predominantemente carnívoro (Goulding, 1980; Lowe-McConnell, 1987). Muitos estudos comprovaram a suscetibilidade dessas espécies em acumular mercúrio e outros metais (Lacerda et al., 1994; Akagi, 1995; Dórea et al. 2004; Silva et al., 2012), porém poucos têm focado na investigação de efeitos crônicos e/ou sub-letais do mercúrio.

Portanto, considerando a importância mundial da atividade de mineração e seus impactos ambientais em ecossistemas aquáticos amazônicos, o objetivo deste estudo foi associar concentrações de mercúrio em tecidos muscular e hepático e sedimento de fundo com alterações histológicas e ultraestruturais

hepáticas em *Serrasalmus rhombeus* coletados no rio Itacaiúnas, no Complexo Mineral de Carajás.

2. Materiais e métodos

2.1. Área de estudo

O Complexo Mineral de Carajás localiza-se na região sudeste do Pará (**Fig. 1**). A região possui a maior reserva de minério de ferro de alto teor do mundo, contendo ainda depósitos significativos de cobre, manganês e ouro (Galarza et al., 2008). A atividade de mineração industrial (à céu aberto) é sua principal forma de exploração atualmente, contudo, a área do entorno leste já passou por intensa exploração de ouro (Serra Pelada). Por isso, em 1980 foi constituído um mosaico de unidades de conservação que envolve a área de influência das minas de Carajás, com o propósito de conter a pressão antrópica e garantir condições ideais de salvaguarda de seus ecossistemas aquáticos.

O principal rio da região é o Itacaiúnas, com 390 km de extensão e foz no rio Tocantins. Seus principais afluentes recebem drenagens de diferentes minas, sendo a bacia hidrográfica do rio Itacaiúnas considerada, portanto, uma área de influência de toda atividade de mineração.

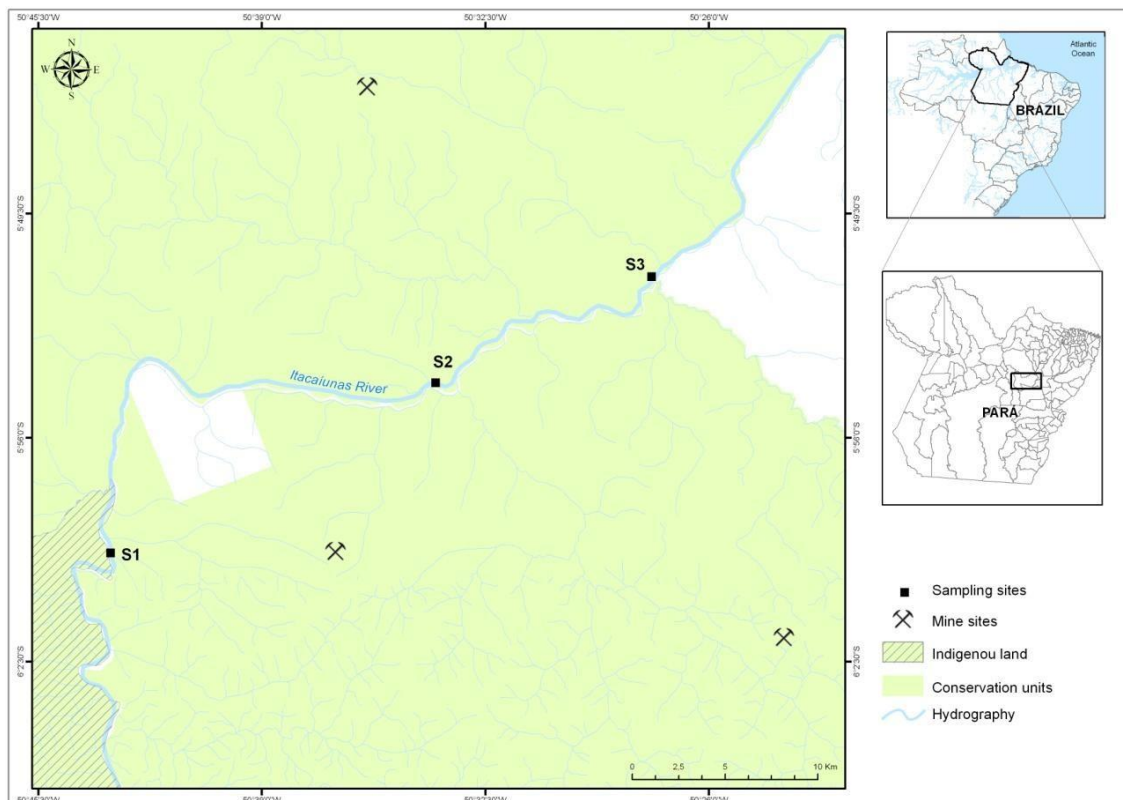


Fig.1. Mapa de localização da área de estudo no rio Itacaiúnas, com sítios amostrais: S1 (impacto mínimo); S2 (impacto médio); S3 (impacto máximo).

2.2. Sítios de amostragem

As coletas foram realizadas em três sítios de amostragem ao longo do rio Itacaiúnas: Sítio 1 - S1 ($5^{\circ}59'68''$ – $5^{\circ}59'92''$ S; $50^{\circ}43'36''$ – $50^{\circ}44'52''$ W), localizado em um dos domínios mais preservados do mosaico de unidades de conservação de Carajás; Sítio 2 - S2 ($5^{\circ}54'62''$ – $5^{\circ}54'09''$ S; $50^{\circ}33'25''$ – $50^{\circ}33'19''$ W), recebe 10 km a montante influência de uma mina de ouro; Sítio 3 - S3 ($5^{\circ}51'40''$ – $5^{\circ}50'79''$ S; $50^{\circ}27'25''$ – $50^{\circ}26'73''$ W), recebe drenagem de minas de manganês e cobre. Para cada sítio foram escolhidos aleatoriamente 2km para amostragem, sendo S1 distante aproximadamente 30km de S2, e este distante cerca de 15km do S3. Entre os sítios amostrais há barreiras geográficas de corredeiras e pedrais, situadas 13 km a montante e 10 km a jusante de S2. Esses locais foram selecionados por representarem diferentes níveis de exposição a contaminantes.

2.3. Variáveis físico-química da água

Em campo foram medidos pH, temperatura ($^{\circ}$ C), condutividade elétrica (μ S.cm $^{-1}$), sólidos totais dissolvidos (ppm) e oxigênio dissolvido (ppm) utilizando uma sonda multiparamétrica HANNA®, modelo HI9828, previamente calibrada.

2.4. Coleta de peixe

Os peixes foram capturados com técnica padronizada de pesca a linha. Um total de 74 exemplares foi coletado e imediatamente sacrificado com corte na medula espinhal anterior a nadadeira dorsal. Os peixes foram medidos (cm) e pesados (g). Após a biometria foi feita uma incisão abdominal para identificação do sexo e retirada de fragmento do fígado para processamento histológico. Para a análise de mercúrio, 32 fragmentos de cada tecido, músculo e fígado, foram retirados de peixes com média de tamanho de 25 cm (22-28 cm) e mantidos sob refrigeração.

2.5. Coleta de Sedimento de fundo

Em cada sítio de amostragem foram coletadas três réplicas de sedimento de fundo com draga tipo van-venn em aço inoxidável. As amostras de sedimento foram coletadas em zonas de deposição, locais de baixa profundidade e menor velocidade de fluxo. Após a coleta, as amostras de sedimento foram transferidas diretamente para basqueta de polietileno, acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados e acondicionadas em caixas térmicas até início de procedimentos analíticos.

2.6. Determinação de mercúrio total

As amostras de sedimento e tecidos biológicos foram submetidas à digestão ácida, com a adição de 2 ml de HNO₃ e HClO₄ (1:1), 5 ml de H₂SO₄ e 1 ml de H₂O, em chapa aquecedora a 230-250°C por 20 minutos, resfriados à temperatura ambiente, aferidas em frascos volumétricos de 50 ml e homogeneizadas. O mercúrio disponível em solução iônica foi analisado por espectrofotometria de absorção atômica por geração de vapor a frio (EAA-VF/G) com um Mercury Analyzer HG-3500, de acordo com o método proposto por Akagi et al. (1995).

2.7. Procedimentos histológicos

2.7.1. Light microscopy

A total of 74 samples were fixed in Bouin's solution for 24 hours and then embedded in paraffin using standard histological techniques. Sections of 5 µm were obtained and stained with hematoxylin and eosin (HE) for analysis. Photomicrographs were taken with a Nikon optical microscope (Nikon DS-Ri1) equipped with software NIS-Elements BR4.00.07.

Alterações histopatológicas no tecido hepático foram avaliadas qualitativamente segundo descrições de Hibiya (1982) e semi-quantitativamente a partir da adaptação do protocolo padronizado de Bernet et al. (1999), que classificaram as alterações histológicas do fígado segundo padrões de reação, sendo utilizados: 1) distúrbios circulatórios; 2) alterações regressivas; 3) alterações progressivas; e 4) respostas inflamatórias. Para todas estas alterações foi atribuído um fator de importância, baseado na sua relevância patológica, classificando-as em ordem de severidade: (1) mínima - alteração facilmente reversível; (2) moderada - reversível se o estressor for neutralizado; e (3) severa - geralmente irreversível, levando a diminuição das funções do órgão (**Tabela 1**). Com a identificação da alteração, é possível atribuir um valor de ocorrência correspondente ao seu grau e extensão no tecido de estudo, que pode se encontrar: (0) inalterado; (2) com ocorrência ocasional; (4) ocorrência moderada e (6) ocorrência severa (lesão difusa). Para obter o índice histopatológico de cada alteração, multiplica-se seu fator de importância com seu valor de ocorrência, assim, somando-se os resultados de todas as alterações é obtido o índice histopatológico do fígado para cada indivíduo.

Para verificar a saúde geral dos peixes, foi utilizada a classificação de Zimmerli et al. (2007), em que os índices histopatológicos são utilizados para classificar a severidade de lesão no tecido hepático: classe 1 (índice < 10), estrutura normal do tecido com leves alterações; classe 2 (índice 10-25), estrutura normal do tecido com moderadas alterações; classe 3 (índice 26-35), tecido hepático com alterações pronunciadas; e classe 4 (índice >35), tecido hepático com alterações severas.

Table 1

Padrões de reação (rp) do fígado associadas a alterações histológicas com seu respectivo fator de importância (*w*). Adaptado de Bernet et al., 1999.

Padrão de reação	Alteração	<i>w</i>
Distúrbio circulatório	Hemorragia, congestão, dilatação de vasos sanguíneos	1
	Alterações estruturais	1
	Inclusões lipídicas, degeneração lipídica e esteatose	1
Alterações Regressivas	Alterações nucleares	2
	Necrose	3
	Alterações estruturais	1
	Alterações no citoplasma	1
	Alterações nucleares	2
Alterações Progressivas	Hipertrofia	1
Inflamação	Infiltração	2

A prevalência percentual de cada alteração histológica foi calculada a partir da sua ocorrência nos peixes, adquirindo-se uma frequência de indivíduos com alterações histológicas específicas.

2.7.2. Transmission electron microscopy (TEM)

Fragments of the liver were fixed in Karnovsky's solution (4% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer 0.1 M, pH 7.3) for 2 h, post-fixed in a 1% osmium tetroxide solution buffered with sodium cacodylate (0.1 M, pH 7.3) for 2 h at room temperature, and contrasted in block with 1% uranyl acetate. Samples were then dehydrated in a graded series of

acetone, and infiltrated and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were cut, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined and photographed using a LEO 906E transmission electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.8. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA (oneway) e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W), dependendo da validação de normalidade e homogeneidade, através dos testes Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Resultados estatisticamente significativos seguiram para comparação entre grupos utilizando os testes de Tukey (HSD, paramétrico) e postos de H (não paramétrico). Correlações entre pares de dados foram obtidos através da correlação de Spearman ρ . As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando software Statistica 8.0 (Statsoft Inc., 2009).

3. Resultados

3.1. Físico-química da água

As variáveis físico-químicas da água não apresentaram diferenças significativas entre os sítios de amostragem (ANOVA: $p > 0,05$). As faixas de variação e respectivas médias e desvios padrão do pH foi entre 6,95 e 7,57 ($7,4 \pm 0,21$), da temperatura entre 25,69 e 29,08°C ($27,49 \pm 1,05$), da condutividade elétrica entre 30 e 85 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($67,27 \pm 14,87$), dos sólidos totais dissolvidos entre 15 e 47 ppm ($37,8 \pm 9,6$) e do oxigênio dissolvido entre 3,84 e 13,18 ppm ($8,22 \pm 2,2$).

3.2. Análise dos peixes

Dos 74 peixes coletados, foram identificados 34 fêmeas, 32 machos e 8 espécimes com sexo indeterminado. Os exemplares apresentaram variação (e respectivas médias e desvios padrão) de comprimento entre 18 e 44 cm ($26,7 \pm 5,73$), peso entre 150 e 2000 g ($495,4 \pm 416,9$) e peso do fígado entre 8 e 70 g ($23,2 \pm 13,9$). A média de comprimento dos peixes de S3 foi significativamente menor que os de S1 e S2 (K-W: $p < 0,05$, para ambos). Os peixes de S3 apresentaram média de peso significativamente menor que os de S1 (K-W: $p < 0,05$). Nos três sítios de amostragem foram encontradas correlações significativas ($p < 0,05$) entre comprimento e peso dos peixes; o

peso dos peixes e o peso do fígado; e o comprimento e peso do fígado, exceto para o tamanho dos peixes de S3 e seu peso hepático, que não apresentaram correlação significativa ($\rho=0,41$; $p>0,05$). Nenhum sítio de amostragem apresentou correlação significativa ($p>0,05$) entre os dados biométricos e os índices histopatológicos do fígado de *Serrasalmus rhombeus*

3.3. Mercúrio total em sedimento de fundo e peixes

O sedimento de fundo coletado nos três sítios de amostragem é constituído predominantemente por material silte-arenoso. As concentrações de mercúrio total apresentaram média e desvio padrão de $0,077\pm 0,019$ mg.kg⁻¹ em S1 e $0,066\pm 0,001$ mg.kg⁻¹ em S2 e S3.

Dados dos espécimes de peixes submetidos à análise de mercúrio total (THg) estão presentes na **Tabela 2**. Estes resultados são de indivíduos com faixa de comprimento corporal de 22 a 28 cm. O tamanho e o comprimento destes peixes apresentaram uma correlação significativa ($\rho=0.74$; $p<0,05$). Os indivíduos de S3 foram significativamente menores em peso e tamanho que os de S1 (K-W: $p<0.05$). Não foi encontrada correlação significativa ($\rho=-0.068$; $p>0,05$) entre as concentrações de THg no músculo e no fígado. A maior concentração média de THg no músculo foi encontrada em indivíduos de S3, seguida por S2 e S1, enquanto que a concentração média de THg no fígado segue a ordem inversa, com $S3<S2<S1$ (**Fig.2**). Apenas as concentrações de THg no fígado apresentaram diferenças significativas entre os sítios, com a média das concentrações de S3 significativamente menor (ANOVA: $p<0.05$) que S1 e S2. A razão fígado/músculo de concentração de mercúrio apresentou uma correlação negativa com o THg no músculo dos indivíduos de S3 ($\rho=-0.86$; $p<0,05$) e uma positiva com o THg no fígado dos indivíduos de S2 ($\rho=0.69$; $p<0,05$). Os indivíduos de S3 apresentaram razão fígado/músculo significativamente menor (ANOVA: $p=0.01$) que os de S1 e S2.

Table 2

Médias, desvios padrões, valores mínimos e máximos de peso, comprimento, peso do fígado e concentrações de THg nos tecidos muscular e hepático de *Serrassalmus rhombeus*. *

Diferenças significativas em comparação com S3 ($p < 0.05$).

Site	Weight (g)	Length (cm)	THg muscle (mg.kg ⁻¹)	THg liver (mg.kg ⁻¹)	Liver/Muscle THg ratio
S1 (n=9)	343.9 ± 57.4* 250 - 450	25.6 ± 1.2* 24 - 28	0.189 ± 0.039 0.130 - 0.265	0.210 ± 0.056* 0.134 - 0.329	1.11 ± 0.17* 0.92 - 1.43
S2 (n=12)	325.4 ± 122.3 185 - 525	25 ± 2.5 22 - 28	0.210 ± 0.093 0.098 - 0.437	0.202 ± 0.096* 0.066 - 0.432	1.07 ± 0.49* 0.27 - 1.80
S3 (n=11)	251.8 ± 42.9 200 - 350	23.3 ± 0.9 22 - 25	0.283 ± 0.134 0.085 - 0.525	0.114 ± 0.043 0.074 - 0.189	0.51 ± 0.35 0.21 - 1.18
p	0.023	0.019	0.168	0.006	0.001

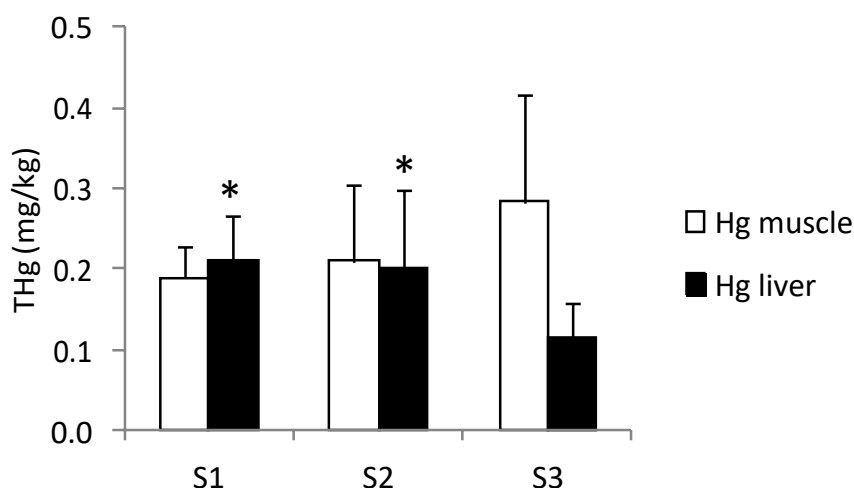


Fig. 2. Concentrações médias de THg no músculo e no fígado de *Serrassalmus rhombeus* dos sítios S1, S2 e S3. * Diferenças significativas em comparação com S3 ($p < 0,05$). Barra de erros representando intervalo de confiança de 95%.

3.4. Histologia do fígado

Os tecidos hepáticos de aspecto normal de *Serrassalmus rhombeus* provenientes do rio Itacaiúnas apresentaram uma estrutura homogênea, com coloração marrom avermelhada. O órgão é dividido em três lobos, um ventral e dois laterais direito e esquerdo com tamanhos equivalentes. Histologicamente o parênquima hepático é constituído pela veia centro lobular (VCL) circundado por capilares sinusóides, organizados entre linhas duplas de cordões de hepatócitos anastomosados. O hepatócito apresentou formato poligonal com núcleo esférico e centralizado (**Fig. 3a**). Foi observado tecido pancreático exócrino (**Fig.3b**) difuso próximo as veias e artérias hepáticas, e a ausência de

tríade portal, sendo encontrados ductos biliares e artérias hepáticas dispersas no parênquima.

Alterações histológicas observadas consistiram na desorganização dos cordões de hepatócitos, hipertrofia celular, infiltração leucocitária (**Fig.3d**), distúrbios circulatórios, caracterizados pela congestão vascular e hemorragia (**Fig.3e**), degeneração gordurosa, com aumento de gotículas de lipídeos, caracterizando esteatose (**Fig.3f**), vacuolização celular e necrose (**Fig.3g**). O ducto biliar apresentou alterações estruturais e celulares, caracterizadas pelo aumento do tecido conjuntivo e dilatação nuclear (**Fig.3c**).

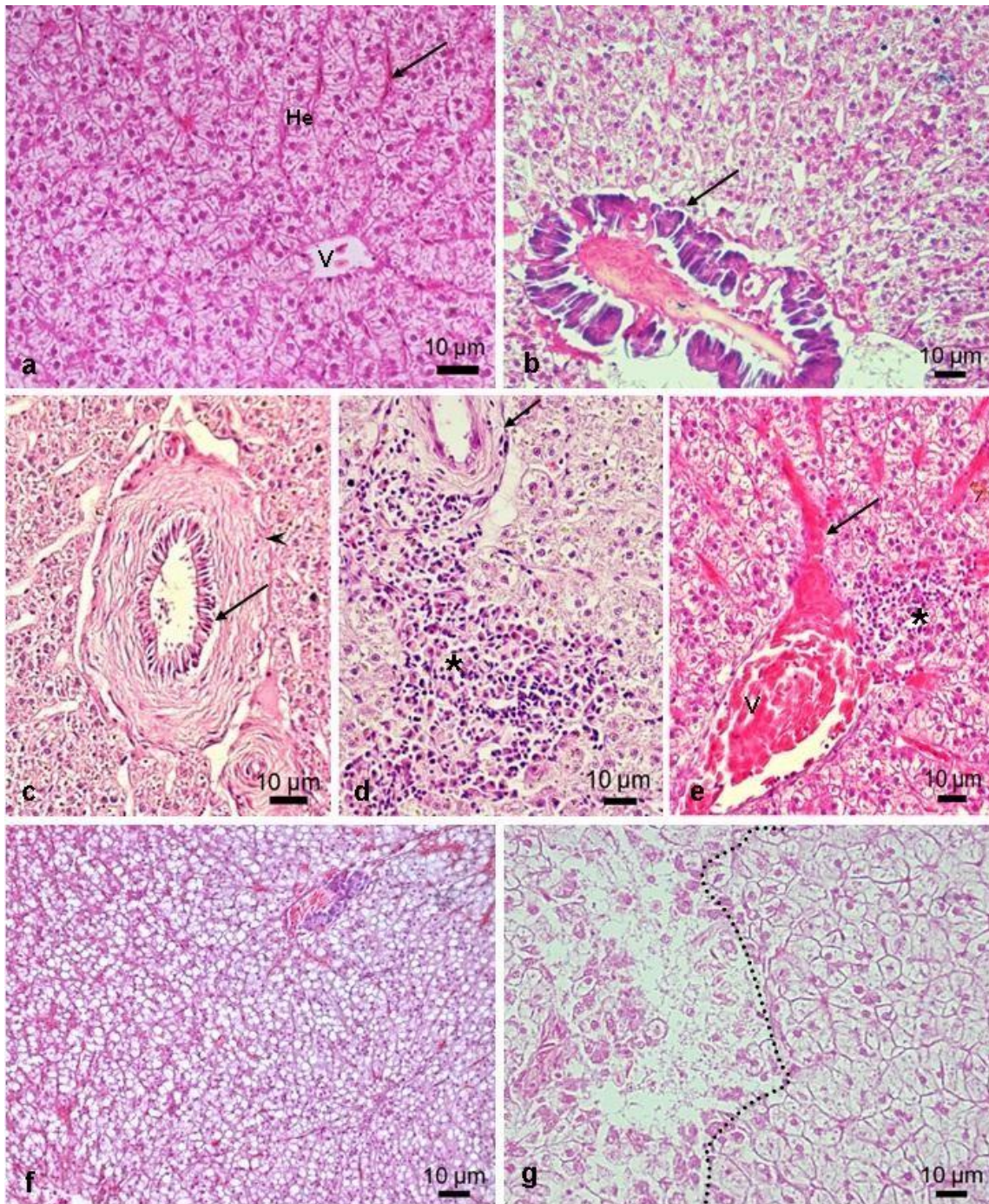


Fig. 3. Fígado de *Serrasalmus rhombeus* corado com H&E. [a] Arquitetura estrutural normal do tecido hepático com veia central (V), hepatócitos (He) e capilares sinusóides (seta); [b] tecido pancreático exócrino; [c] aumento do tecido conjuntivo (ponta da seta) e alteração nuclear de ducto biliar (seta); [d] infiltrado leucocitário (*) próximo de artéria hepática (seta); [e] veia central (V) e capilares sinusóides (seta) com congestão de células sanguíneas e presenças de infiltrado leucocitário (*); [f] depósitos de lipídeos caracterizando esteatose (degeneração gordurosa); [g] necrose à esquerda da linha pontilhada e hepatócitos vacuolizados à direita.

De acordo com a frequência de alterações observadas, os peixes de S2 apresentaram a menor frequência de alterações hepáticas. Enquanto a maior frequência foi observada nos peixes de S1. Contudo, as alterações histológicas mais severas ocorreram com maior frequência nos peixes de S3, que correspondem mais de 94% de indivíduos com necrose e 100% com infiltração leucocitária. Hepatócitos hipertróficos foram pouco frequentes entre os fígados dos peixes das três áreas de amostragem. Menos de 35% das alterações estão relacionadas com o ducto biliar.

O índice de histopatológico do fígado de *Serrasalmus rhombeus* seguiu a ordem de magnitude de $S2 < S1 < S3$, com valores médios de 15,1, 20,3 e 23,1, respectivamente. Não houve diferenças significativas ($p=0.104$) destes valores entre os sítios amostrais. Nenhum sítio amostral apresentou correlações significativas ($p > 0,05$) dos índices com as concentrações de THg no músculo e fígado e com a razão fígado/músculo.

Dentre a prevalência de índices por classe de severidade de alterações hepáticas foi observado que os espécimes dos três sítios amostrais apresentaram maior prevalência de índices histopatológicos dentro da classe 2. Ainda, vale ressaltar que os indivíduos de S3 apresentaram a maior prevalência de índice de classe 3 (38,9%) e menor prevalência de índice de classe 1 (5,6%). **Fig. 4.**

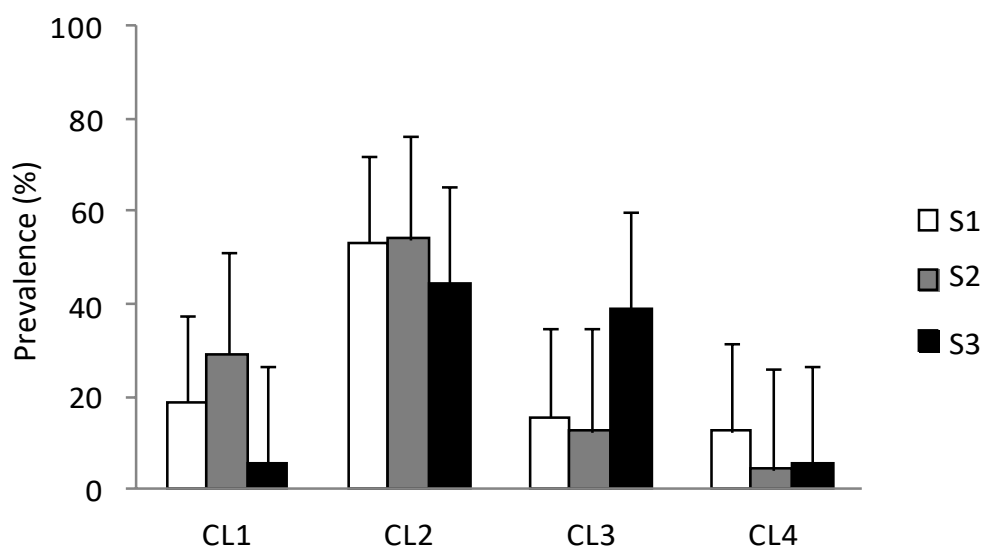


Fig. 4. Prevalência de índices histopatológicos do fígado de *Serrasalmus rhombeus* classificados em quatro classes de severidade (CL1 < CL2 < CL3 < CL4). Barra de erros representando intervalo de confiança de 95%.

3.5. Ultraestrutura do fígado

A organização ultraestrutural dos fígados saudáveis mostrou hepatócitos de formato variado com citoplasma contendo numerosas mitocôndrias esféricas e alongadas com cristas túbulo-vesiculares e homoganeamente distribuídas em associação com retículo endoplasmático rugoso (**Fig. 5a**). O núcleo apresentou forma oval, geralmente localizado no centro da célula, com cromatina granular e heterocromatina mais condensada na periferia. O nucléolo proeminente apresentou característica densa e homogênea. O hepatócito apresentou pouca compartimentação citoplasmática, mas com evidente área perinuclear rica em organelas e a área periférica constituída de material essencialmente glicogênio (**Fig. 5b**). Foram observadas eritrócitos nos capilares sinusóides (**Fig. 5c**).

As alterações hepáticas foram relacionadas com a morfologia e distribuição das organelas, em destaque as mitocôndrias, que apresentaram heterogeneidade em forma e tamanho, perda de cristas mitocondriais e destruição da sua eletro-densidade da matriz (**Fig. 5g, h**). Foi observado ainda dilatação e vesiculação do retículo endoplasmático rugoso, e depleção de glicogênio. Essas alterações resultaram na perda de compartimentação celular (**Fig. 5d, e, f**). Algumas células apresentaram núcleo com formato irregular e tamanho reduzido, com deformação pronunciada na sua membrana, formação e acúmulo de heterocromatina (**Fig. 5g, h**).

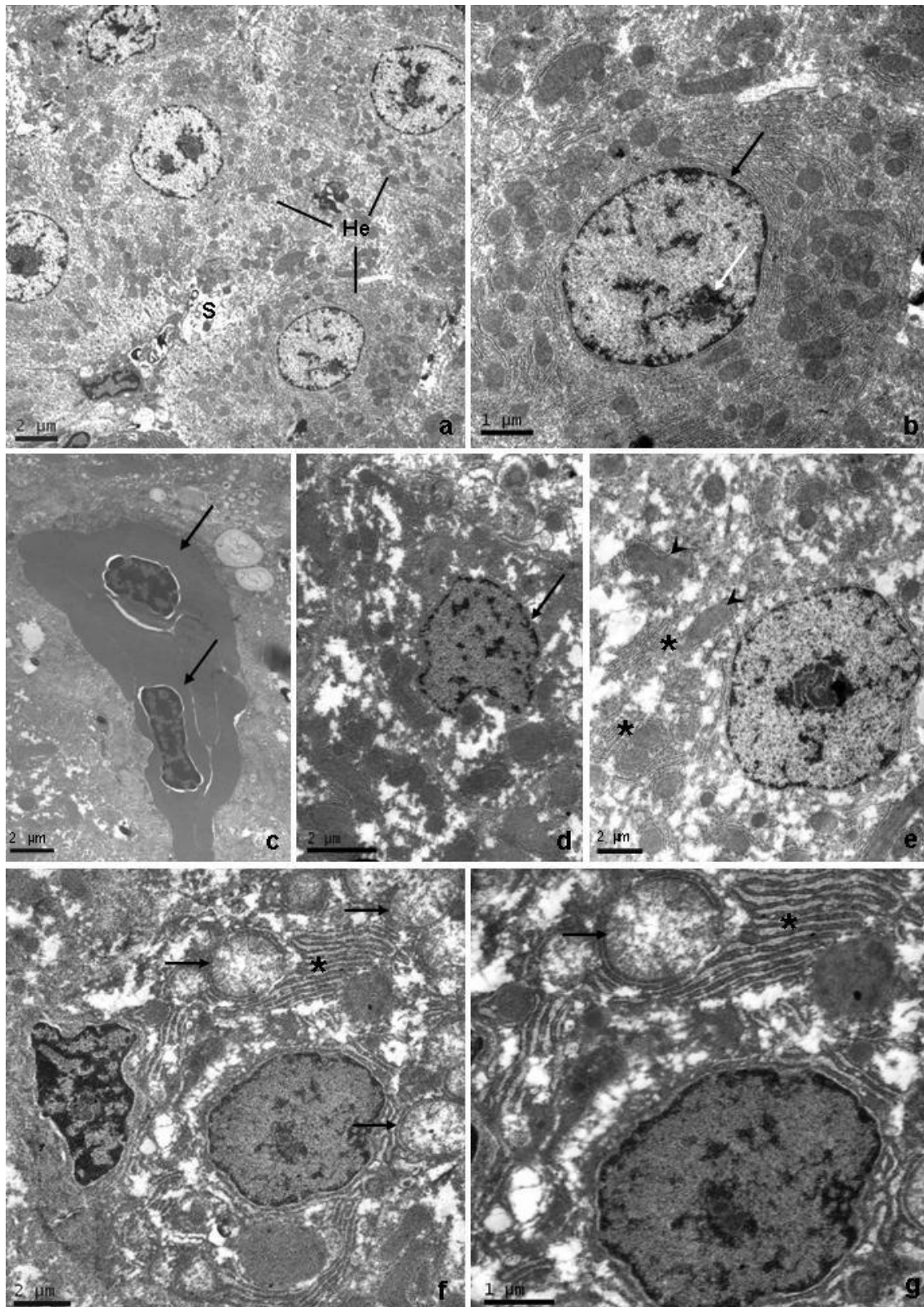


Fig. 5. Organização ultraestrutural de hepatócitos de *Serrasalmus rhombeus* (a) parênquima hepático normal com cordão sinusóide (S) separando hepatócitos (He); (b) hepatócito normal com núcleo esférico (seta preta), nucléolo (seta branca) e organelas distribuídas homogeneamente pelo citoplasma; (c) eritrócitos (seta); (d) alteração da forma nuclear esférica (seta), com formação de heterocromatina; (e) mitocôndrias com diferentes formas e tamanhos (ponta da seta) e retículo endoplasmático rugoso em vesículas (*); (f) mitocôndrias com diferentes formas e tamanhos (ponta da seta) e retículo endoplasmático rugoso em vesículas (*); (g) hepatócito em apoptose com cromatina condensada tendendo para periferia nuclear (à esquerda), perda de cristas mitocondriais (seta) e retículo endoplasmático rugoso em vesículas (*); (h) em evidência a

dilatação e vesiculação de retículo endoplasmático rugoso (*) e perda de cristas mitocondriais (seta).

4. Discussão

O rio Itacaiúnas apresentou pH neutro a levemente ácido, temperatura com pouca variação, condutividade elétrica moderada a alta, carga de sólidos totais dissolvidos baixa a moderada, e água com boa oxigenação. Esses valores são típicos para a maioria dos corpos d'água na região (Ibama, 2004) e, de acordo com a classificação dos rios amazônicos de Sioli (1950), os caracterizam como rios de águas claras.

As concentrações de THg no sedimento de fundo do rio Itacaiúnas estão dentro da faixa estabelecida por Lacerda and Pfeiffer (1992) para rios amazônicos não afetados por garimpo ($0,02-0,1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Vários estudos têm demonstrado que os rios amazônicos mais contaminados por mercúrio são aqueles onde o garimpo de ouro ocorreu em larga escala (Lacerda et al., 1991; Malm, 1998). Contudo, o solo amazônico é rico em ferro e o elevado nível de mercúrio nos rios da Amazônia pode estar relacionado com a formação de complexos férricos com este metal, sugerindo que sua origem seja natural e não antropogênica (Roulet and Lucotte.,1995). Por outro lado, deve-se considerar as propriedades físicas e químicas dos ecossistemas aquáticos, pois afetam significativamente a atividade biológica e a disponibilidade de agentes químicos (Morel et al., 1998), podendo favorecer sua precipitação e acumulação no sedimento de fundo.

Além disso, deve-se considerar o histórico de ocupação e exploração da área do entorno de Carajás, fortemente relacionado ao uso indiscriminado de mercúrio para recuperação de ouro (Silva, 2001). Ainda, a região de Carajás possui grandes reservas de minérios, entre eles se destacam o ferro e o manganês (Galarza et al., 2008). Nesse sentido, considerando que a mineração desenvolvida em Carajás tem contribuído para o aumento de sólidos totais dissolvidos e particulados na coluna d'água (Damous et al., 2002), somado ao fato do mercúrio ser fortemente adsorvido nos sólidos em suspensão, incluindo óxidos de ferro e manganês (Balogh et al., 1997), e as condições de pH encontradas nas águas do rio Itacaiúnas, o presente estudo sugere a ligação do mercúrio principalmente à fração particulada do sedimento.

A concentração média de THg no tecido muscular de *S. rhombeus* do presente estudo foram similares ao encontrado em outros *Serrasalmus* ($0,300 \pm 0,176 \mu\text{g.g}^{-1}$) de rios da Amazônia (Lacerda et al., 1994; Akagi et al., 1995; Castilhos et al., 1998; Brabo et al., 2000; Dórea et al., 2004). As médias das concentrações de THg no músculo segue uma ordem de magnitude ($S1 < S2 < S3$) inversa às do fígado ($S3 < S2 < S1$).

Nenhum sítio amostral apresentou correlação significativa entre o tamanho dos peixes e suas concentrações de THg tanto no músculo como no fígado, bem como nas concentrações de THg entre os tecidos. Contudo, o fígado apresentou acúmulo de THg ($< 0,570 \text{ mg.kg}^{-1}$) cerca de 2 vezes maior do que o músculo ($< 0,357 \text{ mg.kg}^{-1}$), resultando em altas taxas da razão fígado/músculo da concentração de THg (> 1). A ocorrência de elevadas taxas da razão fígado/músculo confirmam a evidência de que o fígado tem um papel central na acumulação de mercúrio, assumindo papel de tamponamento. Isto é, após o esgotamento da capacidade de retenção do fígado, o mercúrio é capaz de passar para o músculo e conseqüentemente, a sua acumulação neste começa a aumentar (Mieiro, et al., 2009). Esta hipótese é apoiada por pesquisas sobre dinâmica de acumulação do mercúrio em peixes e seus tecidos, que demonstram o fígado acumulando preferencialmente a forma inorgânica do mercúrio e, contrariamente, o músculo é o principal alvo do mercúrio orgânico (Shultz and Crear, 1976; Riisgard and Hansen, 1990).

A concentração de mercúrio em peixes depende de estratégias de alimentação, posição trófica na cadeia alimentar e fatores fisiológicos, e ainda de parâmetros físico-químicos da água, como pH e especiação do mercúrio (Lacerda et al., 1994; Castilhos and Bidone, 2000; Beltran-Pedrerros, 2011; Silva et al., 2011).

As histopatologias do fígado de *Serrasalmus rhombeus* foram evidenciadas no parênquima hepático como vacuolização lipídica ou em acúmulos isolados de lipídios caracterizado como esteatose, e em nível celular observado por processos inflamatórios e necróticos. Os peixes de S3 apresentaram sinais mais evidentes de degeneração lipídica, com a presença de esteatose associados a focos de necrose. Essas alterações são graves e têm sido associadas com a exposição de peixes à contaminação por metais, como o

mercúrio (Raldúa et al., 2007; Marchand et al., 2009; Dabrowska et al., 2012; Silva et al., 2012).

Alterações de processos metabólicos resultam em mudanças estruturais de organelas celulares (Hinton and Lauren, 1990), e foram confirmadas no presente estudo pela depleção glicogênica, heterogeneidade morfológica das mitocôndrias caracterizadas pela ausência de cristas mitocondriais e perda da eletron-densidade, retículo endoplasmático rugoso em vesículas e alterações nucleares características de apoptose. Esses tipos de alterações ultraestruturais foram encontradas em *Dicentrarchus labrax* expostos ao mercúrio (Giari et al., 2008). As mitocôndrias são importantes no metabolismo celular, pois estão envolvidas no processo de fosforilação oxidativa e na produção de trifosfato de adenosina (ATP) (Gallis et al., 2011). A perda da eletron-densidade da matriz mitocondrial compromete a produção de ATP para a célula (Green and Reed, 1998). Nesse sentido, é possível estabelecer uma relação entre a produção de energia, comprometida pela via do processo oxidativo que ocorre nas mitocôndrias, e a depleção de glicogênio no citoplasma, com este passando a atuar como uma reserva de glicose, convertida em energia na forma de ATP, via glicólise citosólica (Panepucci et al., 2001; Gallis et al., 2011). Estas alterações nucleares são indicativo de morte celular ou apoptose, confirmando que *Serrasalmus rhombeus* estão sofrendo estresse ambiental.

As alterações ultraestruturais mais pronunciadas foram encontradas nos peixes de S1 e S3. Os indivíduos de S3 também apresentaram o maior índice histopatológico do fígado. De acordo com Van Dyk et al. (2012), os índices histopatológicos verificados em *C. gariepinus* demonstraram com sucesso o histórico de poluição pretérito de áreas de represamento e rios de diferentes regiões da África do Sul. Portanto, a partir dos índices obtidos de *Serrasalmus rhombeus*, a ordem crescente $S2 < S1 < S3$ indica um grau de comprometimento biológico das águas do rio Itacaiúnas.

Os resultados deste estudo indicam que as alterações ultraestruturais modificam a estrutura do tecido hepático. Nesse sentido, apesar da concentração de mercúrio no tecido muscular estar abaixo do limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1990) e o sedimento de fundo do rio Itacaiúnas estar dentro da faixa considerada normal para os

rios da Amazônia, estes resultados representam um risco a longo prazo potencial à biota aquática, uma vez que espécies topo de cadeia, como *Serrasalmus rhombeus*, apresentam moderadas alterações na sua estrutura hepática, o que lhes impõe condições sub-letais de sobrevivência. Além disso, baseado na geologia local e na lixiviação de grandes quantidades de sólidos dissolvidos e particulados provocada pela mineração, sugere-se que o mercúrio está principalmente ligado à fração particulada do sedimento, indicativo de poluição difusa do mercúrio.

5. Conclusão

O uso de biomarcadores histológicos no tecido hepático de *Serrasalmus rhombeus* foi eficaz na avaliação da qualidade das águas do rio Itacaiúnas e, sobretudo, deve ser utilizado preventivamente à contaminação aquática.

Acknowledgments

We are especially grateful to CNPq, for granting a scholarship, and to IEC, pelas análises de mercúrio, e ao ICMBio, pela licença de pesquisa concedida na área de estudo e apoio logístico de campo.

References

- Abdel-Moneim, A. M., Al-Kahtani, M. A., Elmenshawy, O. M., 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, 88, 1028-1035.
- Akagi, H., Malm, O., Kinjo, Y., Harada, M., Branches, F. J. P., Pfeiffer, W. C., Kato, H., 1995. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. *Sci. Total Environ.* 175, 85-95.
- Arockia Vasanthi, L., Revathi, P., Mini, J., Munuswamy, N., 2013. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. *Chemosphere*. 91, 1156-1164.
- Balogh, S.J.; Meyer, M.L; Johnson, D.K., 1997. Mercury and suspended sediment loadings in the Lower Minnesota River. *Environ. Sci. Technol.* 32, 456-462.
- Beltran-Pedrerros, S., Zuanon, J., Leite, R. G., Peleja, J. R. P., Mendonça, A. B., Forsberg, B. R., 2011. Mercury bioaccumulation in fish of commercial

importance from different trophic categories in an Amazon floodplain lake. *Neotrop. Ichthyol.* 9, 901-908.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25–34.

Bernet, D., Schmidt, H., Wahli, T., Burkhardt-Holm, P., 2004. Evaluation of two monitoring approaches to assess effects of waste water disposal on histological alterations in fish. *Hydrobiolog.* 524, 53-66.

Brabo, E. S., Santos, E. O., Jesus, I. M., Mascarenhas, A. F. S., Faial, K. F., 2000. Mercury Contamination of Fish and Exposures of an Indigenous Community in Pará State, Brazil. *Environ. Res. Sect. A.* 84,197-203.

Castilhos, Z. C., Bidone, E. D., Lacerda, L. D., 1998. Increase of the Background Human Exposure to Mercury Through Fish Consumption due to Gold Mining at the Tapajós River Region, Pará State, Amazon. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 202-209.

Castilhos, Z. C. and Bidone, E. D., 2000. Hg Biomagnification in the Ichthyofauna of the Tapajós River Region, Amazonia, Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Springer-Verlag, New York Inc. 64, 693-700.

Damous, N. R., Wagener, A. L. R., Patchineelam, S. R., Wagener K., 2002. Baseline Studies on Water and Sediments in the Copper Mining Region of Salobo-3A, Carajás - Amazon, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 13, 140-150.

Dabrowska, H., Ostaszewska, T., Kamaszewski, M., Antoniak, A., Napora-Rutkowski, Ł., Kopko, O., Lang, T., Fricke, N. F., Lehtonen, K. K., 2012. Histopathological, histomorphometrical, and immunohistochemical biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 14–21.

Dórea, J. G., Barbosa, A. C., Souza, J., Fadini, P., Jardim, W. F., 2004. Piranhas (*Serrasalmus* spp.) as markers of mercury bioaccumulation in Amazonian ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 57–63.

Galarza, M. A., Macambira, M. J. B., Villas, R. N., 2008. Dating and isotopic characteristics (Pb and S) of the Fe oxide–Cu–Au–U–REE Igarapé´ Bahia ore

deposit, Carajás mineral province, Pará state, Brazil. *Journ. of Sout. Americ. Eart. Scien.* 25, 377–397.

Gallis, J. L., Gin, H., Roumes, H., Beauvieux, M. C., 2011. A metabolic link between mitochondrial ATP synthesis and liver glycogen metabolism: NMR study in rats re-fed with butyrate and/or glucose. *Nutr. Metab.* 8, pp. 38.

Giari, L., Simoni, E., Manera, M., Dezfuli, B.S., 2008. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 400–410.

Green, D. R., Reed, J. C., 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science.* 281, 1309-1312.

Goulding M., 1980. *The fishes and the forest. Explorations in Amazonian natural history.* Berkeley: University of California Press. 280p.

Hibyia, T. (Ed.), 1982. *An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features.* Kodansha Ltd., Tokyo, pp. 82-90.

Hinton, D. E., Lauren, D. J., 1990. Integrative Histopathological effects of environmental stressors on fishes. *Amer. Fish. Societ. Symp.* 8, 51-66.

IBAMA, 2004. *Plano de manejo para uso múltiplo da Floresta Nacional de Carajás.* Brasília, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/Ministério do Meio Ambiente.

Krull, M., Barros, F., 2012. Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 7, 57-66.

Lacerda L.D., Bidone E.D., Guimarães A.F., Pfeiffer W.C., 1994. Mercury concentration in fish from the Itacaiunas-Parauapebas River System, Carajas Region, Amazon. *An. Acad. Bras. Ci.* 66, 373-379.

Lacerda, L. D.; Pfeiffer, W. C., 1992. Mercury from gold mining in the Amazon Environment – an overview. *New Chem.* 15, 155-160.

Lacerda, L. D., Pfeiffer, W. C., Marins, R. V., Rodrigues, S., Souza, C. M. M., Bastos, W. R., 1991. Mercury dispersal in water, sediments and aquatic biota of a gold mining tailing deposit drainage in Paconé, Brazil. *Water, Air, Soil Pollut.* 55, 283-294.

- Liu, X.-J., Luo, Z., Li, C.-H., Xiong, B.-X., Zhao, Y.-H., Li, X.-D., 2011. Antioxidant responses, hepatic intermediary metabolism, histology and ultrastructure in *Synechogobius hasta* exposed to waterborne cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1156–1163.
- Lowe-McConnell, R. H. 1987. Ecological studies in tropical fish communities. Cambridge University Press, Cambridge. 382 pp.
- Malm, O. 1998. Goldmining as a source of Mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ. Research.* 77, 73-8.
- Mason R. P., Fitzgerald W. F., Morel F. M. M., 1994. The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 58, 3191–3198.
- Mieiro C. L., Pacheco, M., Pereira, M. E., Duarte, A. C., 2009. Mercury distribution in key tissues of fish (*Liza aurata*) inhabiting a contaminated estuary – Implications for human and ecosystem health risk assessment. *J. Environ. Monit.* 11, 1004-1012.
- Morel, F. M. M; Kraepiel, A. M.; Amyot, M., 1998. The Chemical Cycle And Bioaccumulation Of Mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 543–66.
- Marchand, M.J., van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., Barnhoorn, I.E.J., Bornman, M.S., 2009. Histopathological alterations in the liver of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* from polluted aquatic ecosystems in South Africa. *Environ. Toxicol.* 24, 133–147.
- Panepucci, R. A., Panepucci, L., Fernandes, M. N., Sanchez, J. R., Rantin, F. T., 2001. The effect of hypoxia and recuperation on carbohydrate metabolism in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Brazil. J. Biol.* 6, 547-554.
- Raldúa, D., Díez, S., Bayona, J. M., Barceló, D., 2007. Mercury levels and liver pathology in feral fish living in the vicinity of a mercury cell chlor-alkali factory. *Chemosphere.* 66, 1217–1225.
- Riisgård H. U., Hansen S. 1990. Biomagnification of mercury in a marine grazing food-chain: algal cells *Phaeodactylum tricornutum*, mussels *Mytilus edulis* and flounders *Platichthys flesus* studied by means of a stepwise-reduction-CVAA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62, 259-270.

Roulet, M., Lucotte, M., 1995. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. *Water, Air & Soil Pollut.* 80, 1079-1085.

Shultz, C. D., Crear, D., 1976. The Distribution of Total and Organic Mercury in Seven Tissues of the Pacific Blue Marlin, *Makaira nigricans*. *Pacific Science.* 30, 101-107.

Silva, G. S., Filipak Neto, F., Assis, H. C. S., Bastos, W. R., Ribeiro, C. A. O., 2012. Potential risks of natural mercury levels to wild predator fish in an Amazon reservoir. *Environ Monit Assess.* 184, 4815-4827.

Silva, A.R.B., 2001, Tapajós Gold Garimpos, In: Villas Boas, R.C. , Beinhoff, C., Silva, A.R.B (Eds.), *Mercury in the Tapajós Basin*. CETEM/IMAAC/CYTED, Rio de Janeiro, pp. 31 – 50.

Sioli, H. 1950. Das wasser in Amazonasgebiet. *Forsch. Fortchr.* 26, 274-280.

Van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish Bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

Van Dyk, J. C., Cochran, M. J., Wagenaar, G. M., 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere.* 87, 301–311.

Zimmerli, S., Bernet, D., Burkhardt-Holm, P., Schmidt-Posthaus, H., Vonlanthen, P., Wahli, T., Segner, H., 2007. Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline in brown trout catches. *Aquat. Sci.* 69, 11-25.

WHO, 1990. *Environmental Health Criteria 101: Methylmercury*, Geneva, World Health Organization. pp. 144.