



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE E NÍVEIS DE MERCÚRIO  
EM *Hoplias malabaricus* (PISCES – CHARACIFORMES) DE  
DUAS ÁREAS DA BACIA DO RIO TAPAJÓS**

**CHRISTIAN DINIZ LIMA E SILVA**

**Santarém, Pará  
Abril, 2017**

**CHRISTIAN DINIZ LIMA E SILVA**

**ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE E NÍVEIS DE MERCÚRIO  
EM *Hoplias malabaricus* (PISCES – CHARACIFORMES) DE  
DUAS ÁREAS DA BACIA DO RIO TAPAJÓS**

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS REGINALDO RIBEIRO RODRIGUES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências – PPGBio.

**Área de concentração:** Fisiologia Geral

**Linha de pesquisa:** Toxicologia Ambiental

**Santarém, Pará  
Abril, 2017**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

S586a Silva, Christian Diniz Lima e

Análise de genotoxicidade e níveis de mercúrio em *Hoplias Malabaricus* (pisces–characiformes) de duas áreas da bacia do rio Tapajós. / Christian Diniz Lima e Silva. – Santarém, Pa, 2017.

56fs.: il.

Inclui bibliografias.

Orientador Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação em Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. Mercúrio. 2. Micronúcleo. 3. Anomalia nuclear eritrocitária. 4. Ensaio cometa. 5. *Hoplias malabaricus*. I. Rodrigues, Luis Reginaldo Ribeiro, orient. II. Título.

CDD: 23 ed. 363.7394



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

1 No dia doze de abril do ano de dois mil e dezessete foi realizada a defesa de  
2 mestrado da dissertação intitulada “ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE E  
3 NÍVEIS DE MERCÚRIO EM HOPLIAS MALABARICUS (PISCES – CHA-  
4 RACIFORMES) DE DUAS ÁREAS DA BACIA DO RIO TAPAJÓS”, do aluno  
5 **Christian Diniz Lima e Silva**, devidamente matriculado no Programa de Pós-  
6 Graduação em Biotecnologia – PPGBiotecnologia. A banca examinadora estava  
7 composta pelos professores doutores Josafá Gonçalves Barreto e Marcos  
8 Prado Lima, mediação realizada pelo professor doutor Luis Reginaldo Ribeiro  
9 Rodrigues (orientador). A apresentação teve início às 14:37 e finalização  
10 às 15:10. Após o término da apresentação foi realizada a arguição pelos  
11 devidos membros examinadores. A sessão foi finalizada às 16:25 após a  
12 divulgação do resultado da defesa de dissertação de mestrado na qual o alu-  
13 no foi **APROVADO**, condicionado a entregar no prazo de 30 dias a versão  
14 corrigida da dissertação. Para efeito legal segue a presente ata assinada pelo  
15 professor representante do orientador da dissertação apresentada, pelo mes-  
16 trando e pelos professores avaliadores.

*Luis Reginaldo R. Rodrigues*  
**Prof. Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues (orientador)**

*Josafá Gonçalves Barreto*  
**Prof. Dr. Josafá Gonçalves Barreto**

*Marcos Prado Lima*  
**Prof. Dr. Marcos Prado Lima**

*Christian Diniz Lima e Silva*  
**Christian Diniz Lima e Silva**

# DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família:*

*Meus pais: Joana Maria e Manuel Diniz*

*Meus irmãos: Christopher Diniz e Christine Diniz*

*E a minha esposa e companheira: Viviane Diniz.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo apoio espiritual, por ter me dado forças nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao Professor Luís Reginaldo, pela oportunidade de entrar no seu grupo de pesquisa. Por todo apoio e amizade que pôde me conceder durante essa pesquisa, até mesmo pelas broncas. Sempre me lembrarei de seus conselhos profissionais e, principalmente, os pessoais, o senhor me ensinou muito sobre a escola da vida. Obrigado por tudo!

Agradeço a Maria Beatriz (Bia), pela amizade e pelas inúmeras conversas. Sempre te considerei minha co-orientadora, obrigado por tudo.

Aos amigos LGBio, Ivanny, Karen, Jamile, Elenilze, Dana e Albino. Aos amigos LGBio (Campus Rondon), Prof. Gabriel, Ezequias, Felipe Ávila. À Profa. Heloísa, por poder contribuir na sua pesquisa de doutorado, junto com a Amanda e o Felipe, nas inesquecíveis viagens de campo. Ao grandioso Jhonatan (Jhon) que deixou sua esposa para me acompanhar nas coletas de campo do Rio Crepori. Agradeço a todos pela convivência durante essa jornada.

As minhas alunas de iniciação científica de ensino médio, Emanuelle Raysa e Diana Pereira.

Ao meu grande amigo Jamyson, pelo acolhimento em sua casa. Seu auxílio foi de grande importância durante as coletas realizadas na comunidade do Creporizão.

Ao Sr. Valdecir e sua família, pelas coletas realizadas no Lago Juá. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Ricardo Bezerra, Coordenador do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LABBEX), que me auxiliou na dosagem de mercúrio.

Aos meus colegas da turma de mestrado 2014, por todos os momentos, alegrias e inúmeras angústias. Sempre guardarei vocês em minhas lembranças.

À Universidade Federal do Oeste do Pará e o Programa de Pós-Graduação em Biociências, pela oportunidade de estudo.

À Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará (FAPESPA) pelo auxílio à pesquisa (Edital 006/2014; ICAAF 170/2014) e pela bolsa de mestrado que foram fundamentais para execução deste projeto.

À minha família, por todo apoio, e minha esposa, Viviane, pelo amparo e carinho, e por ter compreendido minha ausência.

## RESUMO

A bacia do rio Tapajós tem sido atingida pela contaminação mercurial derivada do processo de desmatamento em matas ciliares e de atividades do garimpo de ouro. O mercúrio (Hg) por possuir capacidade de se bioacumular através da cadeia alimentar, maximiza seus efeitos nocivos nas espécies de peixes de hábito alimentar piscívoro. Elevados níveis de Hg foram observados em peixes do rio Tapajós e, o consumo de peixes contaminados nesta região é considerado uma importante via de exposição humana. No presente trabalho investigamos os níveis de mercúrio em tecido muscular fresco de *Hoplias malabaricus*, assim como, os níveis de danos genotóxicos em eritrócitos por meio do teste de micronúcleo (TMN) e ensaio cometa (EC). Foram analisados 10 indivíduos do Lago Juá, rio Tapajós (Região do município de Santarém) e 15 do rio Crepori (Região do município de Itaituba). Na população do Lago Juá observamos valores médios de mercúrio (Hg) de 0.46 mg.kg<sup>-1</sup>; frequência média de micronúcleo (MN) de 0.05%, 0.59% de anomalia nuclear eritrocitária (ANE) e escore do índice de danos de 68.1. Por outro lado, na população do rio Crepori, os valores observados foram: 1.26 mg.kg<sup>-1</sup> de Hg; 0.09% de MN, 0.57% de ANE e 156.9 de índice de danos. As comparações entre as duas populações mostraram diferença estatística para nível de mercúrio e índice de danos ao DNA pelo EC ( $p < 0.05$ ). Não foi encontrada diferença entre MN e ANE entre as localidades estudadas. A população de *H. malabaricus* do rio Crepori apresentou maior índice de danos genotóxicos/celulares e de concentração de Hg total. A proximidade deste rio com as áreas de garimpo do ouro podem explicar o maior nível de Hg observado.

Palavras chave: mercúrio, micronúcleo, anomalia nuclear eritrocitária, ensaio cometa, *Hoplias malabaricus*.

## ABSTRACT

The Tapajós river basin has been affected by the mercurial contamination derived from the process of deforestation in riparian forests and gold mining activities. The Mercury (Hg), because it has the ability to bioaccumulate through the food chain, maximizes its harmful effects on piscivorous fish species. High levels of Hg were observed in fish from the Tapajós River, and the consumption of contaminated fish in this region is considered an important route of human exposure. In the present work, we investigated the levels of mercury in fresh muscle tissue of *Hoplias malabaricus*, as well as the levels of genotoxic damage in erythrocytes through the micronucleus test (MN) and comet assay (EC). We analyzed 10 individuals from Lake Juá, Tapajós River (Region of the municipality of Santarém) and 15 of the Crepori River (Region of the municipality of Itaituba). In the population of Juá Lake we observed average values of mercury (Hg) 0.46 mg.kg<sup>-1</sup>; MN frequency of 0.05%, ANE frequency of 0.59% and score of damage index of 68.1. On the other hand, in the population of the Crepori River, the observed values were Hg of 1.26 mg.kg<sup>-1</sup>; MN of 0.09%, ANE of 0.57% and score of damage of 156.9. The comparisons between the two populations showed statistical difference for mercury level and DNA damage index (p<0.05). Although there was no difference between MN and ANE between the studied sites, does not mean absence of genotoxic effects, since the presence of MN and ANE are comes from a possible clastogenic and/or aneugenic effect. The *H. malabaricus* population of the Crepori River had a higher index of genotoxic / cellular damage and of total Hg concentration. The proximity of this river to gold mining areas might explain the highest level of observed Hg.

Keywords: mercury, micronucleus, nuclear erythrocyte anomaly, comet assay, *Hoplias malabaricus*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
2.1 Mercúrio e Amazônica.....	13
2.2 Genotoxicidade do mercúrio .....	15
2.3 Teste de micronúcleo .....	16
2.4 Ensaio cometa .....	19
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 Objetivo geral .....	22
3.2 Objetivos específicos .....	22
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Local de coleta e amostragem .....	23
4.2 Determinação de Mercúrio total .....	26
4.3 Teste de Micronúcleo em eritrócitos de peixes .....	27
4.4 Ensaio Cometa em eritrócitos de peixes .....	29
4.5 Análise Estatística .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
5.1 Bioacumulação de mercúrio total .....	34
5.2 Micronúcleo e Anomalia Nuclear Eritrocitária .....	37
5.3 Ensaio Cometa .....	44
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>
ANEXO 01 - Protocolo do Comitê de Ética Animal.....	53
ANEXO 02: Tabela de resultados .....	54

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Descrição dos dados amostrais por localidades. n= número total de peixes coletados; CT= comprimento total em centímetros. .... 24
- Tabela 02:** Análise descritiva das amostras de *Hoplias malabaricus* do lago Juá e rio Crepori. CP= Comprimento padrão em centímetros; %MN= Frequência de micronúcleo; %ANE= Frequência total de anomalias nucleares eritrocitárias. .... 31
- Tabela 03:** Análise descritiva de peso e comprimento de *Hoplias malabaricus* da bacia do Rio Tapajós. N= número de peixes analisados. .... 32
- Tabela 04:** Níveis de mercúrio ( $\mu\text{g/g}$ ) em peixes piscívoros de alguns trabalhos realizados na região de Itaituba e Santarém, rio Tapajós. .... 36
- Tabela 05:** Frequência média de micronúcleos em *Hoplias malabaricus* da região do rio Tapajós. N= número de peixes por localidade; MN= Micronúcleo; DP=Desvio padrão. .... 37
- Tabela 06:** Frequência média de micronúcleos em populações de *Hoplias malabaricus*..... 39
- Tabela 07:** Média e desvio padrão da frequência das categorias de Anormalidade Nucleares Eritrocitárias (ANE) em *Hoplias malabaricus*. Foram analisadas 2000 células por indivíduo ..... 40
- Tabela 08:** Média e desvio padrão dos escores de cometa de *Hoplias malabaricus* do rio Tapajós e rio Crepori. N= número de peixes; Score/ID= índice de danos pelo ensaio cometa 44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Formação de micronúcleo em célula mononucleada. A) evento aneugênico - um cromossomo duplicado não segregado durante a anáfase origina um micronúcleo em uma das células filhas; B) evento clastogênico – um fragmento cromossômico acêntrico não segregado em anáfase resulta em micronúcleo em uma célula filha (Fonte: TERRADAS et al., 2010) . 17
- Figura 02:** Micronúcleos e alterações nucleares eritrocitárias de *Hoplias malabaricus*. A) Micronúcleo; B) Notched; C) Blebbed; E) Lobed; E) Vacuolated; F) Binucleate. Fonte: LGBio-UFOPA ..... 19
- Figura 03:** Classificação visual dos níveis de fragmentação do DNA, segundo o grau de lesão; Classe 0 à classe 4. (AZQUETA e COLLINS, 2014) ..... 20
- Figura 04:** Exemplar de *Hoplias malabaricus*. Foto: Laboratório de Genética e Biodiversidade – LGBio-UFOPA ..... 23
- Figura 05:** Mapa do estado do Pará mostrando a localização dos pontos de coleta de *Hoplias malabaricus* no Lago Juá (rio Tapajós) e no garimpo Creporizão (rio Crepori). Elaborado com o software livre QGIS..... 25
- Figura 06:** Lago Juá, rio Tapajós, região do município de Santarém. Fonte: Laboratório de Genética e Biodiversidade – LGBio-UFOPA ..... 25
- Figura 07:** Rio Crepori, com vista parcial da comunidade do Creporizão. Fonte: LGBio-UFOPA ..... 26
- Figura 08:** Equipamento DMA-80. Fonte: DMA-80 Direct Mercury Analyzer ..... 26
- Figura 09:** Representação do funcionamento do equipamento DMA-80. Fonte: Nortje (2010) ..... 27
- Figura 10:** Resumo das etapas que integram o teste de micronúcleo: esfregaço sanguíneo, lâminas antes e após a coloração de giemsa. A) Posicionamento da lâmina extensora no ângulo de 45° na amostra de sangue; B) Movimento da distensão sanguínea; C) Lâmina antes da coloração; D) Lâmina após a coloração. Fotos: LGBio-UFOPA ..... 28
- Figura 11:** Resumo das etapas que integram o ensaio cometa. Fonte: Rocha, (2009) adaptado por Christian Diniz ..... 30
- Figura 12:** Variação no Peso de *Hoplias malabaricus* da região de Santarém (Rio Tapajós) e Itaituba (Rio Crepori), em que não a diferença significativa entre as duas localidades ( $p=0.161$ ) ..... 32
- Figura 13:** Correlação positiva entre a concentração de mercúrio ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) em tecido muscular com o peso corporal de *Hoplias malabaricus* do lago Juá ..... 33

<b>Figura 14:</b> Correlação positiva entre a concentração de mercúrio ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) em tecido muscular com o peso corporal de <i>Hoplias malabaricus</i> do rio Crepori .....	33
<b>Figura 15:</b> Média e desvio padrão da concentração de Hg Total em músculo branco de traíra ( <i>Hoplias malabaricus</i> ) proveniente de duas localidades na bacia do Rio Tapajós. A linha vermelha indica o valor limite máximo de Hg Total ( $1.0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) determinado pela ANVISA para peixes piscívoros destinados ao consumo humano. A linha azul indica o valor limite máximo de Hg Total ( $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) determinado pela OMS para peixes destinados ao consumo humano. ....	35
<b>Figura 16:</b> Eritrócitos de <i>Hoplias malabaricus</i> em distensão sanguínea corada por Giemsa. A) uma célula com micronúcleo (seta); b) célula sem alteração (seta) .....	38
<b>Figura 17:</b> Frequência relativa em percentagem das categorias de Anormalidades Nucleares Eritrocitárias de <i>Hoplias malabaricus</i> do rio Tapajós e rio Crepori. ....	40
<b>Figura 18-:</b> Correlação entre a concentração de mercúrio ( $\text{mg.Kg}^{-1}$ ) em tecido muscular com a frequência de micronúcleos (MN) e Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE) de <i>Hoplias malabaricus</i> . A= %MN com Hg Lago Juá; B: %ANE com Hg Lago Juá; C=%MN com Hg Rio Crepori; D= %ANE com Hg Rio Crepori.....	42
<b>Figura 19:</b> Eritrócitos de <i>Hoplias malabaricus</i> em distensão sanguínea corada por Giemsa. a) “Notched” (seta); b) “Blebbled” (seta); c) “Vacuolated” (seta); d) “Lobed” (seta); e) “Binucleate” (seta). Fotos: Christian Diniz, 2016 .....	43
<b>Figura 20:</b> Índice de danos em <i>Hoplias malabaricus</i> do Lago Juá e do rio Crepori, bacia do rio Tapajós .....	44
<b>Figura 21:</b> Frequência relativa em percentagem de danos ao material genético de <i>Hoplias malabaricus</i> observadas nas diferentes classes de cometa. Foram analisadas 100 células por animal (n=25) .....	45

## LISTA DE ABREVIACOES

Hg: Mercúrio.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

WHO: Organizao Mundial da Saúde (do inglês: World Health Organization)

EPA: Agência de Proteo Ambiental dos Estados Unidos (do inglês: *United States Environmental Protection Agency*).

Hg<sup>2+</sup>: ion de mercúrio

Hg<sub>2</sub><sup>2+</sup>: ion mercuroso

Hg<sup>0</sup>: Mercúrio metálico

MeHg: Metilmercúrio

TMN: Teste de micronúcleo

MN: Micronúcleo

ANE: Anomalia nuclear eritrocitária

EC: Ensaio cometa

LABBBEX: Laboratório de Bioprospeo e Biologia Experimental

UFOPA: Universidade Federal do Oeste do Pará

-SH= Radical sulfridril

# 1 INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é um dos metais pesados de elevada toxicidade, tendo propriedades bioacumulativas e potencial genotóxico (WHO, 1991). Na região amazônica, têm-se observado a presença de mercúrio e suas outras formas químicas em diversos compartimentos dos ecossistemas aquáticos. Algumas regiões da bacia amazônica apresentam um histórico de contaminação aquática por mercúrio, principalmente associada à atividade garimpeira do ouro, mas também pelo processo de lixiviação intensificado por desmatamentos (LACERDA et al., 1989). Na década de 80 do século XX, a região do médio rio Tapajós experimentou uma “corrida do ouro” e se tornou uma das maiores áreas de garimpo da Amazônia. Essa região, ainda hoje, é considerada um dos maiores centros produtores de ouro no Brasil, gerando contaminação ambiental por mercúrio (AZEVEDO, 2003).

Os peixes são considerados importantes organismos bioindicadores para pesquisas sobre contaminação ambiental. O metilmercúrio é a forma mais tóxica do mercúrio, consegue se acumular nos tecidos de animais aquáticos devido a fácil absorção desta forma orgânica, levando a altas concentrações na cadeia biológica, com concentrações bem maiores do que as originalmente encontradas no ambiente (AZEVEDO, 2003). Na região do Tapajós há registros de intoxicação em humanos, tanto por exposição ocupacional como por consumo de peixes contaminados (NEVADO et al. 2010).

O emprego de testes genotóxicos, principalmente em organismos aquáticos, permite avaliar o efeito de poluentes no meio aquático, bem como alterações de seu potencial tóxico e genotóxico (JESUS e CARVALHO, 2008). A nível celular pode-se utilizar o teste de micronúcleo, que consiste em um ensaio *in vivo*, capaz de detectar substâncias que quebram cromossomos (efeito clastogênico) ou que interferem na formação do fuso mitótico, provocando alterações cromossômicas durante a divisão celular (efeito aneugênico) (FLORES e YAMAGUCHI, 2008). Outro teste, conhecido como ensaio cometa, possui a capacidade de detectar quebras de DNA em células individualizadas (RIBEIRO et al., 2003). Ambos os testes são muito utilizados na avaliação de uma substância potencialmente genotóxica.

A concentração limite de mercúrio em peixes para consumo humano foi determinada pela Organização Mundial de Saúde em 0,5mg/kg (WHO,1990). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina o limite de 0,5 mg/kg para peixes não-predadores, e 1,0 mg/kg para peixes predadores (BRASIL, 1998). Estudos envolvendo espécies de peixes carnívoros da bacia do Tapajós, tais como o tucunaré (*Cichla ocellaris*) e

surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), revelaram níveis de mercúrio total acima do limite determinado pela ANVISA (LIMA et al. 2000).

Embora muitos autores tenham avaliado os níveis de mercúrio em peixes do rio Tapajós (LIMA et al., 2000; PINHEIRO et al., 2000, SAMPAIO DA SILVA et al., 2006), há uma carência de informações sobre possíveis danos genotóxicos em peixes nativos desta região. No presente estudo, visamos avaliar o nível de danos celulares e genéticos em peixes da bacia rio Tapajós potencialmente associado à exposição ambiental ao mercúrio, contribuindo com o monitoramento ambiental.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mercúrio e Amazônia

Segundo Azevedo (2003), o Hg em baixas concentrações está naturalmente presente nos diversos compartimentos da natureza como hidrosfera, litosfera, atmosfera e biosfera. O Hg pode ser emitido por meio de fontes naturais ou fontes antropogênicas. Em condições naturais, o mercúrio pode ser liberado por meio de erupções vulcânicas, atividades geotérmicas, fraturas rochosas na crosta terrestre, evasões de solo mineralizado e minas de mercúrio, desgaseificação natural da crosta terrestre e evaporação da água (AZEVEDO, 2003; SANTOS et al. 2006). Pela via antropogênica, os principais emissores são o setor industrial de equipamentos elétricos, lâmpadas, baterias, ferro, pesticidas, produção de tintas, produção de papel e equipamentos médicos. Além destes, merece destaque a queima de combustíveis fósseis, incineração de lixo, amalgamação odontológica, produtos farmacêuticos e mineração de ouro (WHO, 1991; MICARONI et al., 2000; SANTOS et al., 2006).

Podemos encontrar o mercúrio em três estados de oxidação: 0, mercúrio metálico ( $\text{Hg}^0$ ), que é a substância simples em seu estado elementar, e duas formas oxidadas: 1+ (íon mercuroso,  $\text{Hg}_2^{2+}$ ) e 2+ (íon mercúrico,  $\text{Hg}^{2+}$ ) (AZEVEDO, 2003). O mercúrio elementar pode permanecer na atmosfera por longos períodos, podendo sofrer oxidação e formar outros estados como o  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Hg}_2^{2+}$ , nos quais o átomo perdeu um e dois elétrons, respectivamente (AZEVEDO, 2003). O  $\text{Hg}^0$  encontra-se principalmente na forma de vapor, onde uma porção deste pode atingir a atmosfera, sendo oxidada e convertida em uma forma hidrossolúvel,

$\text{Hg}^{2+}$ , que pode ser reemitida para a atmosfera por meio da deposição no solo (MICARONI et al., 2000).

O mercúrio e suas espécies químicas quando lançadas no meio ambiente podem contaminar a biota aquática, causando problemas em populações, comunidades e ecossistemas (JESUS e CARVALHO, 2008). A poluição de ecossistemas aquáticos está associada principalmente a capacidade de bactérias metanogênicas converterem as formas metálicas de mercúrio e mercúrio inorgânico, em sua forma orgânica, conhecido como metilmercúrio (AZEVEDO, 2003). Após o processo de biotransformação, o metilmercúrio tem a capacidade de se acumular em organismos vivos, fenômeno conhecido como bioacumulação, e à medida que se avança os níveis tróficos o efeito acumulativo do metilmercúrio é intensificado, sendo este fenômeno chamado de biomagnificação (LACERDA e MALM, 2008).

Na Amazônia a extração de ouro tem sido responsável pelo lançamento de grande quantidade de mercúrio no meio ambiente (LACERTA et al, 1998). O mercúrio é usado na captação de partículas do metal nobre, formando um amálgama ouomercúrio que posteriormente é submetido à queima para separação dos metais. Com essa queima, ocorre a liberação de mercúrio líquido e vapor que pode atingir os rios e lagos da região, onde poderá sofrer processos de metilação dando início ao processo de bioacumulação via cadeia alimentar (PINHEIRO et al., 2000).

Os peixes, por ocuparem os diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos, possuem um importante papel como organismos sentinela, funcionando como indicadores de poluição (JESUS e CARVALHO, 2008). De acordo com Lima et al (2000), a concentração de mercúrio em peixes, no município de Santarém no baixo Tapajós, demonstra níveis elevados sendo maior em carnívoros do que em herbívoros e onívoros, inclusive com níveis acima do limite determinado pela OMS e ANVISA. Arrifano (2011) obteve resultados semelhantes em peixes coletados no rio Tapajós, município de Itaituba, região associada à exploração de ouro. A contaminação de metilmercúrio corresponde a cerca de 90% da concentração total de Hg analisado em peixes da Amazônia (CANELA, 1995).

O mercúrio pode contaminar o homem de maneira ocupacional, ligada ao ambiente de trabalho, como exemplo, no garimpo de ouro pela inalação de vapor. Outra forma de contaminação é a ambiental, provocada por ingestão de alimentos, geralmente de peixes contaminados, sendo esta a principal forma de contaminação. Compostos orgânicos de mercúrio, especificamente metilmercúrio, são responsáveis pela contaminação ambiental, já o

mercúrio metálico e sais de mercúrio são responsáveis pela contaminação ocupacional (ZAHIR et al., 2005).

Contudo, em comunidades ribeirinhas da região do Tapajós o pescado representa a principal fonte protéica na alimentação (DE SÁ et al., 2006). PINHEIRO et al. (2006) evidenciaram em amostras capilares de habitantes das comunidades de Barreiras e São Luiz do Tapajós, níveis de mercúrio acima do limite de 10µg/g estabelecido pela OMS.

## 2.2 Genotoxicidade do mercúrio

A forma orgânica metilmercúrio (MeHg) é altamente tóxica, possuindo fácil penetração nas membranas biológicas devido sua característica lipossolúvel, distribuindo-se no organismo em cerca de 5 dias, podendo atravessar a barreira hematocefálica e concentrando-se no tecido nervoso (AZEVEDO, 2003).

No entanto, o efeito genotóxico do metilmercúrio pode estar associado a sua ligação com o fuso mitótico (AZEVEDO, 2003). Verschaeve et al. (1985) demonstraram alterações na segregação cromossômica após exposições a baixas concentrações de mercúrio. Em outro estudo realizado com 51 pescadores expostos a alimentos contaminados com mercúrio foi demonstrada uma correlação positiva entre a frequência de micronúcleos e a concentração de mercúrio total no sangue (FRANCHI, 1994 *apud* CRESPO-LOPES et al., 2009).

No Brasil há poucos relatos sobre a avaliação de efeitos genotóxicos do mercúrio em peixes. Vicari (2012) realizou um bioensaio para avaliar o efeito genotóxico de metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* exposta artificialmente por via trófica. Os resultados não mostraram diferença na frequência de micronúcleo entre o grupo controle e os grupos expostos, porém evidenciaram diferença significativa entre os grupos, por meio do ensaio cometa. Porto et al. (2005) por meio do teste de micronúcleo, demonstrou que a frequência média de micronúcleos observados em *Prochilodus nigricans* (detritívoro), *Mylossoma duriventre* (onívoro) e *Hoplias malabaricus* (carnívoro) do rio Madeira (região poluída por mercúrio) foram significativamente maiores do que nas populações do rio Solimões (região não poluída por mercúrio).

Um estudo realizado por Ferreira (2015) avaliou o efeito genotóxico de metais pesados em *Hoplias malabaricus* nos tributários do rio Negro e rio Solimões, identificando altas concentrações de mercúrio no músculo de peixes, ultrapassando a recomendação da legislação brasileira em apenas uma área de amostragem da bacia do rio Negro. Também foi observado que a ocorrência de micronúcleos e alterações nucleares foi significativamente maior nos

peixes de tributários do rio Negro em comparação com os da bacia do rio Solimões-Amazonas.

A indução de micronúcleos pelo mercúrio possivelmente ocorre pela ligação deste metal ao grupamento sulfidril (-SH) composto por proteínas plasmáticas e tecido, facilitando a distribuição no organismo (MALAQUIAS, 2015). O mercúrio ao se ligar ao grupamento sulfidril da tubulina, subunidade estrutural dos microtubulos na organização citoplasmática, poderá prejudicar eventos envolvidos no movimento celular, formação do fuso mitótico, divisão nuclear e segregação cromossômica, cuja genotoxicidade cromossômica afetará o comprometimento funcional dos microtúbulos, levando a perturbações na distribuição de cromossomos. Este processo poderá gerar problemas na segregação de cromossomos durante a mitose, impedindo a translocação do cromossomo e eventualmente, levar à formação de micronúcleos (CRESPO-LOPEZ et al., 2009).

A presença de micronúcleos e alterações nucleares pode ocorrer espontaneamente como subprodutos de processos celulares normais ou induzidas por mutágenos, sendo indicativo de quebras e/ou distúrbios no fuso mitótico (SILVA et al., 2003). Falhas no processo de divisão celular podem ocorrer naturalmente, mesmo em frequências reduzidas, e devido a essas falhas, o sistema celular tem a capacidade de detectar e corrigir erros que ocorrem no DNA (SILVA et al., 2003). Esses sistemas eventualmente falham e algumas lesões podem alterar o código genético, causando mutações com efeitos deletérios (RIBEIRO et al., 2003). Danos ao genoma têm uma relação direta com a ocorrência de distúrbios na proliferação celular, podendo conduzir eventualmente, a processos de carcinogênese e teratogênese (MALAQUIAS, 2015).

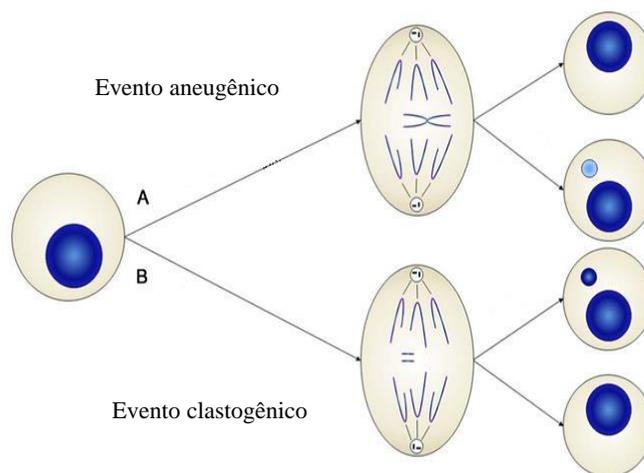
### **2.3 Teste de micronúcleo e anomalias nucleares eritrocitárias**

O Teste de Micronúcleo (TMN) foi descrito pela primeira vez por Schmid (1975), sendo desenvolvido para células da medula óssea de camundongos e, posteriormente, adaptado por Hoofman e Raat (1982) para estudos em peixes, conhecido como teste de micronúcleo píceo (TMN). O TMN é o principal teste de genotoxicidade recomendado por várias agências regulatórias pelo mundo com o propósito de identificar substâncias que causam efeitos clastogênicos (quebra cromossômica) e aneugênicos (perdas de cromossomos devido a erro de segregação durante a divisão celular) (MAISTRO, 2014).

O fundamento do teste é baseado na formação de micronúcleos (MN) (Figura 01), que são pequenos corpos destacados do núcleo principal e que apresentam material genético de

cromossomos inteiros e/ou seus fragmentos (RIBEIRO et al., 2003; SILVA et al., 2003). Também conhecido na hematologia como corpúsculos de Howell-Jolly (MAISTRO, 2014).

Agentes que possuem potencial aneugênico conseguem interferir na formação do aparelho de fuso mitótico durante a divisão celular, provocando o retardo de cromossomos inteiros durante a anáfase, e no final sendo deixados de fora do núcleo da célula filha. Assim, células-filhas provavelmente levariam micronúcleos contendo cromossomos inteiros. Por outro lado, agentes que possuem potencial clastogênico induzem micronúcleos quebrando a dupla hélice do DNA e formando assim fragmentos acêntricos. Estes fragmentos são incapazes de aderir às fibras do fuso e, portanto, são deixados para trás durante a mitose (TERRADAS et al., 2010). Para que o micronúcleo seja visualizado é necessário que ocorra uma divisão celular, independente do dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, após a exposição ao agente mutagênico, os danos ao DNA serão expressos em micronúcleo após um ciclo de divisão celular (SILVA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003).

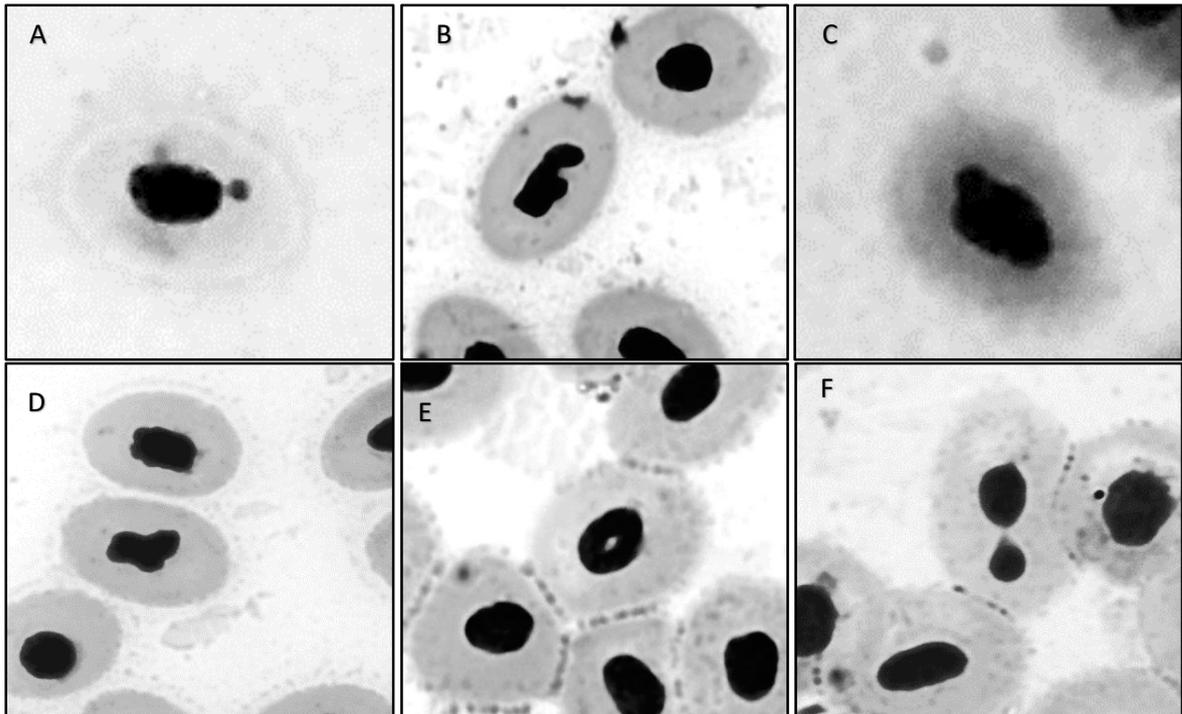


**Figura 01:** Formação de micronúcleo em célula mononucleada. A) evento aneugênico - um cromossomo duplicado não segregado durante a anáfase origina um micronúcleo em uma das células filhas; B) evento clastogênico - um fragmento cromossômico acêntrico não segregado em anáfase resulta em micronúcleo em uma célula filha (Fonte: Terradas et al., 2010).

A identificação dos micronúcleos está relacionada ao seu tamanho, forma e coloração (RIBEIRO et al, 2003). Os micronúcleos apresentam uma estrutura circular ou oval, com a mesma refringência e destacadas do núcleo principal. Seu tamanho corresponde entre 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula. No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, a proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Por outro lado, além da formação de micronúcleos pode haver a formação de outras alterações induzidas por poluentes, conhecidas como Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE). O processo de formação dessas alterações não é totalmente compreendido, mas sugere-se que ocorra quando uma parte do material genético fica atrasada no ciclo celular, fazendo com que o núcleo não seja oval e apresente saliências em sua cromatina (BOMBAIL et al., 2001). Essas anomalias nucleares (Figura 02) foram descritas por Carrasco et al. (1990) e Unbamani e Mohankumar (2011) como:

- ✓ **Blebbled:** núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal;
- ✓ **Lobed:** núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os blebbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas;
- ✓ **Notched:** núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear;
- ✓ **Vacuoled:** núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- ✓ **Binucleate:** célula que apresenta dois núcleos.



**Figura 2:** Micronúcleos e alterações nucleares eritrocitárias de *Hoplias malabaricus*. A) Micronúcleo; B) Notched; C) Blebbed; D) Lobed; E) Vacuolated; F) Binucleate. Fonte: LGBio-UFOPA.

## 2.4 Ensaio cometa

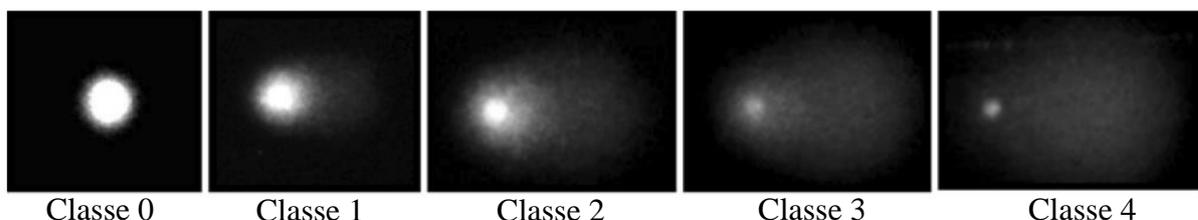
O Ensaio Cometa (EC), ou Técnica de Eletroforese Celular em microgel, do inglês *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) é uma metodologia que permite a detecção de danos e reparo do DNA em células individualizadas (SINGH et al., 1988). O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que podem resultar em mutações. Vale ressaltar que, diferente das mutações, as lesões no material genético detectadas neste teste são passíveis de correções (RIBEIRO et al., 2003). O EC é um teste frequentemente utilizado em ensaios de genotoxicidade, por ser um método rápido, com baixo custo e confiável (BRIANEZI et al., 2009).

O princípio básico da técnica é baseado no englobamento das células em gel de agarose com tratamento alcalino, posteriormente submetido a uma corrente elétrica (eletroforese). Como o DNA possui carga negativa, fragmentos de DNA livre, resultantes de quebras, irão migrar para fora do núcleo. As células que não tiverem DNA rompido ou quebrado irão apresentar um núcleo redondo, sendo caracterizada como normais. Por outro lado, as células lesionadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (SILVA, 2007; RIBEIRO et al, 2003).

A utilização da solução de lise é fundamental para remoção de conteúdos celulares, sem interferir no material genético. As lâminas são colocadas em solução tampão de eletroforese, quanto maior o tempo de exposição nesta em solução alcalina ( $\text{pH} > 13$ ), maior será o relaxamento das moléculas de DNA a partir dos pontos de quebra das fitas (SINGH e STEPHENS, 1997 *apud* RIBEIRO et al., 2003). Portanto, variações de pH da solução de lise e da eletroforese, podem ser parte crucial do teste, influenciando o tipo de dano a ser visualizado, modulando a qualidade e quantidade do DNA na cauda de cada cometa. Sob condições neutras, apresenta quebras de fita duplas e ligações cruzadas. Em condições alcalinas ( $\text{pH} 12,1-12,5$ ), apresenta quebras de fita dupla e simples, sítios incompletos de reparo e ligações cruzada; e em condições altamente alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ) apresenta, além dos danos citados anteriormente, também são detectados sítios álcali-lábeis e sítios abásicos (RIBEIRO et al., 2003).

Para avaliar o nível de danos ao DNA, os cometas são classificados em classes, de acordo com a relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelo DNA em migração (figura 03) (SILVA, 2007; AZQUETA e COLLINS, 2014):

- **Cometa classe 0:** cometas com nucleóides intactos, sem cauda;
- **Cometa classe 1:** cometas com pequenos danos, mas com cauda menor que o diâmetro do nucleóide;
- **Cometa classe 2:** cometas com danos maiores, com cauda de tamanho 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide;
- **Cometa classe 3:** cometas com núcleos que apresentam cauda 3 vezes maior que o diâmetro do nucleóide;
- **Cometa classe 4:** cometas com danos altamente danificados, com quase todo o DNA na cauda.



**Figura 03:** Classificação visual dos níveis de fragmentação do DNA, segundo o grau de lesão; Classe 0 à classe 4. (AZQUETA E COLLINS, 2014).

Atualmente, o ensaio cometa é amplamente usado como ensaio de genotoxicidade de produtos industriais, farmacêuticos e agroquímicos, para detectar danos e reparos do DNA em células individuais (BRIANEZI et al, 2009). As principais limitações deste teste são: a) não é um teste de mutagenicidade, pois o dano pode ser reparado; b) por ser muito sensível, necessita ter controles bem estabelecidos para análise das conclusões; c) o tempo decorrido entre exposição ao mutágeno e a preparação das lâminas, até a lise, deve ser curto, pois o reparo começa imediatamente (SILVA et al, 2003).

Contudo, o EC tem se mostrado uma ferramenta imprescindível em programas de biomonitoramento ambiental através do uso de organismos aquáticos, sendo capaz de revelar um aumento no número de fragmentos de DNA que sofreram quebras devido a exposição por algum poluente (ROCHA, 2009; AZQUETA e COLLINS, 2013).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de danos genotóxicos e determinar a bioacumulação de mercúrio em *Hoplias malabaricus* nativos em duas regiões na bacia do rio Tapajós.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de micronúcleos e de anomalias nucleares em eritrócitos de *Hoplias malabaricus* do rio Tapajós, nas regiões de Santarém e do garimpo Creporizão;
- Avaliar o nível de lesões no DNA em eritrócitos de *Hoplias malabaricus* do rio Tapajós, nas regiões de Santarém e do garimpo Creporizão;
- Investigar uma possível correlação entre os danos genotóxicos e a exposição de *Hoplias malabaricus* em ambientes possivelmente impactados por mercúrio, nas regiões de Santarém e do garimpo Creporizão;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de coleta e amostragem

Foram utilizados peixes da espécie *Hoplias malabaricus* (traíra) (Figura 04). Esta espécie foi selecionada por ter uma dieta piscívora, estando sujeita ao processo de bioacumulação e também por serem itens comuns na dieta das populações locais.

As coletas dos peixes ocorreram em duas regiões da bacia do rio Tapajos: área 1) comunidade garimpeira do Creporizão, rio Crepori, município de Itaituba; área 2) no Lago Juá, situado na margem direita do rio Tapajós, município de Santarém (Figura 05).



**Figura 04:** Exemplar de *Hoplias malabaricus*. Foto: Laboratório de Genética e Biodiversidade – LGBio-UFOPA.

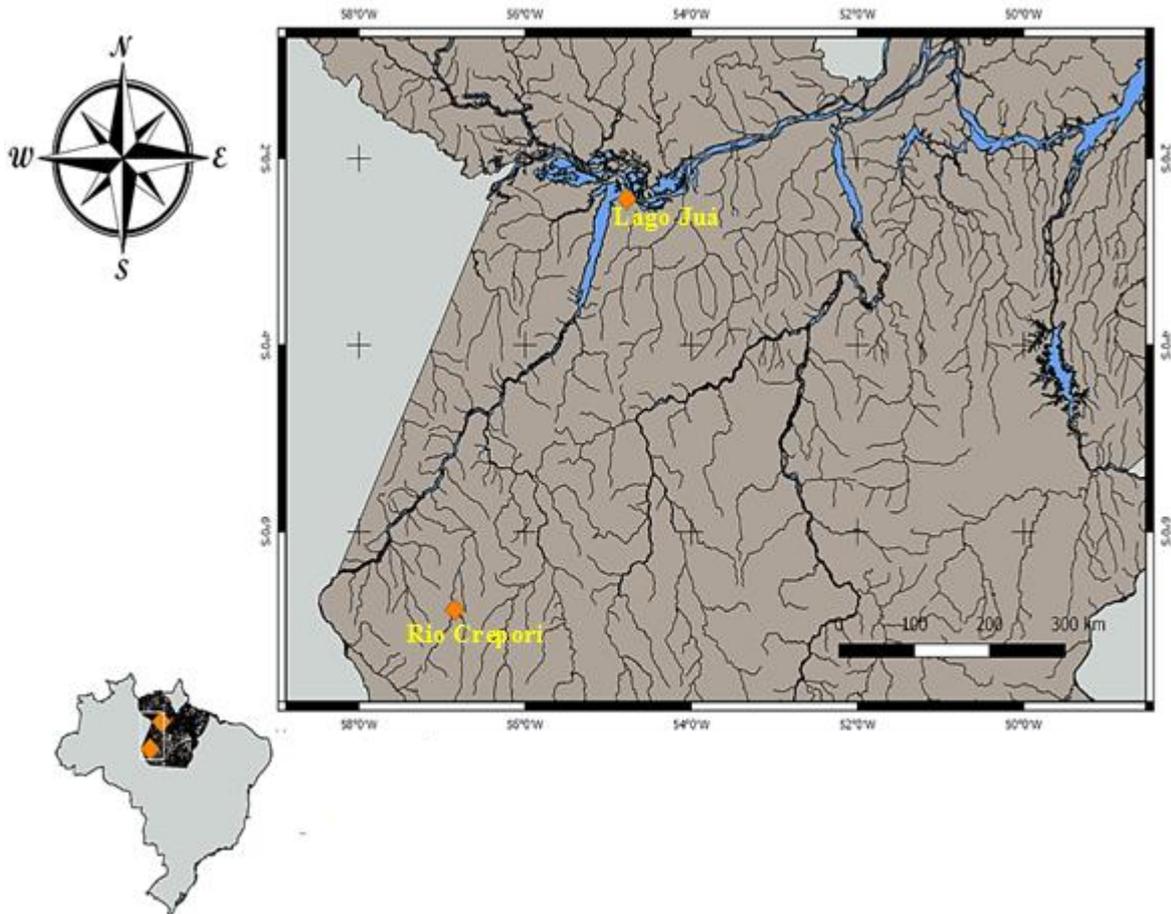
Os peixes foram capturados por pescadores locais por meio de tarrafas, malhadeiras e linha e anzol. Foram incluídos nesta pesquisa, somente exemplares com o comprimento padrão igual ou maior que 15 cm, sem distinção de sexo. Após a captura, os peixes foram colocados em caixas plásticas de 50 litros com água do próprio ambiente de captura, oxigenada artificialmente com minicompressores de aquários. As amostras de sangue foram obtidas por punção intrabranquial utilizando-se seringa previamente heparinizada. Parte da amostra de sangue foi transferida para microtubos de 0,5 mL, mantida refrigerada e protegida da luz para o ensaio cometa. Para o teste de micronúcleo, imediatamente após a coleta, foi realizado esfregaço com cerca de 5 $\mu$ L de sangue, em uma lâmina limpa. Posteriormente, os peixes foram anestesiados e mortos por imersão em água contendo dose letal de eugenol, conforme procedimento aprovado por Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará (Anexo 01).

Foi retirado cerca de 01 grama de músculo branco de cada peixe e acondicionados em frascos de polietileno e armazenadas à -20°C para a posterior análise dos níveis de mercúrio

total, no Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LabBBEX) da Ufopa. Os exemplares foram fotografados, sendo também registrado o peso e o comprimento total. Em seguida, os mesmos foram preservados em formol 10% e conservados em Etanol 70% para posterior deposição em Coleção Ictiológica. A análise descritiva segue na tabela 01:

**Tabela 01:** Descrição dos dados amostrais por localidades. n= número total de peixes coletados; CP= comprimento padrão em centímetros.

<b>Peixes da bacia do Rio Tapajós</b>		
<b>Identificação</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>CP(cm)</b>
Lago Juá, Região de Santarém (n=10)		
Jua_XVI_13	221	27
Jua_XVI_14	382	33
Jua_XVI_17	182	25
Jua_XVI_19	235	26.6
Jua_XVI_20	374	43
Jua_XVI_21	261	29
Jua_XVI_22	264	29
Jua_XVI_23	163	24.5
Jua_XVI_24	296	29.6
Jua_XVI_25	248	29
Rio Crepori, Região de Itaituba (n=15)		
CRP_04	100	17.0
CRP_05	60	14.8
CRP_07	330	26.5
CRP_08	440	29.0
CRP_09	413	28.2
CRP_10	154	20.5
CRP_11	241	24.0
CRP_12	148	19.8
CRP_13	206	22.5
CRP_14	177	21.0
CRP_15	265	24.0
CRP_16	165	20.5
CRP_17	190	21.5
CRP_19	66	16.4
CRP_20	74	16.4



**Figura 05:** Mapa do estado do Pará mostrando a localização dos pontos de coleta de *Hoplias malabaricus* no Lago Juá (rio Tapajós) e no garimpo Creporizão (rio Crepori). Elaborado com o software livre QGIS.

Abaixo são mostradas imagens das localidades estudadas: lago Juá, na figura 06 e o rio Crepori, figura 07.



**Figura 06:** Lago Juá, rio Tapajós, região do município de Santarém. **Fonte:** LGBio-UFOPA.



**Figura 07:** Rio Crepori, com vista parcial da comunidade do Creporizão. **Fonte:** LGBio-UFOPA.

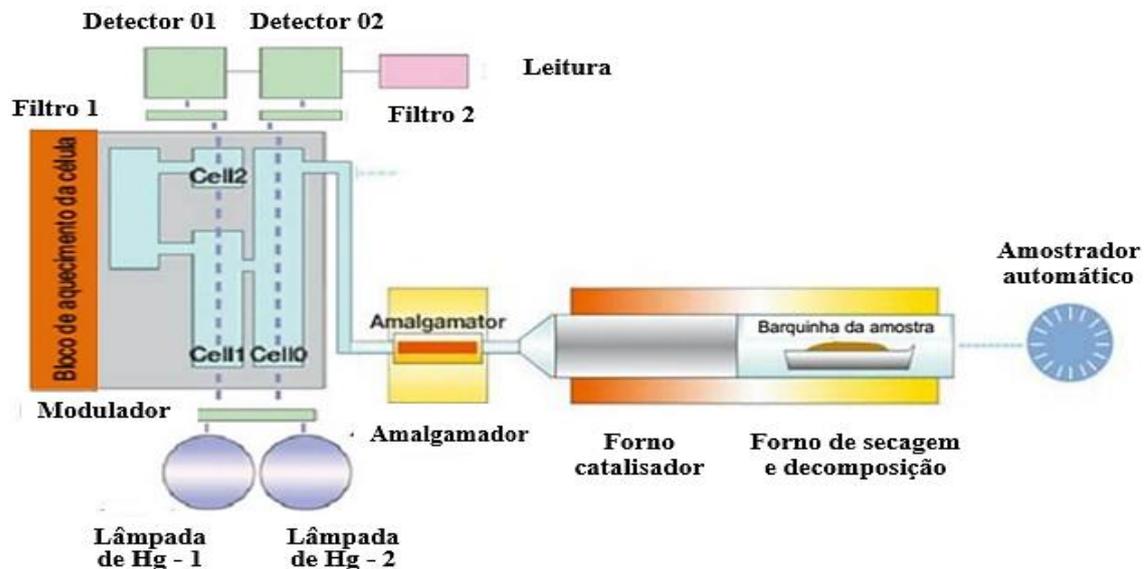
#### 4.2 Determinação de mercúrio total

Para a determinação de Hg Total, foi utilizado o método 7473 preconizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA- *United States Environmental Protection Agency*), que consiste na determinação direta de Hg Total (inorgânico e orgânico) sem o preparo da amostra. As amostras foram analisadas utilizando o equipamento de espectrofotometria com absorção atômica modelo DMA-80 Milestone-Itália (Figura 08), que possibilita a determinação de Hg Total em amostras sólidas e líquidas através de princípios de decomposição térmica, amalgamação e absorção atômica, apresentando limite de detecção de 0,0015 ng/Hg (DMA-80 DIRECT MERCURY ANALYZER, 2009).



**Figura 08:** Equipamento DMA-80. **Fonte:** DMA-80 Direct Mercury Analyzer (2009)

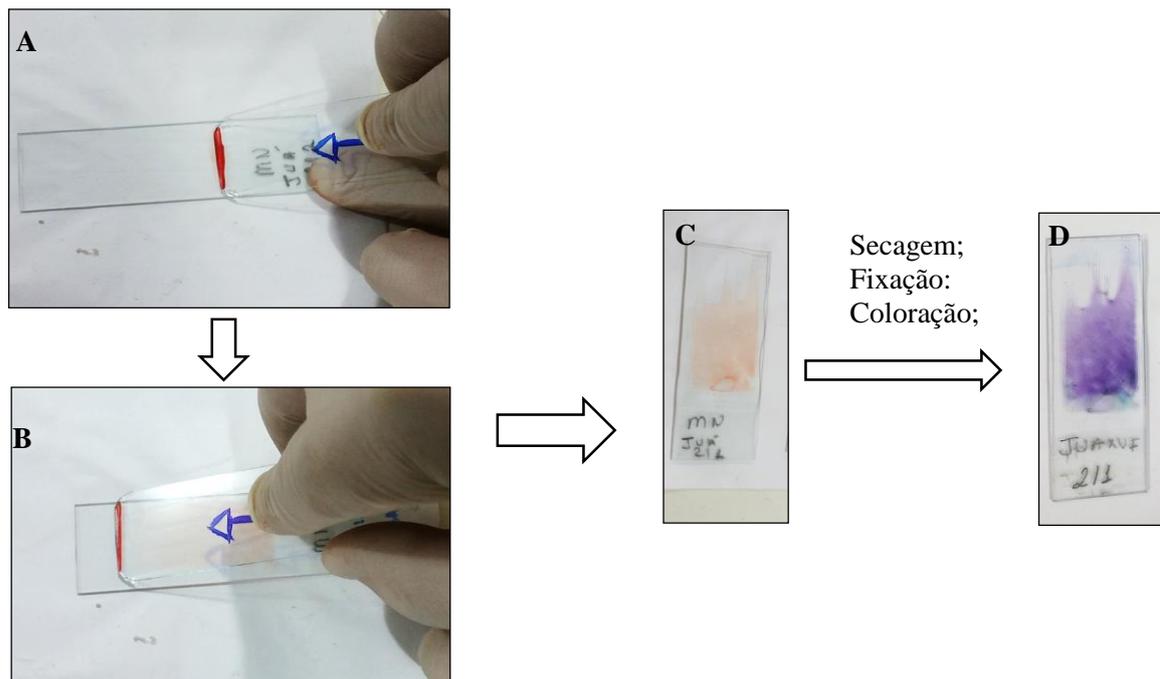
A metodologia (Figura 09) consiste em transferir uma amostra, sólida ou líquida, previamente pesada em balança analítica, para uma barca de quartzo ou níquel. As amostras passam pelo processo de secagem e decomposição térmica na câmara de secagem, onde nos primeiros 10 segundos a amostra sofrerá aquecimento com aumento de temperatura de aproximadamente 21°C até 550°C, permanecendo nesta temperatura por 60 segundos até que ocorra a completa volatilização do mercúrio através da catalise. O Hg volatilizado é catalisado por fluxo de oxigênio de 200 mL/min., segue para a célula de amalgamação que é rapidamente aquecida chegando a uma temperatura de 750°C liberando o Hg em estado de vapor. O Hg é então transportado pelo fluxo de oxigênio até a célula de absorção que faz a detecção do metal por absorção atômica a um comprimento de onda de 253,7nm.



**Figura 09:** Representação do funcionamento do equipamento DMA-80. Fonte: NORTJE, 2010.

#### 4.3 Teste de Micronúcleo e Anomalias Nucleares Eritrocitárias de peixes

Foram preparadas duas lâminas com esfregaço sanguíneo para cada exemplar. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, por 24 horas. Em seguida, as lâminas foram fixadas em Metanol por 10 minutos e deixadas secar a temperatura ambiente de um dia para outro (Figura 10).



**Figura 10:** Resumo das etapas que integram o teste de micronúcleo: esfregaço sanguíneo, lâminas antes e após a coloração de giemsa. A) Posicionamento da lâmina extensora no ângulo de 45° na amostra de sangue; B) Movimento da distensão sanguínea; C) Lâmina antes da coloração; D) Lâmina após a coloração. Fotos: LGBio-UFOPA.

Posteriormente as lâminas foram coradas com Giemsa a 5%, diluída em tampão fostato a pH 6,8, por 10 minutos. Após o período de coloração, as lâminas foram lavadas com água corrente e secas a temperatura ambiente. Os micronúcleos foram analisados em microscópio óptico com aumento de 1000X, onde foram contados 2000 eritrócitos em cada lâmina. Para identificação de micronúcleo, considerou-se como uma estrutura redonda não refringente, com cerca de até 1/10 – 1/30 da área do núcleo e separadas do núcleo do eritrócito (AL-SABTI e METCALFE, 1995). As ANE também foram registradas nas mesmas lâminas preparadas para análise de micronúcleos e anotadas em separado (CARRASCO et al., 1990; UNBAMANI e MOHANKUMAR, 2011). A frequência de micronúcleos e ANE foram calculadas utilizando a seguinte fórmula:

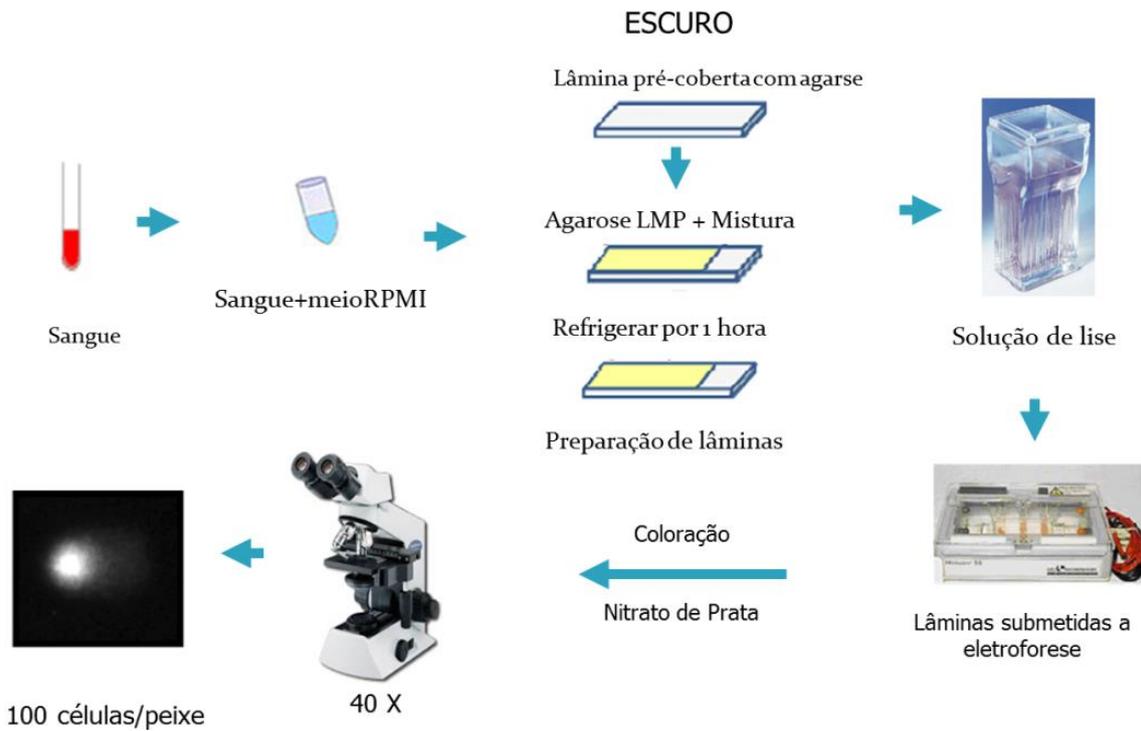
$$\text{Frequência de micronúcleo (\%)} = \frac{\text{Número de micronúcleos}}{2000} \times 100$$

#### 4.4 Ensaio Cometa em eritrócitos de peixes

Nesta análise adotamos a técnica descrita por Silva (2007). Após a coleta, cerca de 10 $\mu$ L de sangue foi misturado com 600  $\mu$ L de meio RPMI. Em seguida, foi retirado 10 $\mu$ l da mistura (sangue + RPMI) e acrescentado 95  $\mu$ l de agarose *low melting* e estendida imediatamente na lâmina (total de 105  $\mu$ L) com pré-cobertura de agarose *normal melting*, então sendo encoberta com uma lamínula (tamanho 32X60mm) deixando espalhar a solução até solidificar as lâminas na geladeira, por cerca de 1 hora. Após este procedimento, as lamínulas foram retiradas e colocadas em solução de lise (35,6mL de Solução de lise + 0,4mL de TritonX-100 + 4mL de DMSO) com pH 10.

Após 24 a 48hrs, as lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas em cuba de eletroforese (horizontal – modelo LCH-20x25), acrescida de tampão de eletroforese (30ml de Solução A – 200g NaOH/H<sub>2</sub>O destilada + 5ml de Solução B – 14,89g de EDTA, pH >13). As lâminas permaneceram imersas no tampão por 20 a 30 minutos, o que é importante para relaxamento das fibras cromatínicas e posterior diferenciação das classes de lesão. Em seguida, procedeu-se a eletroforese a 25V e 300 mA por 20 minutos, tendo a cuba de eletroforese resfriada dentro de um freezer -20°C ou caixa de isopor com gelo. Esta etapa da técnica foi realizada com as luzes do laboratório apagadas, a fim de se evitar danos adicionais eventualmente provocados pela iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas por três vezes durante 5 minutos com tampão neutralizador (Tris Hidroximetano). Após este procedimento, foram lavadas com água destilada e secas por 1,5 $\pm$ 2hs, na estufa à 37°C. Subsequentemente, as lâminas foram fixadas por 10 minutos em solução fixadora (150g de Ácido Tricloroacético + 50g de Sulfato de Zinco heptahidratado (5%) + 50ml de glicerol) e lavadas 3 vezes em água destilada e secas por 1,5 $\pm$ 2hs em estufa à 37°C (Figura 11)

As lâminas foram hidratadas por 5 minutos com água destilada e coradas por aproximadamente 20 minutos em solução de coloração com Nitrato de Prata, em banho maria a 37°C (mergulhadas nas soluções de coloração – 52,8ml de solução A: 25g de Carbonato de Sódio (5%) e 27,2ml de solução B: constituída de Nitrato de prata (0,1%)). Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas com água destilada (3X) e expostas à solução stop de coloração (ácido acético), por 15 minutos, em seguida foram lavadas com água destilada (3X) e secas em temperatura ambiente, para posterior observação ao microscópio óptico com aumento de 400X.



**Figura 11:** Resumo das etapas que integram o ensaio cometa. **Fonte:** Rocha, 2009, adaptador por Christian Diniz (2016).

Foram analisadas 50 células em cada lâmina, totalizando 100 células para cada animal, classificando-se, visualmente, de acordo com o comprimento da cauda em relação à cabeça do nucleóides, sendo classificados em classes de danos de 0 a 4. O índice de danos ao DNA foi estipulado através do valor de SCORE/ID visual, calculado pelo número de cometas em cada classe multiplicado pelo valor da classe, de acordo com a fórmula abaixo (AZQUETA e COLLINS, 2014):

$$ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$$

Onde  $n$  é o número de cometas em cada classe.

ID, corresponde ao índice de dano no DNA

#### 4.5 Análise Estatística

Os dados foram organizados em planilhas e processados com auxílio do software Biostat v.3.0 (AYRES et al., 2003). Para análise de correlação, foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Para os dados paramétricos, foi utilizado o Teste  $t$ , comparando os dois grupos do estudo. Para os dados não-paramétricos, foi utilizado o teste Mann-Whitney. Foram considerados os valores de  $P < 0.05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma avaliação geral foi realizado primeiramente uma análise descritiva das duas localidades: Lago Juá, Rio Tapajós e garimpo Creporizão no Rio Crepori (tabela 02).

**Tabela 02:** Análise descritiva das amostras de *Hoplias malabaricus* do lago Juá e rio Crepori. CP= Comprimento padrão em centímetros; %MN= Frequência de micronúcleos; %ANE= Frequência total de anomalias nucleares eritrocitárias.

Identificação	Peso (g)	CP	%MN	%ANE	SCORE/ID	Hg Total (mg.kg <sup>-1</sup> )
Jua_XVI_13	221	27	0	0.5	61	0.53
Jua_XVI_14	382	33	0	0.4	50	0.28
Jua_XVI_17	182	25	0.1	0.55	35	0.36
Jua_XVI_19	235	26.6	0	1.25	53	0.34
Jua_XVI_20	374	43	0.2	0.8	60	0.64
Jua_XVI_21	261	29	0.05	0.55	47	0.50
Jua_XVI_22	264	29	0	0.65	70	0.48
Jua_XVI_23	163	24.5	0.1	0.35	61	0.23
Jua_XVI_24	296	29.6	0.05	0.5	106	0.42
Jua_XVI_25	248	29	0	0.8	130	0.60
CRP_04	100	17.0	0.1	0.65	128	0.43
CRP_05	60	14.8	0.05	0.5	114	1.23
CRP_07	330	26.5	0.05	0.25	148	1.35
CRP_08	440	29.0	0.05	0.6	133	1.81
CRP_09	413	28.2	0.05	0.6	120	2.02
CRP_10	154	20.5	0.2	0.55	136	0.96
CRP_11	241	24.0	0.15	0.7	183	1.66
CRP_12	148	19.8	0.1	0.65	187	2.19
CRP_13	206	22.5	0.05	0.4	102	2.12
CRP_14	177	21.0	0.05	0.55	172	2.05
CRP_15	265	24.0	0.15	0.85	178	0.65
CRP_16	165	20.5	0.05	0.2	185	0.39
CRP_17	190	21.5	0.15	0.6	199	0.50
CRP_19	66	16.4	0.1	0.75	217	0.78
CRP_20	74	16.4	0.05	0.65	152	0.73

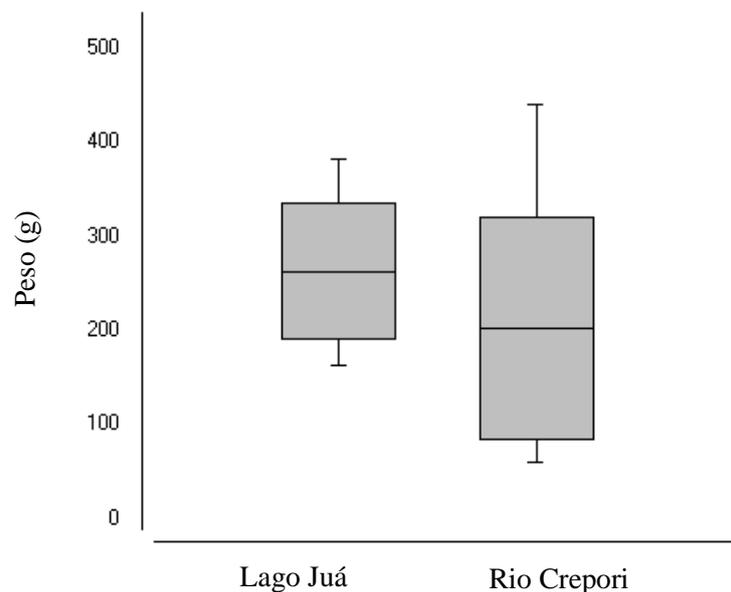
Na obtenção de uma análise global dos dados que poderiam influenciar na análise de mercúrio e genotoxicidade, buscou-se analisar primeiramente os dados de peso e comprimento dos peixes para verificar se apresentavam homocedasticidade.

Uma análise comparativa das medidas de peso e comprimento foi realizada entre as amostras de *Hoplias malabaricus* do rio Tapajós na região de Santarém e do rio Crepori, região de Itaituba. Os resultados descritivos das amostras são apresentados na Tabela 03, abaixo:

**Tabela 03:** Análise descritiva de peso e comprimento de *Hoplias malabaricus* da bacia do Rio Tapajós. N= número de peixes analisados.

Amostras	Média	Desvio Padrão
Lago Juá (n=10)		
Peso	262.6	72.1
Comprimento	29.5	5.3
Mercúrio	0.46	0.12
Rio Crepori (n=15)		
Peso	201.9	118.2
Comprimento	21.3	4.3
Mercúrio	1.26	0.66

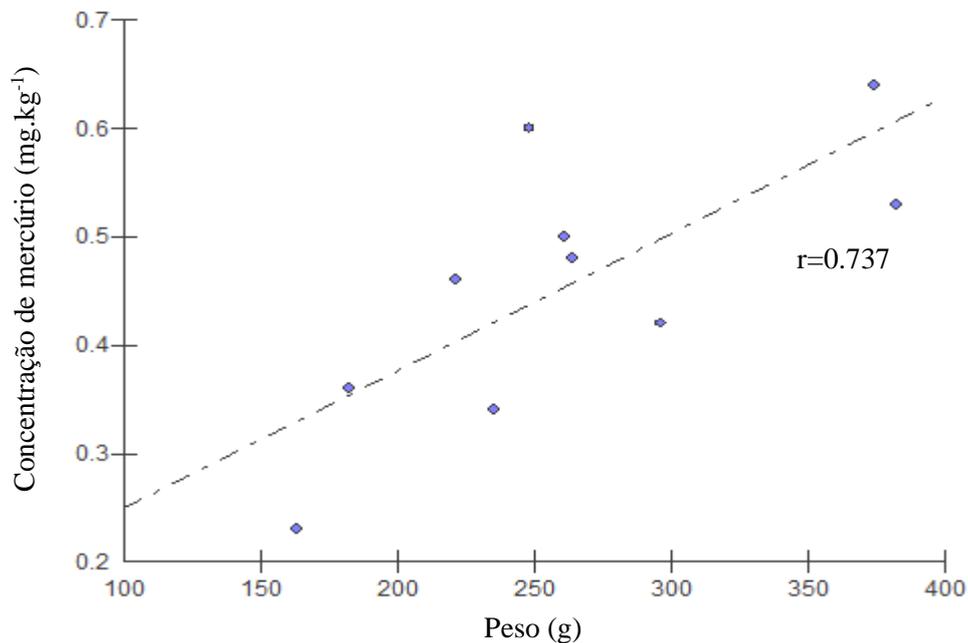
Nesta análise verificamos não ocorrer diferença significativa na média de peso corporal entre as duas localidades ( $p=0.161$ ), o que poderia influenciar a comparação dos níveis de mercúrio (figura 12).



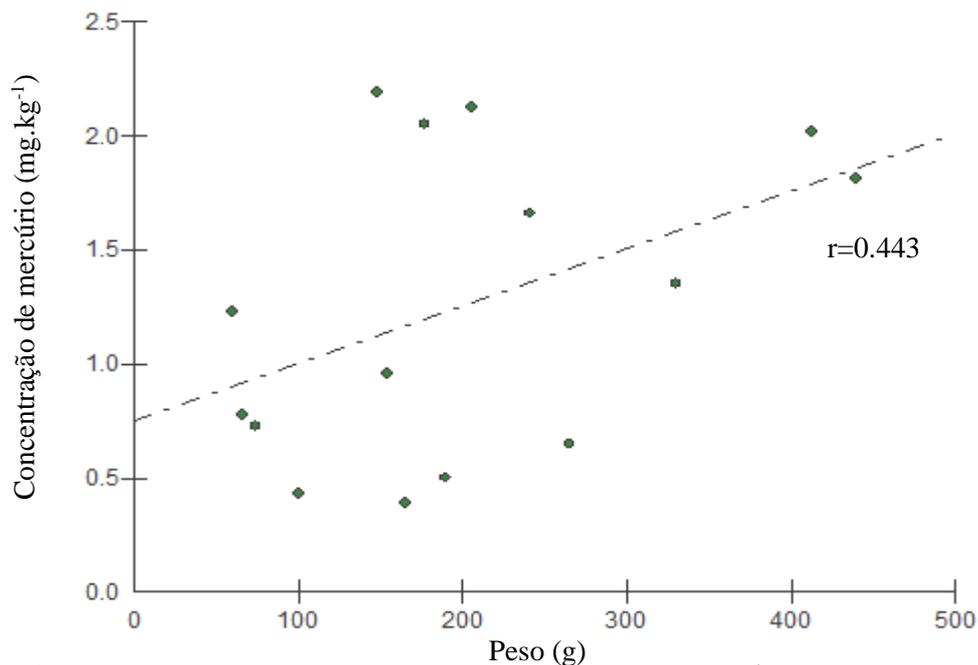
**Figura 12:** Variação no Peso de *Hoplias malabaricus* da região de Santarém (Rio Tapajós) e Itaituba (Rio Crepori), em que não a diferença significativa entre as duas localidades ( $p=0.161$ ).

Foi feito a análise de correlação linear de Pearson a fim de verificar a relação entre o peso com os níveis de mercúrio. Nota-se uma correlação positiva entre a concentração de mercúrio e peso corporal de *Hoplias malabaricus* do Lago Juá (rio Tapajós) ( $r=0.737$ ;

$p=0.0148$ ) (Figura 13). Entretanto, não foi encontrada correlação significativa entre os níveis de mercúrio e peso corporal dos peixes do rio Crepori ( $r=0.443$ ;  $p=0.098$ ) (Figura 14).



**Figura 13:** Correlação positiva entre a concentração de mercúrio ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) em tecido muscular com o peso corporal de *Hoplias malabaricus* do lago Juá.



**Figura 14:** Correlação positiva entre a concentração de mercúrio ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) em tecido muscular com o peso corporal de *Hoplias malabaricus* do rio Crepori.

A concentração de mercúrio aumenta com a idade e o tamanho dos peixes, isto é, quanto maior o peixe maior poderá ser o seu conteúdo de mercúrio (WASSERMAN et al, 2001). Os dados obtidos mostram que houve uma correlação entre massa corporal com os níveis de mercúrio para a espécie *Hoplias malabaricus* do lago Juá, rio Tapajós, fenômeno

observado em estudos com outras espécies de peixes, como o surubim e dourada (DOS SANTOS et al, 2000). Porém, esse evento parece não atuar de forma geral, visto que não foi observada uma correlação positiva nas amostras do rio Crepori.

A amostra do rio Crepori apresentou, em média, o dobro de mercúrio em relação ao lago Juá, o fenômeno ocorrido nesse ambiente pode ter mascarado a correlação entre massa e o nível de mercúrio, isto é, o processo de bioacumulação possa ter atuado diferente, de forma intensa ou mais rápida, nos locais que apresentam altos níveis de mercúrio, até mesmo em peixes pequenos poderiam ter muito mercúrio.

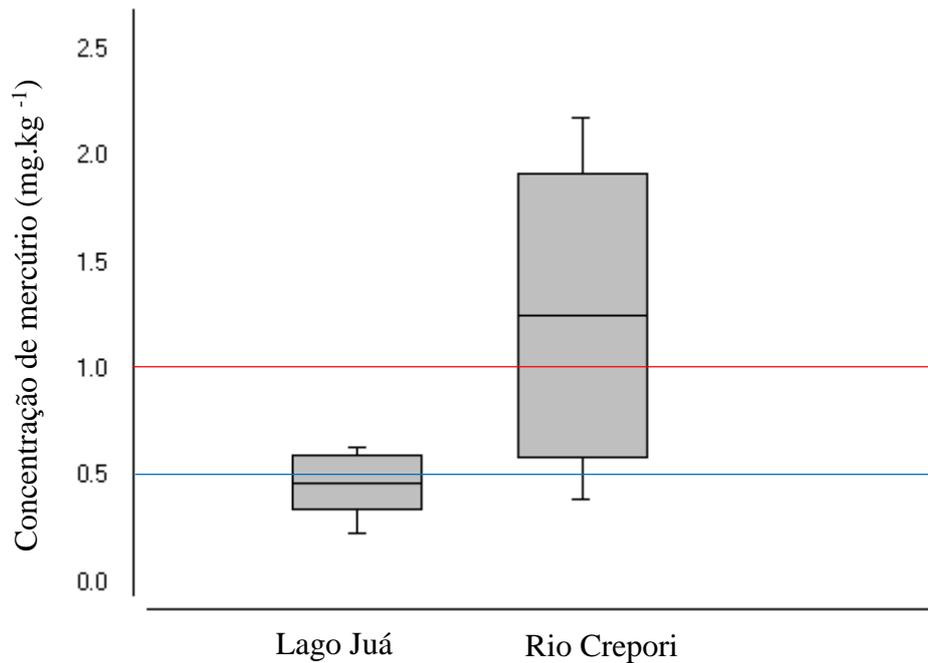
Os dados do lago Juá corroboram com um estudo realizado por Oliveira et al. (2005) no lago Juá (Rio Tapajós), que também evidenciou uma correlação positiva entre os níveis de mercúrio total em função do peso, em uma espécie de peixe de hábito piscívoro, a pescada branca. O lago Juá possui uma quantidade menor de mercúrio em relação ao rio Crepori, foi evidenciada uma forte correlação entre a massa e o nível de mercúrio. Assim, não foi possível demonstrar um real padrão de bioacumulação no rio Crepori, sendo necessários mais estudos para entender esse fenômeno.

Esse resultado é semelhante a um estudo realizado com outras espécies de peixes de hábito piscívoro, não revelando uma correlação entre massa corporal e níveis de mercúrio (ARRIFANO, 2011). A relação da idade, peso e comprimento dos peixes com a bioacumulação do mercúrio não é considerado um processo simples, entretanto, a massa pode ser um fator importante quando o nível de mercúrio for muito alto, visto que, quando as concentrações de mercúrio acumulado no tecido superasse certo limiar, outros fatores poderiam afetar o padrão de bioacumulação do metal, como a espécie de peixe, rota de exposição, tipo de peixe consumido pelos predadores, característica da bacia, entre outros (ARRIFANO, 2011; DA SILVA et al., 2012).

### **5.1 Bioacumulação de Hg Total**

As amostras de *Hoplias malabaricus* do lago Juá (n=10) apresentaram uma concentração média de mercúrio total em músculo branco de  $0.46 \pm 0.12$  mg.kg<sup>-1</sup>. Enquanto que a média de mercúrio da amostra obtida do rio Crepori foi de  $1.26 \pm 0.66$  mg.kg<sup>-1</sup>, mais do que o dobro do observado em peixes do lago Juá. A comparação entre as médias de concentração de mercúrio foi testada pelo teste Mann-Whitney, que revelou diferença

significativa ( $U=16.5$ ;  $P_{(bilateral)}=0.001$ ) (Figura 15). Observou-se que não houve indivíduos com concentração de mercúrio acima do limite estabelecido pela ANVISA, no lago Juá.



**Figura 15:** Media e desvio padrão da concentração de Hg Total em músculo branco de traíra (*Hoplias malabaricus*) proveniente de duas localidades na bacia do Rio Tapajós. A linha vermelha indica o valor limite máximo de Hg Total ( $1.0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) determinado pela ANVISA para peixes piscívoros destinados ao consumo humano. A linha azul indica o valor limite máximo de Hg Total ( $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) determinado pela OMS para peixes destinados ao consumo humano.

Na região de Santarém, especificamente no lago Juá, não existe histórico de exploração de ouro, entretanto, foi encontrada presença de mercúrio nos peixes com valores próximos ao limite estabelecido pela OMS de  $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . A proximidade do lago Juá com a zona urbana de Santarém pode ser um fator adicional para a poluição do lago, visto que algumas atividades antropogênicas nas proximidades do lago Juá poderiam causar modificações ambientais e fluviais.

No presente estudo, não encontramos níveis de mercúrio acima do preconizado pela OMS e ANVISA para espécie de *Hoplias malabaricus* no lago Juá, entretanto, áreas já estudadas no município de Santarém detectaram níveis de mercúrio em peixes de hábito piscívoro, como surubim e tucunaré (LIMA et al., 2000) e, em um estudo mais recente, foi evidenciado níveis de mercúrio acima do preconizado pela OMS e ANVISA, para pescada branca e apapá (BOURDINEAUD et al., 2015) (tabela 04).

**Tabela 04:** Níveis de mercúrio ( $\mu\text{g/g}$ ) em peixes piscívoros de alguns trabalhos realizados na região de Itaituba e Santarém, rio Tapajós.

Peixe	Mercúrio	Local	Autor
<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Pescada branca)	1.44	Santarém	Bourdineaud et al., 2015
<i>Pellona castelnaeana</i> (Apapá)	1.66		
<i>Cichla spp</i> (Tucunaré)	1.80	Itaituba	Arrifano, 2011
<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Pescada branca)	0.53		
<i>Blachyplatystoma flavicans</i> (Dourada)	3.2		
<i>Pseudoblatystoma spp.</i> (Surubim)	0.6		
<i>Cichla spp.</i> (Tucunaré)	0.16	Santarém	Kehrig et al. 2008
<i>Cichla spp.</i> (Tucunaré)	0.89	Itaituba	
<i>Blachyplatystoma flavicans</i> (Dourada)	0.81	Itaituba	Dos Santos et al., 2000
<i>Pseudoblatystoma spp.</i> (Surubim)	0.83		
<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Pescada branca)	0.64		

No rio Crepori, 53% dos peixes tiveram valores de mercúrio acima do limite estabelecido pela ANVISA para consumo humano. Não foi encontrado na literatura trabalhos sobre os níveis de mercúrio nos peixes do Rio Crepori, entretanto, embora o objetivo deste projeto não tenha sido avaliar os fatores responsáveis pela contaminação dos rios e conseqüentemente dos peixes, uma possível explicação para os altos níveis de mercúrio nessa amostra seria a proximidade deste rio com as áreas de garimpo do ouro daquela região.

Neste estudo foi realizado com uma espécie de peixe considerado de hábito piscívoro e, levando em consideração esse aspecto, nossos resultados se mostraram semelhantes a um estudo realizado por Arrifano (2011) que avaliou o risco de consumo de peixe de hábito piscívoro como *Cichla spp* (Tucunaré), *Plagioscion squamosissimus* (Pescada branca), *Blachyplatystoma flavicans* (Dourada), *Pseudoblatystoma corruscan* (Surubim) do mercado de peixes do município de Itaituba, que fica próximo a regiões de garimpo. Nesse estudo as espécies estudadas apresentaram níveis de mercúrio acima do preconizado pela OMS e ANVISA, elucidando que espécies de hábito piscívoro acumulam e biomagnificam esse metal.

Outros trabalhos realizados enfatizaram sobre os riscos do consumo de peixes contaminados por mercúrio na região amazônica. Um estudo com peixes da espécie *Cichla monoculus* no reservatório Samuel, no estado de Rondônia, evidenciou concentrações de mercúrio acima do estabelecido pela OMS (RABITTO, 2011). Porém, utilizando a mesma espécie de peixe do nosso estudo, Da Silva et al. (2012) relataram a bioacumulação de

mercúrio em *Hoplias malabaricus* do reservatório de Samuel, sendo que destes, 18% dos peixes tinham níveis de mercúrio no músculo, excedendo o limite OMS de  $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Comparando com nossos resultados, é possível que a dinâmica do processo bioacumulativo do mercúrio em *Hoplias malabaricus* de reservatórios podem apresentar taxas de mercúrio diferentes quando comparadas com regiões atingidas por garimpos de ouro, visto que os peixes do rio Crepori apresentaram uma taxa de bioacumulação superior ao reservatório de Samuel.

Em nosso estudo foi evidenciado o efeito da bioacumulação e biomagnificação conforme outros estudos na região amazônica (LIMA et al, 2000; ARRIFANO, 2011; DA SILVA et al, 2012; RABITTO, 2011). Entretanto, a maioria dos rios, lagos e reservatórios na bacia amazônica têm níveis de mercúrio que, através de processos de bioacumulação e biomagnificação, tornam difícil a obtenção de um verdadeiro valor de referência para peixes contaminados por mercúrio em condições naturais (DA SILVA et al, 2012).

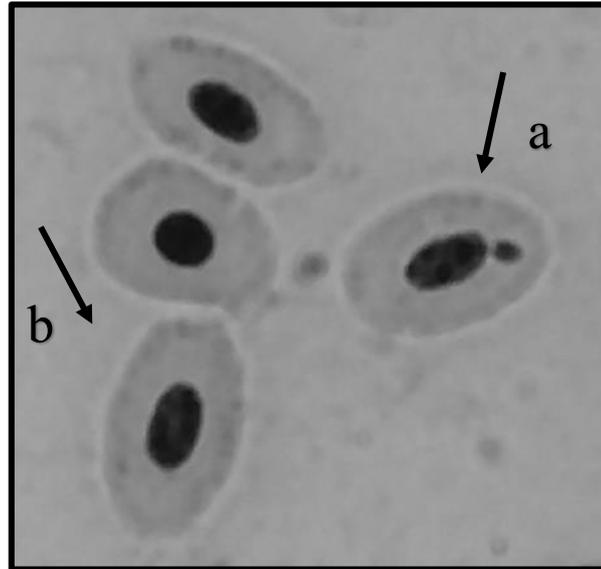
## 5.2 Micronúcleo e Anomalias Nucleares Eritrocitárias

Foi analisado um total de 50.000 eritrócitos de 25 exemplares de *Hoplias malabaricus* provenientes das localidades do Lago Juá (n=10) e do Garimpo Creporizão (n=15). Uma análise comparativa da frequência de micronúcleos foi realizada entre os dois pontos de coletas. Os resultados descritivos das amostras seguem na Tabela 05.

**Tabela 05:** Frequência média de micronúcleos em *Hoplias malabaricus* da região do rio Tapajós. N= número de peixes por localidade; MN= Micronúcleo; EP=Erro padrão.

Localidade	N (amostral)	Nº de células analisadas	MN		EP	Variância	Máx.	Mín.
			Total	Frequência (%)				
Lago Juá	10	20.000	10	0.05	0.02	0.004	0.02	0
Rio Crepori	15	30.000	27	0.09	0.01	0.002	0.2	0.5

Na população do Lago Juá observamos uma frequência média de micronúcleos de  $0.05\% \pm 0.06$ . Por outro lado, na população do rio Crepori, os valores tiveram uma frequência média de  $0.09\% \pm 0.05$ . Na figura 16, é mostrada uma típica célula micronucleada observada em *Hoplias malabaricus* do presente estudo.



**Figura 16:** Eritrócitos de *Hoplias malabaricus* em distensão sanguínea corada por Giemsa. A) uma célula com micronúcleo (seta); b) célula sem alteração (seta)

Para testar uma possível diferença na frequência média de micronúcleos entre as amostras do Lago Juá, região distante das áreas de garimpo de ouro no Tapajós e a amostra coletada no garimpo Creporizão, situado na área de mineração de ouro no município de Itaituba, comparamos as médias pelo teste  $t$  e o resultado não foi significativo ( $p=0.101$ ). O grupo do rio Crepori supostamente deveria ter uma maior frequência de micronúcleos quando comparado com os peixes do lago Juá, devido estar localizado em uma região garimpeira e por ter apresentado uma maior concentração de mercúrio, entretanto, os grupos se comportaram de forma semelhante.

Apesar de não haver diferença estatística entre as localidades estudadas, não significa ausência de efeitos genotóxicos, visto que a presença de micronúcleos é proveniente de um efeito clastogênico e/ou aneugênico. É curioso notar que em nosso estudo foi observado uma baixa frequência de MN e ANE já evidenciado em outros trabalhos (PANTALEÃO et al., 2006; FERRARO, 2009; ROCHA et al, 2011; MELO et al, 2013). No entanto, a frequência espontânea (basal) de MN em peixes é normalmente muito baixa (PANTALEÃO et al., 2006).

Ainda não se tem estudos que avaliem a ocorrência de MN e ANE em condições naturais no rio Tapajós, mas existem alguns estudos já realizados na região amazônica (PORTO et al., 2005; DA SILVA et al., 2012; MELO et al., 2013). Para verificar a genotoxicidade do mercúrio na indução de micronúcleo, é possível encontrar na literatura frequência de micronúcleos nos grupos controle como valores de referência (MELO et al., 2013). Mahboob et al (2014) investigaram a genotoxicidade do mercúrio, por meio do teste de

micronúcleo, em peixes da espécie *Clarias gariepinus* (bagre-africano) com diferentes doses de cloreto de mercúrio em comparação com o grupo controle (não exposto), evidenciando uma maior frequência de micronúcleos a medida que aumentava as doses de cloreto de mercúrio.

Uma explicação para indução de micronúcleos pelo mercúrio é explicada a partir da afinidade do metal com o grupamento sulfidril (-SH) composto em proteínas plasmáticas e tecido, facilitando a distribuição no organismo (MALAQUIAS, 2015). O mercúrio ao se ligar ao grupamento sulfidril da tubulina, subunidade estrutural dos microtubulos na organização citoplasmática, poderá prejudicar eventos envolvidos no movimento celular, formação do fuso mitótico, divisão nuclear e segregação cromossômica, cuja genotoxicidade cromossômica afetará o comprometimento funcional dos microtúbulos, levando a perturbações na distribuição de cromossomos. Este processo poderá gerar problemas na segregação de cromossomos durante a mitose, impedindo a translocação do cromossomo e eventualmente, levar à formação de micronúcleos (CRESPO-LOPEZ et al., 2009).

O nível de dano genotóxico em *Hoplias malabaricus* do rio Tapajós é menor do que o registrado no rio Madeira, que também possui histórico de mineração de ouro (PORTO et al. 2005; FERREIRA, 2015), assim como no Lago Paranoá, ambiente com elevado nível de poluição localizado na cidade de Brasília (GRISÓLIA et al. 2009). Por outro lado, é maior do que o encontrado no rio Solimões (Tabela 06).

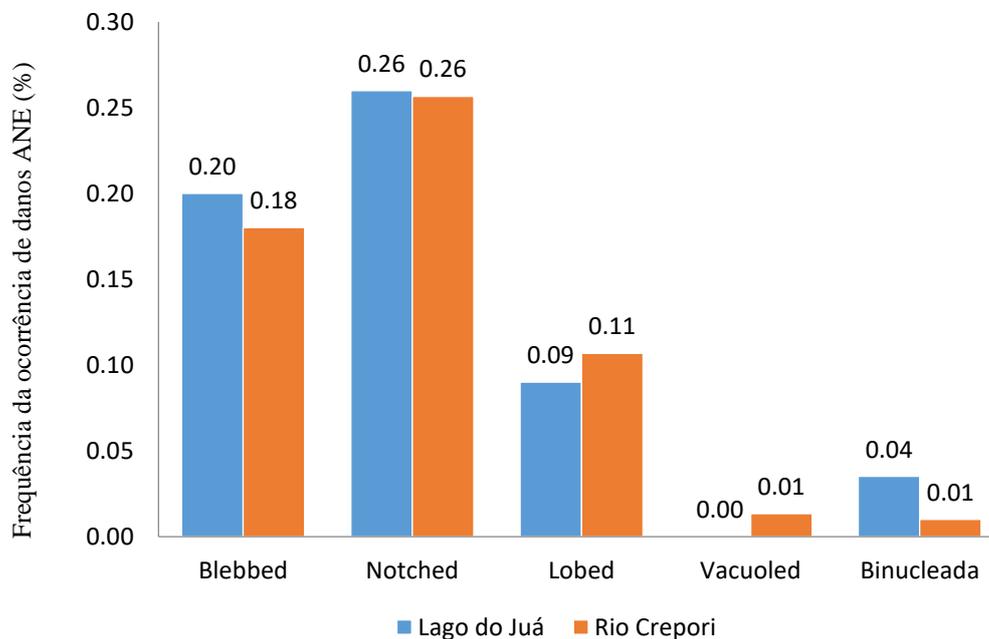
**Tabela 06:** Frequência média de micronúcleos em populações de *Hoplias malabaricus*

<b>Localidade</b>	<b>n</b>	<b>Frq Média</b>	<b>Referencia</b>
Rio Tapajós	15	0.050	presente estudo
Rio Madeira	5	0.176	Porto et al. (2005)
Rio Madeira	6	0.450	Ferreira (2015)
Rio Solimões	6	0.006	Porto et al. (2005)
Rio Solimões	56	0.240	Ferreira (2015)
Lago Paranoá	26	1.800	Grisolia et al (2009)

Na amostra do lago Juá observamos 117 ANE e nas do rio Crepori foram 170. A comparação da frequência total de ANE realizado pelo teste t não apresentou diferença significativa entre os dois pontos de coleta ( $p=0.440$ ). Nesse mesmo sentido, a comparação da frequência média de cada categoria de ANE entre as duas localidades também não mostrou variação significativa pelo teste-t. Somente a categoria Vacuoled foi testado pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney, revelando, também, não haver diferença significativa entre as duas localidades ( $U=55$ ;  $p=0.267$ ). Os valores de média da frequência (figura 17) e desvio padrão são mostrados na Tabela 07.

**Tabela 07:** Média e desvio padrão da frequência das categorias de Anormalidade Nucleares Eritrocitárias (ANE) em *Hoplias malabaricus*. Foram analisadas 2000 células por indivíduo.

Localidade	n	Blebbled	Notched	Lobed	Vacuoled	Binucleate	ANE Total
Lago Juá, Rio Tapajós (Santarém)	10	0.20±0.11	0.26±0.14	0.09±0.10	0	0.04±0.03	0.59±0.27
Rio Crepori (Itaituba)	15	0.18±0.09	0.26±0.12	0.11±0.09	0.01±0.02	0.01±0.02	0.57±0.17



**Figura 17:** Frequência relativa em porcentagem das categorias de Anormalidades Nucleares Eritrocitárias de *Hoplias malabaricus* do rio Tapajós e rio Crepori.

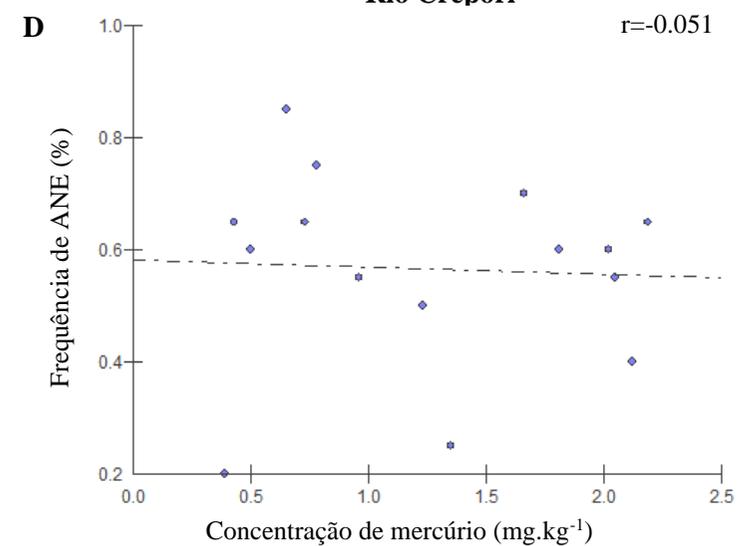
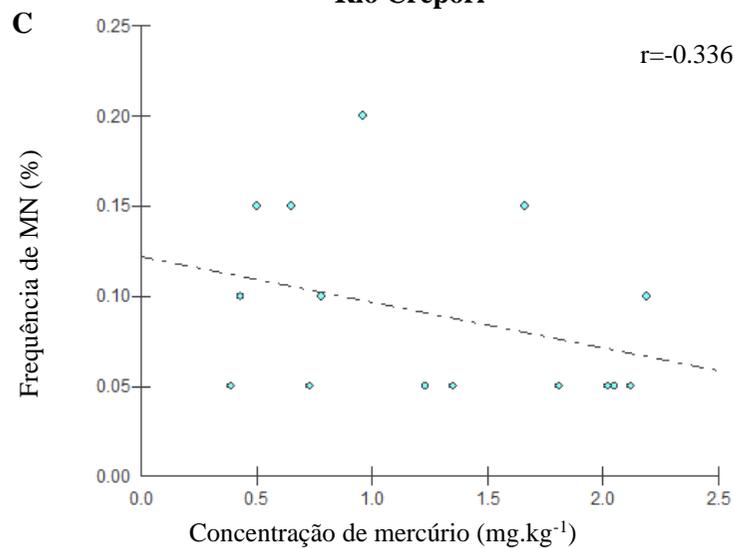
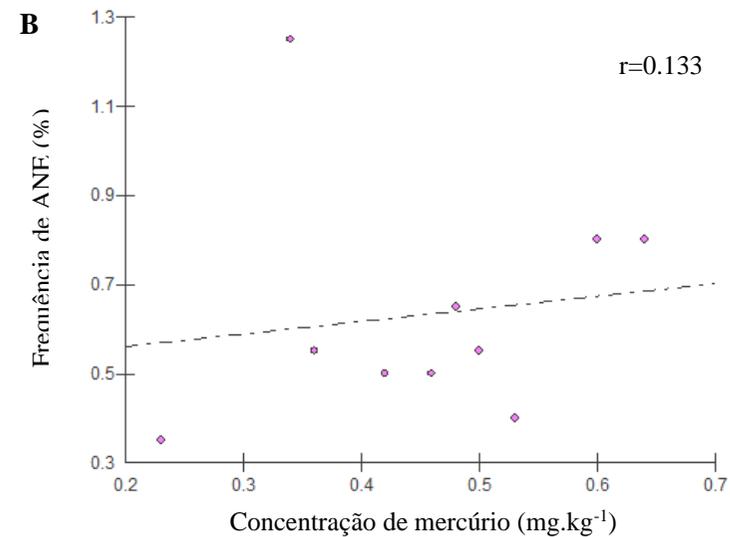
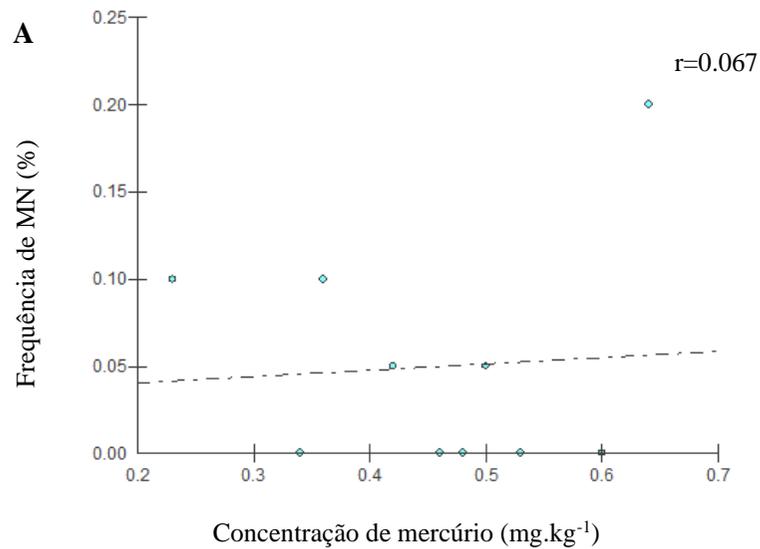
Os resultados obtidos pelo presente trabalho mostraram que a ocorrência categoria Notched foi a mais frequente, seguida pela categoria Blebbed, nas duas localidades. Não houve registro da categoria Vacuoled em peixes do rio Tapajós. No lago Juá, a ocorrência da

categoria Notched apresentou uma frequência média de  $0.26\% \pm 0.14$ , seguido pela categoria blebbed, com  $0.20\% \pm 0.11$ . Já no Rio Crepori, as categorias notched, blebbed e vacuoled apresentaram uma frequência média de  $0.26 \pm 0.12$ ,  $0.18 \pm 0.09$  e  $0.01 \pm 0.02$ , respectivamente. Da Silva et al. (2012) buscaram avaliar os potenciais risco de mercúrio em condições naturais no reservatório Samuel, onde as categorias blebbed e notched foram as mais frequentes observadas nos dois grupos de *Hoplias malabaricus* estudados, um com menor e outro com maior nível de mercúrio

A análise de ANE se comportou de forma semelhante a frequência de micronúcleo, sendo observada uma baixa frequência de ANE, uma vez que não houve diferença estatística observada entre o lago Juá e rio Crepori. O mecanismo de produção de ANE não é totalmente compreendido, mas sabe-se que após sua formação uma parte do material genético fica atrasada no ciclo celular.

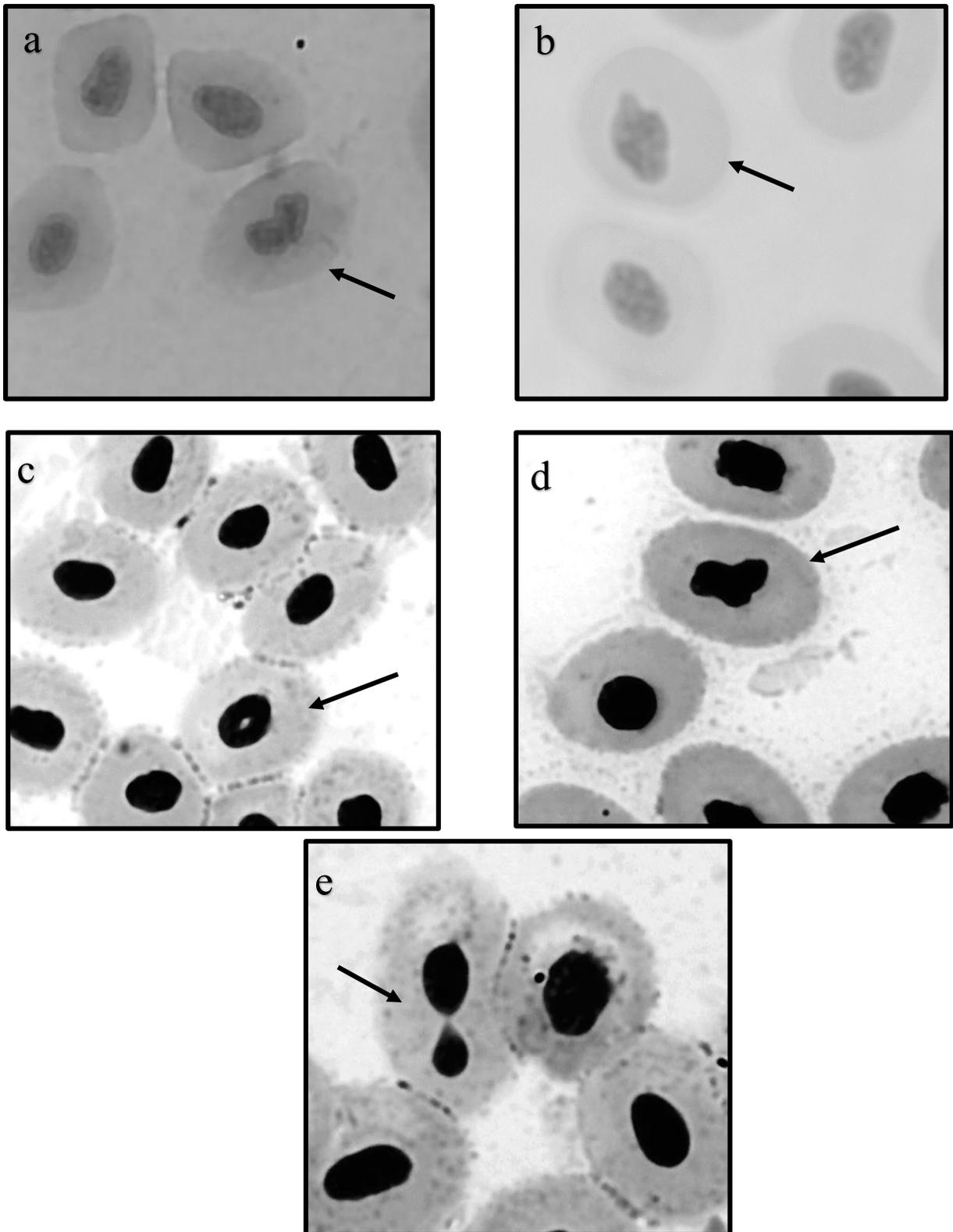
Foi avaliada uma possível correlação entre a frequência de MN e ANE com o nível de mercúrio do lago Juá e rio Crepori. Os resultados mostraram não haver correlação significativa entre a frequência de MN ( $r=0.067$ ,  $p=0.853$ ) e ANE ( $r=0.133$ ,  $p=0.713$ ) com os peixes do lago Juá. Nessa mesma investigação, também não foi encontrada correlação entre a frequência de MN ( $r=-0.336$ ,  $p=0.220$ ) e ANE ( $r=-0.051$ ,  $p=0.855$ ) com os peixes do rio Crepori (figura 18).

Alguns autores já realizaram análise de MN e ANE em conjunto, isto é, a soma de MN com ANE. O motivo pelo qual foi computado em conjunto foi devido ao fato de que o número de MN e ANE encontrados eram muito pequenos, não encontrando diferença estatística entre o grupo controle e exposto (FERRARO, 2009; ROCHA, 2009). No entanto, em nosso estudo, não realizamos essa análise em conjunto, visto que MN e ANE são fenômenos que possuem origens diferenciadas e no caso das ANE o mecanismo de ação ainda não é completamente compreendido.



**Figura 18:** Correlação entre a concentração de mercúrio ( $\text{mg.Kg}^{-1}$ ) em tecido muscular com a frequência de micronúcleos (MN) e Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE) de *Hoplias malabaricus*. A= %MN com Hg Lago Juá; B= %ANE com Hg Lago Juá; C=%MN com Hg Rio Crepori; D= %ANE com Hg Rio Crepori.

Categorias de ANEs registadas nas amostras de *Hoplias malabaricus* são demonstradas na figura 19.



**Figura 19:** Eritrócitos de *Hoplias malabaricus* em distensão sanguínea corada por Giemsa. a) “Notched” (seta); b) “Blebbled” (seta); c) “Vacuolated” (seta); d) “Lobed” (seta); e) “Binucleate” (seta). Fotos: Christian Diniz, 2016.

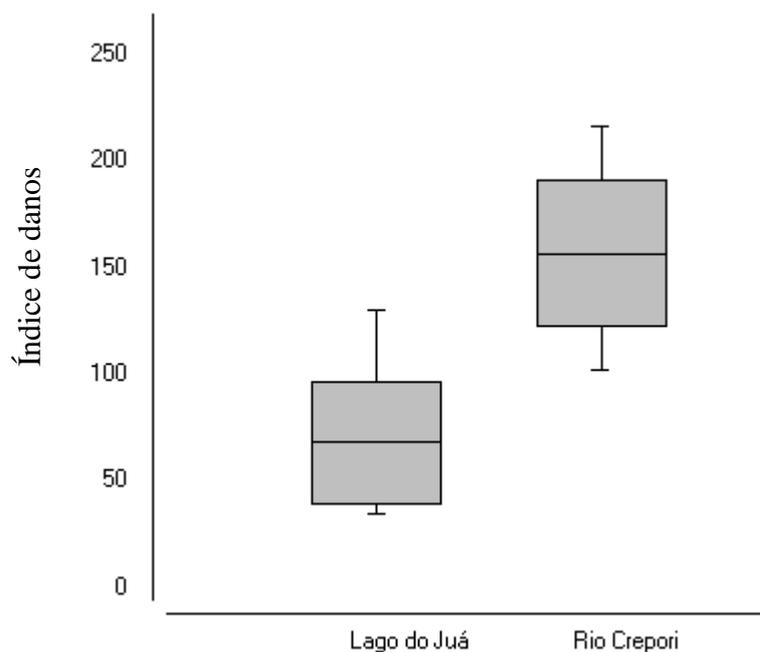
### 5.3 Ensaio Cometa

A análise de danos do ensaio cometa foram medidos por scores, que são valores que indicam o grau de dano nas células individualizadas, onde o valor pode variar de 0 a 400. Logo, o valor 0 (zero) equivale a ausência de dano e 400 o maior grau de dano.

Na avaliação de danos ao material genético detectado por ensaio cometa, analisamos uma amostra de 25 peixes, perfazendo um total de 1.000 células provenientes do Lago Juá (Santarém) (n=10) e 1.500 células do rio Crepori, Garimpo Creporizão (Itaituba) (n=15). Na tabela 8 são mostrados os resultados das médias de escore e desvio padrão das amostras. Os peixes do Lago Juá mostraram um índice de danos de 68.1, enquanto que, os do rio Crepori apresentaram maior nível de danos ao DNA, cujo escore foi de 156.9. As comparações entre os valores médios para as duas populações mostraram diferença estatística  $p < 0.05$  ( $p = 0.0001$ ) (Figura 20).

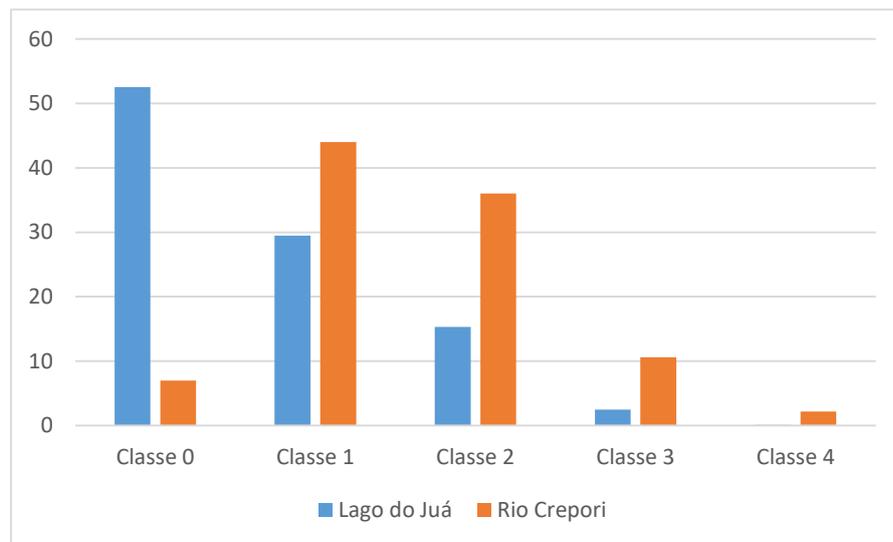
**Tabela 8:** Média e desvio padrão dos escores de cometa de *Hoplias malabaricus* do rio Tapajós e rio Crepori. N= número de peixes; Score/ID= índice de danos pelo ensaio cometa.

Localidade	n	Score/ID (média) $\pm$ Desvio Padrão
Lago Juá, Rio Tapajós (Santarém)	10	68.1 $\pm$ 28.5
Rio Crepori (Itaituba)	15	156.9 $\pm$ 34.4



**Figura 20:** Índice de danos em *Hoplias malabaricus* do Lago Juá e do rio Crepori, bacia do rio Tapajós.

Cometas nucleóides da classe 0 foram mais frequentes na amostra do rio Tapajós, enquanto que na amostra do rio Crepori, foi observado uma prevalência de danos genotóxicos das classes 1 e 2 em maior frequência (Figura 21). Sobre as classes de danos, os dados demonstraram diferença estatística ( $p < 0.05$ ) nas classes 0, 2, 3. Não foi encontrado diferença estatística na classe de dano 1 e 4.



**Figura 21:** Frequência relativa em porcentagem de danos ao material genético de *Hoplias malabaricus* observadas nas diferentes classes de cometa. Foram analisadas 100 células por animal ( $n=25$ ).

No Lago Juá, não foi encontrado uma correlação positiva entre o índice de danos pelo ensaio cometa com o nível de mercúrio na população de peixes dessa região ( $r=0.351$ ,  $p=0.319$ ). Logo, de acordo com os dados analisados, a concentração de mercúrio em *Hoplias malabaricus* do lago Juá não apresentaram danos visíveis e significativos ao DNA.

As amostras do rio Crepori, por mais que não seja evidenciado uma correlação de índice de danos ao DNA pelo EC com a concentração de mercúrio, é possível notar que os danos foram mais visíveis e significativos em relação ao Lago Juá, concluindo que as lesões ao DNA pelo EC foram mais marcantes quanto comparadas a indução de MN e ANE. Vicari et al (2012), observou um maior índice de danos ao DNA em *Hoplias malabaricus* expostos, em comparação com o grupo controle e tratamento com metilmercúrio, evidenciando também uma ação genotóxica do metal.

Pela primeira vez foi demonstrado um ensaio com *Hoplias malabaricus* de ambientes naturais da bacia do rio Tapajós, na investigação de danos ao DNA possivelmente causada por mercúrio. Logo, o EC conseguiu atuar de forma sensível na identificação de danos ao DNA de *Hoplias malabaricus*, visto que esse ensaio é considerado uma ferramenta imprescindível em programas de biomonitoramento ambiental através do uso de organismos aquáticos, sendo capaz de revelar um aumento no número de fragmentos de DNA que sofreram quebras devido a exposição por algum poluente (Rocha, 2009; Azqueta e Collins, 2013)

## 6 CONCLUSÕES

- *Hoplias malabaricus* funcionou como um eficiente modelo para estudos de genotoxicidade de metais em ambientes aquáticos.
- A população de *Hoplias malabaricus* proveniente do rio Crepori apresentou níveis de mercúrio acima do estabelecido pela ANVISA em ambiente de exploração de ouro em comparação com Lago Juá, região não associada a exploração de ouro.
- Os peixes do Lago Juá demonstraram uma correlação positiva com o nível de mercúrio. Já o rio Crepori, que apresentou nível mais elevado, não demonstrou uma correlação, indicando que o efeito da bioacumulação possa ser afetado quando ambientes tenham uma alta concentração de mercúrio.
- Os peixes do rio Crepori apresentaram maior frequência de MN e ANE que, possivelmente, pode estar associado com a presença de mercúrio.
- Os peixes do Lago Juá, região distante de exploração mineral apresentou indução de MN e ANE, entretanto sua proximidade do ambiente urbano pode ser um fator adicional para poluição do lago.
- O EC se mostrou sensível evidenciando diferença estatística entre as amostras de peixes do Lago Juá e o rio Crepori. O rio Crepori apresentou uma maior quantidade de índice de danos ao DNA, visto que as amostras dessa localidade tiveram um maior nível de mercúrio.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research Genetic Toxicology**. v. 343, p. 121-135, 1995.

ARRIFANO, G.P.F. **Metilmercúrio e mercúrio inorgânico em peixes comercializados no mercado municipal de Itaituba (Tapajós) e mercado do ver-o-peso (Belém)**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em neurociências) - Universidade Federal do Pará, 2011.

AYRES, M.; M. AYRES JR., D.L. AYRES & A.A. SANTOS. **Bioestat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Belém, Brasília, 2003.

AZEVEDO F.A. **Toxicologia do mercúrio**. São Paulo: Rima Editora, 2003.

AZQUETA, A.; COLLINS, A.R. The Comet Assay: High Throughput use of FPG. In: SIERRA, L.M., GAIVÃO, I. **Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach**. New York Humana Press Springer. p.199 – 218, 2014.

AZQUETA, A.; COLLINS, A.R. The essential comets assay a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch Toxicol**, v. 87; p. 949 – 968, 2013.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

BOURDINEAUD, J. P.; DURRIEU, G. ; SARRAZIN, S. L.; DA SILVA, W.C.; MOURÃO, R. H.; DE OLIVEIRA, R. B. Mercurial exposure of residents of Santarém and Oriximiná cities (Pará, Brazil) through fish consumption. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, p.12150–12161, 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. **Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de agosto de 1998.

BRIANEZI, G. S.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

CANELA, M. C. **Determinação de Mercúrio**. UNICAMP, 1995

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assesment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CRESPO-LOPEZ, M. E. MACÊDO, G.L.; PEREIRA, S.I.; ARRIFANO, G. P.; PICANÇO-DINIZ, D. L.; DO NASCIMENTO, J. L.; HERCULANO, A.M. Mercury and human

genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacol Res**, v. 60, n. 4, p. 212-220, 2009.

DA SILVA, S. G.; FILIPAK NETO, F, SILVA DE ASSIS, H. C.; BASTOS, W. R.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; Potential risks of natural mercury levels to wild predator fish in an Amazon reservoir. **Environ Monit Assess**, v.184, p. 4815–4827, 2012

DMA-80 DIRECT MERCURY ANALYZER. **Milestone Helping Chemists**. Japão, 2009.

DOS SANTOS, L. S. N.; MÜLLER, R. C.; DE SARKIS, J. E.; ALVES, C. N.; BRABO, E. S.; SANTOS, E. O.; BENTES, M. H. Evaluation of total mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajós River Basin, Pará, Brazil. **The Science of the Total Environ**, v. 261, p. 1–8, 2000.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos.** (2009) 109 P. Tese de doutorado (Ciências Biológicas) pela Universidade Federal do Paraná. 2009.

FERREIRA, M. R. S. **Perfil genotóxico e bioacumulação de metais em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) de tributários dos rios Negro e Solimões.** 2015. 103 f. Dissertação (mestrado em genética, conservação e biologia evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisa das Águas, 2015.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.E. Teste de micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FRANCHI, E.; LOPRIENO, G.; BALLARDIN, M.; PETROZZI, L.; MIGLIORE, L.; Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. **Mutat Res**, 320:23–9, 1994.

GRISOLIA, C. K et al. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 138-143, 2009.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p.147–152, 1982.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecol. Bras.**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

KEHRIG, H. A.; HOWARD, B. M.; MALM, O. Methylmercury in a predatory fish (*Cichla* spp.) inhabiting the Brazilian Amazon. **Environ Pollut.**, v. 154, n. 1, p. 60-76, 2008.

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

LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estud. av.** v. 22, n. 63, 2008.

LIMA, A.P.S.; MÖLLER, R. C. S.; SARKIS, J. E. S.; ALVES, C. N.; BENTES, J. H. S.; BRABO, E.; SANTOS, E.O. Mercury contamination in fish from Santarém, Pará, Brazil. **Environmental Research Section A**, v. 83, p. 117-122, 2000.

MAHBOOB, S.; AL-BALWAI, H. F. A.; AL-MISNED, F.; AHMAD, Z. Investigation on the Genotoxicity of Mercuric Chloride to Freshwater Clarias gariepinus. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 34, n. 1, p. 100-103. 2014.

MAISTRO, E. L. The in vivo rodent Micronucleus test. In: SIERRA, L.M., GAIVÃO, I. **Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach**. New York: Humana Press Springer, 2014. p.199 – 218

MALAQUIAS, A. C. **Exposição à concentração subletal de metilmercúrio: genotoxicidade e alterações na proliferação celular**. 2015. 79 f. Tese (Doutorado em neurociências e biologia celular) – Universidade Federal do Pará, 2015.

MELO, K. M.; ALVES, I. R.; PIECZARKA, J. C.; DAVID, J. A. O.; NAGAMACHI, C. Y.; GRISOLIA, C. K. Profile of micronuclei frequencies and nuclear abnormalities in different species of electric fishes (Gymnotiformes) from the Eastern Amazon. **Genetics and Molecular Biology**. v. 36, n. 3, p. 425–429. 2013.

MICARONI, R. C. C. M. et al. Composto de mercúrio. Revisão de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487-495, 2000.

NEVADO, J. J. B.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C. R.; BERNARDO, F. J. G.; MORENO, M. J.; HERCULANO, A. M.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; CRESPO-LÓPEZ, M. E. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: A review. **Environment International**, v. 36, p. 593–608, 2010.

NORTJE, J. **Determination of Total Mercury in Fish and Biological Tissue Using a Direct Mercury Analyzer**. **American Laboratory** 2010. Disponível em: <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/502-Determination-of-Total-Mercury-in-Fish-and-Biological-Tissue-Using-a-Direct-Mercury-Analyzer/>. Acesso em: 01 de agosto de 2016.

OLIVEIRA, S. R. L; MENDONÇA, A. B.; SERIQUE, K. K. A.; CRUZ, R. M.; FILHA, P. R. S. S.; GOCH, Y. F de F. Ecotoxicologia do mercúrio (Hg) total em peixes do lago Juá – Santarém, Pará. **Anais do VI salão de pesquisa e iniciação científica do ILES/ULBRA**. Santarém, Pará, 2005.

PANTELEÃO, M. S.; ALCANTARA, A. V.; ALVES, J. P. H.; SPANO, M. A. The Piscine Micronucleus Test to Assess the Impact of Pollution on the Japarutuba River in Brazil. **Environmental and Molecular Mutagenesi**, v. 47, p. 219-224, 2006.

PINHEIRO, M. C. N.; NAKANISHI, J.; OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G.; QUARESMA, M.; CARDOSO, B.; AMORAS, W. W.; HARADA, M.; MAGNO, C.; VIEIRA, J. L. F.; XAVIER, M. B.; BACELAR, D. R. Exposição humana ao metilmercúrio em comunidades

ribeirinhas da Região do Tapajós, Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 265-269, 2000.

PINHEIRO, M. C. N., OIKAWA, T.; VIEIRA, J.L.F.; GOMES, M.S.V.; GUIMARÃES, G.A.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; MULLER, R.C.S.; AMORAS, W.W. ; RIBEIRO, D.R.G.; RODRIGUES, A.R.; CÔRTEZ, M.I.T.; SILVEIRA, L.C.L. Comparative study of human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 411-414, 2006.

PORTO, J. I. R.; ARAÚJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v.97, p. 287–292, 2005.

RABITTO, I. S.; BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ANJOS, A.; DE HOLANDA, I. B.; GALVÃO, R.C.; NETO, F.F.; DE MENEZES, M. L.; DOS SANTOS, C. A.; DE OLIVEIRA, R. C. A. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environment International**, v. 37, p. 56–65, 2011.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Teste do cometa para detecção do dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

ROCHA, C. A. M.; DA CUNHA, L.A.; DA SILVA, P.R, H.; DE OLIVEIRA, B. M.; BURBANO, R.M. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 4, p. 694-697, 2011.

ROCHA, C. A. M.; LIMA, P. D. L; SANTOS, R. A.; BURBANO, R. M. R. Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay - A Review. **Reviews in Fisheries Science**, v. 17, n. 2, p. 170-173, 2009.

DE SÁ, A. L.; HERCULANO, A. M.; PINHEIRO, M. C.; SILVEIRAS, L. C. L.; NASCIMENTO, J. L. M.; CRESPO-LÓPEZ, M. H. Exposição humana ao mercúrio na Região Oeste do Estado do Pará. **Revista Paraense de Medicina**, v.20, n. 1, janeiro – março, 2006

SAMPAIO DA SILVA, D.; LUCOTTE, M.; ROULET, M.; POIRIER, H.; MERGLER, D.; CROSSA, M. Mercúrio nos peixes do rio Tapajós, Amazônica Brasileira. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v.1, n.1, Art 6, 2006

SANTOS, F. L. O.; GATTI, R. M.; SOUZA, P. R. K. Presença de mercúrio em peixes e sua correlação com a intoxicação alimentar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano III, no 9, jul/set 2006

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SILVA, J. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Sociedade Brasileira de Genética**, v. 02, p. 30-33, 2007.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N.P; STEPHENS, R.E.; Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanism, and DNA electrostretching. **Mutation Research.**, v. 383, p. 167-175, 1997.

TERRADAS, M.; MARTÍN, M.; TUSELL, L.; GENESCÀ, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research**, v. 705; p. 60–67, 2010.

UNBAMANI, S.; MOHANKUMAR, M. Nuclear and cytoplasmic abnormalities in the fish *Catla catla* (Hamilton) exposed to chemicals and ionizing radiation. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 12, p. 867-877, 2011.

VERSCHAEVE, I.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HENS, L.; SUSANNE, C. Comparative in vitro cytogenetic studies in Mercury-exposed human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 157, p. 221-226, 1985.

VICARI, T.; FERRARO, M. V. M.; RAMSDORF, W. A.; MELA, M.; RIBEIRO, C. A. O.; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) in *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental. Saf.** 2012.

WASSERMAN, J. C.; HACON, S. S.; WASSERMAN, M. A. O ciclo do mercúrio no meio ambiente amazônico. **Mundo e Vida**, v. 2, p. 46-52, 2001.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Inorganic mercury**. Geneva, Environmental Health Criteria, 1991.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Methylmercury**: Environmental Health Criteria, vol. 101. World Health Organization, Geneva, 1990.

ZAHIR F. L.; RIZWI, S. J.; HAQ, S. K.; KHAN, R. H. Low dose mercury toxicity and human health. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 20, n. 2, p. 351-60, 2005.

## ANEXO 01 - Protocolo do Comitê de Ética Animal



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFOPA

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS EM PEIXES NATIVOS DA BACIA DO RIO TAPAJÓS EXPOSTOS A CONTAMINAÇÃO MERCURIAL" protocolado sob o número Nº 09003/2016, sob a responsabilidade do professor Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues vinculado ao Instituto de Ciências da Educação – ICED/UFOPA está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém, 22 de março de 2017.



  
**PRESIDENTE CEUA - UFOPA**  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA

## ANEXO 02 – Tabela de Resultados

Dados das amostras de <i>Hoplias malabaricus</i> – Rio Crepori, Região de Itaituba																								
Características			Análise dos eritrócitos											Ensaio Cometa										Hg Total (mg/kg)
			Micronúcleo		Anomalias Nucleares Eritrocitárias - ANEs						Alterações Totais			Classes do Cometa										
Amostra	PESO (g)	CP (cm)	MN	% MN	Blebbled	Notched	Lobed	Vacuolod	Binucleatt	ANET	%ANE	Total de Alterações	NORMAL	TOTAL	0	1	2	3	4	TOTAL	ES/ID			
CRP_4	100	17.0	2	0.1	4	4	4	1	0	13	0.65	15	1985	2000	7	69	13	11	0	100	128	0.43		
CRP_5	60	14.8	1	0.05	6	3	0	0	1	10	0.5	11	1989	2000	8	76	10	6	0	100	114	1.23		
CRP_7	330	26.5	1	0.05	1	2	2	0	0	5	0.25	6	1994	2000	3	53	38	5	1	100	148	1.35		
CRP_8	440	29.0	1	0.05	1	8	3	0	0	12	0.6	13	1987	2000	12	52	27	9	0	100	133	1.81		
CRP_9	413	28.2	1	0.05	5	6	1	0	0	12	0.6	13	1987	2000	16	61	14	5	4	100	120	2.02		
CRP_10	154	20.5	4	0.2	4	7	0	0	0	11	0.55	15	1985	2000	3	67	21	9	0	100	136	0.96		
CRP_11	241	24.0	3	0.15	4	10	0	0	0	14	0.7	17	1983	2000	1	30	54	15	0	100	183	1.66		
CRP_12	148	19.8	2	0.1	3	4	6	0	0	13	0.65	15	1985	2000	3	31	45	18	3	100	187	2.19		
CRP_13	206	22.5	1	0.05	1	4	3	0	0	8	0.4	9	1991	2000	13	72	15	0	0	100	102	2.12		
CRP_14	177	21.0	1	0.05	3	7	1	0	0	11	0.55	12	1988	2000	17	23	31	29	0	100	172	2.05		
CRP_15	265	24.0	3	0.15	6	7	2	1	1	17	0.85	20	1980	2000	0	38	52	4	6	100	178	0.65		
CRP_16	165	20.5	1	0.05	1	1	1	1	0	4	0.2	5	1995	2000	6	24	50	19	1	100	185	0.39		
CRP_17	190	21.5	3	0.15	4	5	3	0	0	12	0.6	15	1985	2000	0	21	63	12	4	100	199	0.50		
CRP_19	66	16.4	2	0.1	6	6	1	1	1	15	0.75	17	1983	2000	9	9	53	14	15	100	217	0.78		
CRP_20	74	16.4	1	0.05	5	3	5	0	0	13	0.65	14	1986	2000	8	35	54	3	0	100	152	0.73		
Média	201.93	21.47	1.80	0.09	3.60	5.13	2.13	0.27	0.20	11.33	0.57	13.13	-	-	7.1	44.1	36.0	10.6	2.3		156.9	1.26		

CP= Comprimento em centímetros; MN= micronúcleo; %MN: frequência de micronúcleo; ANET: Anomalias nucleares eritrócitas totais; %ANE: Frequência de anomalias nucleares totais; ES/ID: Escode/ID (índice de danos).

**AMOSTRAS DE HOPLIAS MALABARICUS – LAGO JUÁ, RIO TAPAJÓS, REGIÃO DE SANTARÉM**

Características			Análise dos eritrócitos										Ensaio Cometa							Hg Total (mg/kg)		
			Micronúcleo		Anomalias Nucleares Eritrocitárias - ANEs						Alterações Totais		Classes do Cometa									
Amostra	PESO (g)	CP (cm)	MN	%MN	Blebbled	Notched	Lo-bed	Vacu-loed	Binucle ada	ANE T	%AN E	Total de alteraçõe s	NOR-MAL	TO-TAL	0	1	2	3	4	TO-TAL	ESC/ID	
Jua_13	221	27	0	0	1	6	2	0	1	10	0.5	10	1990	2000	54	36	8	2	0	100	58	0.46
Jua_14	382	33	0	0	0	6	1	0	1	8	0.4	8	1992	2000	53	34	12	1	0	100	61	0.53
Jua_17	182	25.0	2	0.1	4	3	2	0	0	9	0.45	11	1989	2000	70	25	5	0	0	100	35	0.36
Jua_19	235	26.6	0	0	6	11	7	0	1	25	1.25	25	1975	2000	57	35	6	2	0	100	53	0.34
Jua_20	374	43	4	0.2	4	4	3	0	1	12	0.6	16	1984	2000	64	16	16	4	0	100	60	0.64
Jua_21	261	29	1	0.05	5	5	0	0	0	10	0.5	11	1989	2000	60	33	7	0	0	100	47	0.50
Jua_22	264	29	0	0	8	4	0	0	1	13	0.65	13	1987	2000	60	18	14	8	0	100	70	0.48
Jua_23	163	24.5	2	0.1	3	2	0	0	0	5	0.25	7	1993	2000	53	35	10	2	0	100	61	0.23
Jua_24	296	29.6	1	0.05	5	2	2	0	0	9	0.45	10	1990	2000	33	30	35	2	0	100	106	0.42
Jua_25	248	29	0	0	4	9	1	0	2	16	0.8	16	1984	2000	21	34	40	4	1	100	130	0.60
Média	262.6	29.57	1	0.05	4	5.2	1.8	0	0.7	11.7	0.585	12.7			52.5	29.6	15.3	2.5	0.1		68.1	0.46

CP= Comprimento em centímetros; MN= micronúcleo; %MN: frequência de micronúcleo; ANET: Anomalias nucleares eritrócitas totais; %ANE: Frequência de anomalias nucleares totais; ES/ID: Escore/ID (índice de danos).