

# **Biomarcadores como ferramentas na avaliação da qualidade do pescado contaminado com metais traço**

*Biomarkers as tools in quality assessment of fish contaminated with trace metals*

Rodolfo dos Santos Coutinho Coimbra<sup>\*</sup>

Carlucio Rocha dos Santos<sup>\*\*</sup>

Victor Barbosa Saraiva<sup>\*\*\*</sup>

Manildo Marcião Oliveira<sup>\*\*\*\*</sup>

## Resumo

Metais traço que apresentem toxicidade aos vertebrados são alvo de preocupação por parte dos programas de monitoramento ambiental em função do impacto causado por ação da atividade antrópica. A distribuição destes elementos se diferencia nas matrizes: água, sedimento e biota. Metais como Pb, Cd, Hg, As e Cr são relacionados a importantes danos ambientais, podendo contaminar o homem principalmente por consumo de pescado. Alguns biomarcadores podem ser aplicados na abordagem de impacto e avaliação de riscos para populações de espécies suscetíveis à exposição e efeito dos metais traço tóxicos. A acetilcolinesterase, a metalotioneína, o ácido delta aminolevulínico desidratase e o ensaio de micronúcleo podem ser utilizados em conjunto como biomarcadores quando organismos aquáticos são expostos ou afetados por metais tóxicos. A resolução 357/2005 do CONAMA no Ministério do Meio Ambiente e a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde estabelecem limites máximos desses metais tóxicos em água superficial e água de consumo humano respectivamente. Entretanto, ainda não se exige a determinação das espécies químicas, relevante à biodisponibilidade produzida nas diferentes matrizes, nem sobre os efeitos subletais, avaliados pelos biomarcadores, destes metais nos organismos aquáticos. A proposta desta revisão é apresentar os biomarcadores (bioquímicos e genéticos) como ferramentas auxiliares na avaliação da qualidade de pescado.

Palavras-chave: Metais traço. Biomarcadores. Peixe.

<sup>\*</sup> Mestrando em Engenharia Ambiental pelo Instituto Federal Fluminense – Campos dos Goytacazes/RJ – Brasil

<sup>\*\*</sup> Doutor em Biotecnologia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Coordenador de Recursos Hídricos da Secretaria de Ambiente de Macaé/RJ – Brasil

<sup>\*\*\*</sup> Doutor em Ciências (Biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2008) e Pós-doutor em Bioquímica de micro-organismos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2010). Professor do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense (IF Fluminense) - campus Cabo Frio/ RJ – Brasil

<sup>\*\*\*\*</sup> Doutor em Biologia (Biotecnologia) pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2009). Professor de ensino básico, técnico e tecnológico e coordenador do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense (IF Fluminense) - campus Cabo Frio/ RJ – Brasil

## Abstract

Trace metals that present toxicity to vertebrates are cause of concern in environmental monitoring programs due to impact caused by anthropogenic activity. The distribution of these elements is found in different settings: water, sediment and biota. Metals such as Pb, Cd, Hg, As and Cr are related to significant environmental damage, which can contaminate man, primarily by fish consumption. Some biomarkers can be applied via an impact approach, and risk assessment for populations of species susceptible to exposure and toxic effects of trace metals. Acetylcholinesterase, metallothionein, delta-aminolevulinic acid dehydratase, and the micronucleus test can be used together as biomarkers for aquatic organisms that are exposed or affected by toxic metals. The CONAMA Resolution 357/2005 of the Brazilian Ministry of the Environment and the Ordinance 2914/2011 from Ministry of Health set limits for these toxic metals in surface and drinking water respectively. However, it still does not require the determination of chemical species, relative to the bioavailability produced in different arrays, neither to sublethal effects, evaluated by biomarkers, of these metals on aquatic organisms. The purpose of this review is to present the biomarkers (genetic and biochemical) as tools to aid assessment of the quality of fish.

Key words: Trace metals. Biomarkers. Fish.

## Introdução

A história recente da humanidade tem demonstrado que o desenvolvimento, quando não alia avanço tecnológico e respeito ao ambiente, coloca toda a humanidade em rota de colisão consigo própria, e, atualmente, podemos classificar a atividade como insustentável. A percepção equivocada de que o homem é o senhor e dominador do meio ambiente (paradigma antropocêntrico) parece não mais explicar ou ao menos justificar os descasos que provocaram importantes acidentes ambientais que permanecem na memória de todas as populações afetadas. Entre os xenobióticos (estranho à vida) considerados poluentes aquáticos, os compostos inorgânicos são importantes pela gravidade dos efeitos tóxicos associados à contaminação aguda.

As contaminações em baixas concentrações (crônicas) não menos preocupantes, podem antecipar a dramática perda de biodiversidade nos ambientes aquáticos, além de aumentar substancialmente a probabilidade de contaminação humana por consumo de organismos oriundos desses ecossistemas. O novo paradigma promove a necessidade de desenvolvimento sustentável não só na garantia dos recursos naturais para as futuras gerações, mas sobretudo na garantia de vida para a geração atual, principalmente as populações mais vulneráveis. É preciso mudar o perfil de uma sociedade que atrela política a economia, desconsiderando aspectos sociais envolvidos no processo, para

um vinculado a uma ética ambiental que leve em consideração todos os deveres morais para o ambiente e para o ser humano, dentro de uma proposta holística de apreciação do tema (AZEVEDO, 2010). Nesse sentido, as relações entre qualidade ambiental e saúde são cada vez mais estreitas. Os metais-traço (ainda conhecidos por muitos como metais pesados) estão entre os responsáveis por acidentes historicamente relevantes para a toxicologia ambiental. Dois notórios exemplos foram: a contaminação de peixes por mercúrio em Minamata (em humanos esta contaminação é conhecida como mal de minamata, em decorrência deste fato histórico), a por cádmio ocorrido no Japão (Rio Jintsu) (causador em humanos da doença conhecida como *Itai Itai*) (SOLOMON, 2008; HUTTON, 1987)

Como a maioria dos metais ocorre naturalmente na natureza, encontramos neste fato dificuldades para uma melhor interpretação dos resultados quando esses são detectados no ambiente. Nesta breve revisão principal preocupação é com as características da presença desses metais nas diversas matrizes que compõe o ambiente aquático: sedimento, água e na biota. E neste último, como a aplicação dos biomarcadores contribui como ferramenta de análise em estudos ecotoxicológicos que visem à proteção das populações aquáticas e segurança para os humanos que utilizam esse recurso natural.

### **Metais, a toxicidade**

Venezuela (2001) classifica os metais em relação à toxicidade em três grupos distintos: no primeiro grupo estão os considerados pouco tóxicos, que na maioria são tidos como micronutrientes, mas que, em concentrações elevadas, são tóxicos, são eles o alumínio, cobalto, cobre, manganês, molibdênio, selênio, vanádio, zinco e estanho; o segundo grupo é formado por metais que apresentam probabilidade de riscos de câncer, que são o arsênio, berílio, cromo e níquel e no terceiro grupo estão os metais que apresentam um caráter tóxico significativo e não se enquadram nos grupos anteriores e são o chumbo, cádmio, mercúrio e tálio. Para Baird (2002) os metais diferenciam-se dos compostos orgânicos tóxicos por serem absolutamente não-degradáveis, de maneira que podem acumular-se nos componentes do ambiente onde manifestam sua toxicidade.

### **Legislação**

No Brasil, o instrumento que estabelece a concentração máxima permitida para contaminantes inorgânicos em alimentos, incluindo peixes e produtos da pesca é o Decreto nº 55.871, de 26/03/65 do Ministério da Saúde. Existem resoluções mais recentes ao Decreto original: encontra-se também em vigor no país a Portaria nº11, de 15/05/87 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária – MS; a Portaria nº 685,

de 27/08/98 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária – MS, que abrange o MERCOSUL e a Instrução Normativa n°42, de 20/12/99 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO dispõe de uma compilação de limites de substâncias contaminantes em peixes e produtos da pesca. Nesse documento, são apresentados os limites máximos permitidos para mercúrio, metais traço, pesticidas e outros biocidas em mais de 100 países membros da organização.

A legislação, ainda, contempla principalmente a análise química de metais traço em água superficial através da Resolução CONAMA 357/2005 que dispõe sobre enquadramento dos corpos de água por classes de qualidade (Classe especial, I, II, III e IV), que apresentam usos previstos: preservação da vida aquática, consumo humano, irrigação, dessedentação de animais, recreação e aquicultura. Já a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde estabelece os limites para água utilizada para consumo humano, mas ainda não está claramente embutida a ideia de avaliação de risco. A Resolução Conama 421/2010 relacionada ao material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras dispõe sobre as análises de metais em material oriundo do sedimento (sedimentos totais, ou suas frações - elutriado, água intersticial, interface água-sedimento). Além da realização de ensaios ecotoxicológicos como complementar as análises físico-químicas.

### **Introdução e comportamento dos metais nas diversas matrizes ambientais (água, sedimento e biota)**

A introdução de metais nos sistemas aquáticos ocorre naturalmente através de processos geoquímicos e do intemperismo, enquanto a contribuição atribuída à atividade humana é um reflexo da ampla utilização dos recursos naturais pela atividade industrial (YALE; OLIVEIRA, 1998).

Registro de regiões costeiras impactadas por metais traço encontram-se associados ao crescimento industrial e urbano desordenado, com severas consequências ao meio ambiente. Como principais fatores impactantes, temos a descarga direta de efluentes industriais e da comunidade; descargas de esgotos; despejos de resíduos de navios; carga solúvel em suspensão de rios; precipitação atmosférica; resíduos oriundos da extração de matérias-primas do mar e poluição por indústrias navais (DORNELLES et al., 2000).

#### *Água superficial*

O teor de metais traço tem sido usado como parâmetro para definir o nível de contaminação de ambientes aquáticos, e por isso o volume de dados/informações disponíveis ao longo das últimas décadas é enorme (NIENCHESKI et al., 2008). Quanto

ao monitoramento na água Wallner-Kersanach et al. (2008) afirmam:

Consiste no método mais tradicional, apresentando como vantagens a fácil coleta da amostra e a possibilidade de detecção da contaminação mais recente de metais na coluna d'água. A principal desvantagem está na baixa concentração de metais na água, normalmente variando de miligramas por litro (mg/L) a nanogramas por litro (ng/L) dependendo do metal considerado. Entretanto baixas concentrações podem ocasionar fácil contaminação da amostra durante a coleta e/ou erros no procedimento analítico. Além disso, a dispersão e a variabilidade temporal dos metais em água requerem um número e uma periodicidade maior de amostragens aumentando o custo do monitoramento.

A variação na concentração pode estar relacionada a causas naturais como, por exemplo, o ciclo hidrológico, as correntes, as marés e as chuvas. Porém, fatores antrópicos como a flutuação na vazão ou na composição de efluentes domésticos ou industriais, lançados através de emissários, contribuem para a variação nas medidas das concentrações de metais. Apesar disso, a coluna d'água é a matriz que fornece mais informações sobre a ciclagem dos metais, processos biogeoquímicos dinâmicos e de toxicidade que ocorrem em um sistema particular (NIENCHESKI et al., 2008).

### *Sedimento*

Se a presença de metais na coluna d'água preocupa por sua mobilidade e biodisponibilidade para os organismos (BERNARD, 1977), a presença de metais no sedimento é uma garantia de persistência da contaminação durante períodos muito prolongados (WASSEMAN; WASSEMAN, 2008).

Os estuários, lagunas e baías (e enseadas), fiordes e deltas são formações costeiras que permitem a sedimentação de grandes quantidades de material fino. Quanto à origem dos contaminantes Wasseman et al. afirmam que:

[...] a contaminação por metais seja frequentemente atribuída às indústrias, as fontes prováveis podem ter as mais diversas origens, tanto antrópicas quanto naturais... os sedimentos sofrem transporte antes de virem a se depositar, e é durante este transporte que o sedimento vai se enriquecendo com metais antrópicos[...] Além deste enriquecimento artificial, o material mineral que origina aquele sedimento também contém quantidades naturais de metais, que se apresentam retidos em uma rede cristalina e só são liberados para o ambiente em escala de tempo geológica.

Entretanto, segundo Stumm et al. (1996) a simples presença dos metais em

sedimentos não constitui necessariamente uma ameaça aos organismos desde que estes estejam quimicamente inertes, através de associações com a matriz sedimentar. Os metais podem ficar disponíveis aos organismos uma vez que estejam associados à matriz sedimentar sob formas metabolizáveis ou biodisponíveis.

De acordo com Shaw et al. (1990) um contaminante metálico pode ainda constituir uma ameaça aos organismos, quando associado a fases móveis do sedimento, ou seja, está mais reativo e pode ser facilmente deslocado para fases biodisponíveis.

O monitoramento em sedimento possui a vantagem dos metais ocorrerem em maiores concentrações e com menor variabilidade nesse compartimento quando comparado com a água e a biota. Metais como Al, Fe, Pb e Mn não se encontram em solução na água, mas tendem a se associar ao material particulado em suspensão, podendo esse comportamento variar em função do elemento e classe de água em questão (FÖSTNER, 1981).

Por sua vez, o material em suspensão tende a decantar no sedimento e, geralmente, as concentrações de metais variam pouco nesse compartimento durante um curto período de tempo (LUOMA, 1990).

### *Especiação química*

A especiação de um elemento é a determinação das formas físico-químicas individuais que somadas são iguais à concentração total desse elemento (NAKAHARA, 1983). Nesse grupo incluímos composição isotópica, estado eletrônico ou redox, estrutura molecular ou complexo formado pelo elemento no ambiente (FARIAS et al., 2012).

Saber como um metal se encontra no ambiente é de extremo valor para se determinar como o ambiente aquático está sendo afetado (LEITE, 2002).

A biodisponibilidade, toxicidade e mobilidade dos íons metálicos estão diretamente ligadas à sua especiação. Embora a determinação da concentração total de um elemento represente um dado importante, torna-se cada vez mais necessário o refinamento dessa informação com a avaliação das diferentes formas químicas de um elemento numa determinada matriz (especiação). É fundamental a compreensão de que o grau de toxicidade de um elemento químico em relação aos seres vivos é também atribuído a especiação (OLIVEIRA, 2007).

Geralmente, os metais traço são persistentes, tóxicos, bioacumulativos e estão cada vez mais presentes em ecossistemas aquáticos, em função de atividades antrópicas. Em ambientes aquáticos, metais traço existem em solução, na forma de íons hidratados livres ou complexados por ligantes orgânicos ou inorgânicos. Podem ainda estar presentes na forma sólida, devido às várias associações com sedimentos e com o material particulado suspenso (STUMM; MORGAN, 1996).

A forma de distribuição de uma espécie metálica entre o material particulado em

suspensão e a fração dissolvida (partição) exerce um papel importante na especiação de metais em águas naturais. O conhecimento das condições que controlam a partição permite avaliar até que ponto uma espécie metálica pode ser transferida para uma forma potencialmente biodisponível (LU; ALLEN, 2001).

Os principais processos que controlam a partição de metais entre a fase sólida e aquosa são: precipitação, troca iônica e adsorção. A influência de cada processo sobre a partição depende do tipo de metal, das características do material em suspensão e da composição da coluna de água (SIGG, 1998).

Tanto no material particulado em suspensão quanto na fração dissolvida espécies metálicas podem interagir com uma variedade de ligantes naturais e antropogênicos, formando complexos estáveis e não disponíveis à biota. Os principais constituintes responsáveis pela complexação de metais são formados por estruturas coloidais que são consideradas como dissolvidas. Em ambientes aquáticos naturais, grande parte dos componentes da fração coloidal é formada por substâncias húmicas aquáticas (ZHANG et al., 1996).

### *Biota*

De acordo com James et al. (1994) está bem documentado que animais que vivem em ambientes aquáticos impactados podem adquirir uma carga corporal de poluentes químicos. Essa carga pode variar em cada indivíduo dependendo de fatores tais quais: as propriedades físico-químicas dos poluentes, as rotas de exposição e os constituintes fisiológicos e bioquímicos do animal.

Em se tratando de metais, a captação e o acúmulo nos organismos aquáticos também dependem das propriedades químicas e físicas da água e do sedimento. Além disso, a idade, hábitos alimentares dos animais e a biodisponibilidade do metal na água podem afetar seu acúmulo no organismo. Nos peixes, a absorção dos metais ocorre através de duas rotas: aparelho digestivo (através da dieta) e superfície das brânquias (exposição através da água) (INACIO, 2006).

Inácio (2006) afirma que após serem absorvidos, os metais são transferidos das brânquias e intestinos ao sangue e distribuídos a outras partes do corpo. A distribuição corpórea é inerente a cada metal, pois diferentes metais possuem diferentes padrões de distribuição.

Em seu trabalho Alves et al. (2006) estudaram a distribuição tecidual de chumbo oferecido na dieta de alevinos de truta. Os autores verificaram que a carcaça acumula cerca de 80% do chumbo ingerido, o que se justifica por esse compartimento representar 85 a 90% da massa total do animal. Os restantes 20% se distribuíram no intestino, brânquia, rim, fígado e sangue. Na maior dose administrada, que foi de 21 dias com uma ração contendo 520 µg de Pb/g de massa seca de ração, 99% do chumbo encontrado

no sangue total estava acumulado nos eritrócitos. Os níveis de chumbo nos eritrócitos, nessa mesma dose, atingiram 1,5 µg/g, valor 105 vezes maior do que o encontrado no plasma indicando que o acúmulo de chumbo nos eritrócitos é a principal razão da maior exposição do Ácido Delta-Aminolevulínico Desidratase (ALAD) a este metal.

A toxicidade dos metais para os animais e para o homem, associado à sua capacidade de se bioacumular na cadeia trófica por longo tempo, justificam a determinação do nível destes elementos em organismos aquáticos (FERREIRA et al., 2004).

Silva (2009) disserta que quando níveis elevados são detectados em alimentos como, por exemplo, no pescado, medidas apropriadas devem ser adotadas. Normalmente, recomenda-se cuidado na dieta a fim de reduzir as possibilidades de exposições em longo prazo. Qualquer tipo de medida que implique a redução do consumo de alimento deverá considerar o impacto sobre a dieta total da população envolvida, além do aspecto socioeconômico. A identificação da fonte de contaminação sempre é prioritária, visando adotar medidas que possibilitem a redução dos níveis de contaminação, ou mesmo sua abolição.

Segundo Wallner-Kersanach et al. (2008) se a biodisponibilidade de um contaminante for elevada em determinada localidade isto não implica, necessariamente, a existência de um impacto no ecossistema. Portanto, a ocorrência ou não de efeitos tóxicos para o organismo deve ser analisada através do monitoramento da biota e dos possíveis efeitos biológicos que, de acordo com os autores, compreendem as respostas dos organismos à exposição ao poluente, as quais são agrupadas sob a denominação de biomarcadores.

### **Utilização de bioindicadores e biomarcadores para avaliação da exposição aos metais**

Segundo Oliveira (2000) as análises químicas possuem a vantagem de serem específicas, quantitativas e muito sensíveis. Entretanto, as concentrações de compostos químicos medidas no solo, água e ar não possuem uma significância biológica específica, ou seja, não indicam quais são os efeitos deletérios na biota.

Para contornar este viés são utilizadas ferramentas denominadas indicadores biológicos ou biomarcadores. Biomarcadores podem ser definidos como medidas funcionais de exposição a fatores de estresse expressas no nível biomolecular, fisiológico ou comportamental. Isso abrange medidas moleculares, celulares, genéticas, imunológicas e fisiológicas. Esses biomarcadores são ferramentas de fundamental importância na avaliação dos danos causados pela exposição a substâncias químicas. As pesquisas ecotoxicológicas informam sobre as funções de espécies receptoras, demonstrando uma exposição ambiental a estressores que pode ser relacionada a poluentes oriundos de atividades humanas (AITIO et al., 1999; ADAMS et al., 2001;

GALLOWAY et al., 2006).

O conceito de bioindicador pode ser entendido como entidades estruturais (espécie-sentinela) ou mudanças nos níveis de organização do ecossistema, isto é, a análise biológica de um único indivíduo do ecossistema ou da mudança de comportamento dos indivíduos de uma população. Para a análise biológica de um organismo, no caso um bioindicador, são avaliados os diversos parâmetros: bioquímicos, celulares ou fisiológicos. Nesse caso tais parâmetros são denominados biomarcadores do bioindicador uma vez que essas variáveis irão refletir alterações provenientes da interação entre o poluente e o bioindicador (MCCARTY et al., 1996).

Para Amorim (2001) os biomarcadores podem ser usados na atividade de monitoramento para confirmar a exposição individual ou de uma população a uma determinada substância química e avaliar o risco, quando comparados com uma referência apropriada. A importância do uso desses biomarcadores como parâmetros biológicos de exposição às substâncias químicas deve-se ao fato de eles estarem mais diretamente relacionados aos efeitos na saúde do que os parâmetros ambientais. Por isso, podem oferecer uma melhor estimativa do risco.

Segundo Zhou et al. (2008) esse tipo de monitoramento, ou biomonitoramento, supera as análises químicas por detectar efeitos subletais nos organismos, apresentar respostas à ação de misturas complexas de poluentes e ser sensível às respostas fisiológicas aos contaminantes.

Para Silva (2010), o biomonitoramento pode ser utilizado como análise preditiva mesmo para concentrações não detectáveis de contaminantes pelos métodos instrumentais analíticos, mas suficientes para causar efeitos biológicos devido à exposição crônica, bioacumulação, biomagnificação e ação conjunta. Muitas espécies podem ainda ser utilizadas como bioindicadores em especial animais ou vegetais que indiquem precocemente modificações abióticas ou bióticas do ambiente devido a algum tipo de atividade antrópica.

Em função das divergências apresentadas em relação à quantificação da presença de metais traço em águas superficiais e no sedimento, tem se frequentemente utilizado a técnica de monitoramento biológico. Essa técnica é possível graças a capacidade dos organismos bioacumularem quantidades significativas de metais em seus tecidos ao longo do tempo através da água, alimentação ou de ambas (PHILLIPS; RAINBOW, 1993).

### **Ácido Delta-aminolevulínico Desidratase (ALAD)**

A enzima ALAD é a segunda da via de biossíntese do grupamento Heme e pode ser encontrada em animais vertebrados, invertebrados, bactérias e plantas onde será a

precursora de moléculas de clorofila (ICES, 2005).

Na via de síntese do Heme, a atividade catalítica da ALAD é a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta aminolevulínico com a formação de uma molécula de porfobilinogênio, primeiro precursor do Heme (WETMUR et al., 1986)

A atividade da ALAD, em eritrócitos humanos, tem sido utilizada como uma indicação altamente específica e sensível às exposições ao chumbo, uma vez que a enzima tem alta afinidade in vivo às baixas concentrações de chumbo no sangue. Essa inibição ocorre devido à substituição de  $Zn^{+2}$  por  $Pb^{+2}$  na ligação aos radicais SH do sítio de ligação ao cofator metálico (HAEGER-ARONSEN et al., 1971; GOERING, 1993).

Além de uma ação direta na redução da atividade enzimática, de acordo com Wigfield et al., a ação do chumbo sobre a enzima ALAD nos eritrócitos pode ainda se manifestar através de uma mudança no pH ótimo para valores mais baixos, reduzindo indiretamente sua atividade.

Hodson et al. (1978), no trabalho deles, observaram que a exposição de trutas a 13  $\mu\text{g}/\text{dL}$  resulta além de aumento no hematócrito uma significativa queda da atividade de ALAD.

Santos (2000), em sua obra com injeções intraperitoneais de chumbo em tilápias, verificou que 35% da menor concentração de chumbo administrada encontrava-se nos eritrócitos após 24 horas de exposição. O autor também ressalta uma maior inibição da ALAD eritrocitária quando comparada com a hepática.

Schmitt et al. (2002), ao estudarem o efeito de chumbo liberado por fundições em córregos, concluíram que peixes coletados a jusante das fundições apresentavam maiores cargas corpóreas de chumbo e menor atividade de ALAD quando comparados com animais de sítios não impactados.

### *Acetilcolinesterase*

De acordo com Oliveira (2000) diversos estudos têm informado sobre efeitos inibitórios e algumas vezes também efeitos ativadores de atividade de acetilcolinesterase (AChE) de músculo e cérebro de animais expostos a metais traço. Como para todas as enzimas, a conformação das colinesterases é também perturbada pela presença de metais traço.

Segundo Lopes (2005) as acetilcolinesterases (AChE) são enzimas responsáveis pela rápida hidrólise da acetilcolina (ACh) em acetato e colina nas sinapses colinérgicas, controlando a propagação do impulso nervoso. A principal função da AChE é a hidrólise da acetilcolina (ACh), o mediador das sinapses colinérgicas no sistema nervoso, prevenindo contínuas passagens de impulsos, o que é vital para um normal funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular. Na transmissão sináptica colinérgica é essencial que

a ACh seja degradada rapidamente antes da chegada de um novo impulso elétrico, sendo tal reação mediada pela AChE (STENESH, 1998).

Quando a atividade de AChE é inibida de alguma forma há bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, paralisando as funções vitais devido à sobreposição dos impulsos nervosos, causados pela permanência dos canais de  $\text{Na}^+$  (sódio) abertos (STENESH, 1998).

Frasco et al. (2005) testaram, *in vitro*, as condições de ensaio da enzima em presença de metais (Ni, Cu, Zn, Cd e Hg). Com exceção do Ni todos os metais estudados inibiram a atividade da AChE.

Para Gaitonde et al. (2006) anticolinesterásicos tais como organofosforados, carbamatos e elementos tóxicos (Cd, Pb, Cu etc) se ligam ao sítio catalítico da enzima AChE, evitando inativação fisiológica da acetilcolina levando a um prolongamento anômalo da neurotransmissão. Assim sendo, o uso da AChE nos tecidos muscular e nervoso de peixes tem sido bastante utilizado para avaliar os efeitos da contaminação, pois essa enzima tem ampla disponibilidade e grande quantidade nestes tecidos (STUMM, 1987; OLIVEIRA, 2007).

Bainy et al. (2006) sugerem que, em hepatopâncreas de mexilhões (*Perna perna*), a exposição a metais esteja relacionada ao aumento da atividade enzimática por promovera acúmulo de acetilcolina na sinapse, induzindo assim a síntese *de novo* para mais enzimas AChE.

Em Frasco et al. (2005) foram sugeridos mecanismos que explicam a inibição de colinesterases por  $\text{HgCl}_2$ . Um deles indica a ligação do íon mercúrio às cisteínas livres na enzima que leva a inativação irreversível, como em *Torpedo californica*, enquanto outro mecanismo ocorre de forma mais lenta já que ocorre formação de uma ligação cruzada intra e inter molecular que pode diminuir a inibição da enzima.

Entretanto a avaliação da atividade enzimática em bioindicadores além de demonstrar que a exposição excessiva possui significado clínico ou toxicológico próprio, pode estar associada a um efeito ou uma disfunção do sistema biológico avaliado (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

### *Metalotioneína*

Um grupo especial de proteínas de estresse são as metalotioneínas (MTs), que são induzidas pela presença de metais traço essenciais e metais traço não-essenciais (VAN DER OOST et al., 2003).

Viarengo (1999) destaca que dentro do organismo dos animais alguns íons metálicos se ligam a metalotioneínas e se acumulam em lipofucinas ou em grânulos amorfos. Para Nordberg (1987), Metalotioneínas (MTs) são uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular, em torno de 6 – 7 kDa, e sua estrutura molecular

é composta de uma única cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas, que representam em torno de 30% do total de aminoácidos. Livre de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, a estrutura da MT possui dois domínios que consistem, em geral, de um cluster com três (domínio b) e um com quatro átomos (domínio a) de metal ligados. A abundância de ligantes tióis dos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere à proteína uma alta afinidade por íons metálicos livres, o que faz das MTs, proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico.

Segundo Muto et al. (1999) a função fundamental das Melatoltioneínas:

[...] nos sistemas vivos não tem sido bem esclarecida, embora existam várias hipóteses que incluem a ação como metalochaperones para transportar íons metálicos para outras proteínas, controle da concentração de elementos traços livres como zinco (Zn) e cobre (Cu), estocagem e armazenamento, ação como agente de detoxificação para metais como cádmio (Cd) e mercúrio (Hg), e também um papel protetor por seqüestro de metais e proteção contra condições de stress. Por isso, a MT é uma importante proteína no metabolismo intracelular de Cu e Zn e na proteção contra danos oxidativos resultantes da exposição excessiva a metais.

Viarengo (1997) afirma que a possibilidade da utilização de MTs como biomarcador da exposição a metais tem sido estudada e empregada em diferentes espécies de animais aquáticos para a avaliação do impacto ambiental.

Em programa de monitoramento de poluição realizado na Costa Ibérica do Mar Mediterrâneo (MEDPOL) a espécie *Mullus barbatus* teve indução hepática dos níveis de metalotioneína que se correlacionaram melhor com os níveis de Cu e Cd do sedimento (BENEDICTO et al., 2005).

### *Teste de micronúcleo*

De acordo com Jesus et al. (2008) estudos recentes apontam muitos metais atuando em ciclo redox que são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (EROS), que geram estresse oxidativo, induzem a peroxidação de lipídios e alteração na homeostasia de diversos minerais essenciais. Podendo ainda causar outros danos como alteração de diversas rotas metabólicas, incluindo aquelas que fazem reparos DNA conhecido como efeito genotóxico.

A contaminação do ambiente por metais traço tem aumentado e a análise de efeitos citotóxicos tem sido aplicada pelo fato dos metais serem potenciais agentes mutagênicos e tumorigênicos em animais e humanos (MAJER et al., 2002).

Ainda segundo Jesus et al. (2008) o emprego de parâmetros genotóxicos,

principalmente em organismos aquáticos como forma de avaliação da qualidade hídrica, permite avaliar o efeito dos poluentes no meio hídrico, bem como alterações de seu potencial tóxico ou genotóxico.

Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática com os aspectos de pequenos núcleos, constituídos principalmente por fragmentos cromossômicos ou por cromossomos retardados durante a migração anafásica, que se detectam em células interfásicas mediante técnicas simples de coloração, aparecendo, no citoplasma, como pequenos fragmentos basófilos. (GARCIA-RODRÍGUEZ, 2001).

Para Fagr (2008), por conta do dano genético resultante da quebra ou anormalidades no cromossomo, ocorre a formação que pode servir como índice para evidenciar alguns danos. A contagem de micronúcleos por ser muito mais rápida e menos exigente tecnicamente em relação à pontuação de aberrações cromossômicas tem sido amplamente utilizada para a identificação de produtos químicos que venham a causar este tipo de dano à célula.

Lemos et al. (2001) verificaram aumento na frequência de micronúcleos de eritrócitos de *Pimephales promelas* em presença de cromo hexavalente (Cr <sup>+6</sup>). O estudo realizado com tilápias (*Oreochromis niloticus*) coletadas em um córrego na cidade de Franca (São Paulo, Brasil) detectou diversos efeitos genotóxicos provocados por cromo detectado no local (MATSUMOTO, 2006). Além do cromo, o selênio, o mercúrio e metil-mercúrio podem ser desencadeadores do efeito clastogênico (quebra de cromossomos) que determina a formação dos micronúcleos de eritrócitos de peixes (Al-Sabit, 1995). Çavas et al. (2005) expuseram duas espécies de peixes (*Cyprinus carpio* e *Carassius gibelio*) a cromo (Cr), cádmio (Cd) e cobre (Cu) por 21 dias, verificando a formação de micronúcleos em eritrócitos periféricos sanguíneos, brânquias e fígado.

### **Conclusão**

Os programas de monitoramento que visam avaliar impacto ou riscos provenientes do aporte de metais tóxicos podem ganhar importante reforço na utilização dos biomarcadores. Esses se apresentam como ferramenta de auxílio complementando o rol de análises químicas que garantem o melhor diagnóstico do ambiente estudado. A análise físico-química da água e a de metais em sedimento e biota compõe a clássica abordagem na detecção dos metais no ambiente aquático. Aliadas a essas, as avaliações que utilizem biomarcadores nos organismos aquáticos, são metodologias que garantirão também uma abordagem preditiva ao ambiente em concentrações subletais destes metais. A nossa legislação ainda não acompanhou as mudanças em outros países, entretanto o aumento dos estudos neste campo de pesquisa servirá de base para futuras inserções nas leis ambientais vigentes em nosso país.

## Referências

ADAMS, S. M.; GIESY, J. P.; TREMBLAY, L.; A, EASON, C. T. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. Biomarkers, v. 6, n. 1, p.1-6, 2001.

AITIO, A.; KALLIO, A.; Exposure and Effect Monitoring: A Critical Appraisal of their Practical Application. Toxicol Lett, v. 108, n.2-3, n. 137-147, 1999.

AL-SABIT, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mut Res, v. 343, n. 2-3, p. 121-135, 1995.

ALVES, L. C.; GLOVER, C. N.; WOOD, C. M. Dietary Pb Accumulation in Juvenile Freshwater Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., v. 51, n. 4, p. 615-625, 2006.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. Rev Bras Epidemiol, v. 6, Supl.1, p.1-13, 2003.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. Ainda uma vez a ética e a ética ambiental. Rev. Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v.3, n.2, p. 2-9, 2010.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. 2003.

BAINY, A. C. D.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. ALMEIDA, E. A. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the Perna perna mussel's digestive gland. Biotemas, v. 19, n. 1, p. 35-39, 2006.

BAIRD, C. Química Ambiental. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BENEDICTO, J.; MARTÍNEZ GÓMES, C.; CAMPILLO, J.; Induction of metallothioneins in *Mullus barbatus* as specific biomarker of metal contamination: a field study in the western Mediterranean. Cienc Mar, v. 31, n. 1B, p. 265-274, 2005.

BERNARD, A. M. Effects of heavy metals in the environment on human health. In: PROST, R. (ed.). Les colloques. Paris: INRA Editions, 1997. p. 21-34.

BIRD, E. Coastal Geomorphology: an Introduction. London, UK: Wiley Europe 2000. p. 340.

BRASIL. Instrução normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,

Brasília, DF, 22 dez. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto n° 55.871, de 26 de março de 1965. Estabelece normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 abr. 1965.

BRASIL. Portaria n° 11 DE 1987. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária - MS. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 15 maio 1987.

BRASIL. Portaria n° 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 dez.2011.

BRASIL. Portaria n° 685, de 27 de agosto de 1998. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 ago. 1998.

BRASIL. Resolução n° 421, de 03 de fevereiro de 2010. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 4 fev.2010.

BRASIL. Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 maio 2005.

ÇAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. Food Chem Toxicol, v. 43 p. 569–574, 2005.

DORNELLES, L. M.; CALACHE, S. C.; DIAS, A. E. S.; MENDONÇA, B.S.; CRISTELLO, K.A.; BARROS, C. L. M. Uso do geoprocessamento no diagnóstico ambiental de ambientes costeiros. In: WORKSHOP BRASILEIRO DE GEOINFORMATICA, 3., 2000, Rio de Janeiro. p. 137-154.

FAGR, K. A.; EL-SHEHAWI, A. M.; SEEHY, M.A. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. Afr. J. Biotechnol., v. 7, p. 606-612, 2008.

FARIAS, J.; MILANI, M. R.; NIENCHESKI, L. F. H.; PAIVA, M. L. Especificação química de arsênio inorgânico no estuário da Laguna dos Patos (RS, Brasil). Quím. Nova, v. 35, n. 7, p. 1401-1406, 2012.

FERREIRA, G. A.; MACHADO, A. L. S.; ZALMON, L. R. Temporal and Spatial Variation on

Heavy Metal Concentrations in the bivalve *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) on the Northern Coast of Rio de Janeiro State, Brazil. Sci. Total Environ. v. 47, n. 2, p.319-327. 2004.

FÖSTNER, U. Metal pollution assessment form sediment analysis. In FÖSTNER, U.; WHITMANN, G. T. W. (eds). Metal pollution in the aquatic environment. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1981. p.110-194.

FRASCO, M. F.; FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. Biomarkers, v. 10, n. 5, p. 360-375. 2005.

GAITONDE, D.; SARKAR, A.; KAIZARY, S.; SILVA, C.D.; DIAS, C.; RAO, D. P.; RAY, D.; NAGARAJAN, R.; DE SOUZA, S. N.; SARKER, S.; PATILL, D. Acetylcholinesterase activities in marine snail (*Cronia contracta*) as a biomarker of neurotoxic contaminants along the Goa coast, West coast of India. Ecotoxicology, v. 15, n 4, p. 353 -358, 2006.

GALLOWAY, T. S. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. Mar Pollut Bull, v. 53, n. 10-12, p. 606-613, 2006.

GARCIA-RODRÍGUEZ, M. C.; LÓPEZ-SANTIAGO, V.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. Mutat Res, v. 496, n 1-2, p. 145-151, 2001.

GOERING, P. L. Lead Protein Interaction as a Basis for Lead Toxicity. Neurotoxicology, v. 14, n. 2-3. p. 45-60, 1993.

HAEGER-ARONSEN, B.; ABDULLA, M.; FRISTEDT, B. I.; Effect of lead on -aminolevulinic acid dehydrase activity in red blood cells. Arch. Environ. Health, v. 23, n. 6, p. 440-445, 1971.

HODSON, P. V.; BLUNT, B. R.; SPRY, D. J.; Chronic toxicity of waterborne and dietary lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Lake Ontario water. Water Res, v. 12, n. 10, p. 869-878, 1978.

HUTTON, M. Human Health Concerns of Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic. In: HUTCHINSON, T. C.; MEEMA, K. M. LEAD (Eds). Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment. John Wiley & Sons, 1987. p.53-68.

INACIO, A. F. Metalotioneína e Metais em *Geophagus brasiliensis* – Acará. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

INTERNATIONAL council for the exploration of the sea. Biological effects of contaminants: Quantification of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in fish blood. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, 2004.

JAMES, M. O.; KLEINOV, K. M. Trophic transfer of chemicals in the aquatic environment. In: MALINS, D. C.; OSTRANDER, G. (eds) Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives. USA, Lewis Publishers 1994; p. 135.

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

LEITE, M. A. Análise do Aporte, da taxa de sedimentação e da concentração de metais na água, plâncton e sedimento do reservatório de Salto Grande, Americana-SP. Tese (Doutorado) - Engenharia Ambiental da USP, São Carlos, 2002.

LEMO, C. T.; RÖDEL, P. M.; TERRA, N. R.; ERDTMANN, B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. Environ Toxicol Chem, v. 20, n. 6, p. 1320-1324, 2001.

LOPES, R. M. Colinesterases de músculo e cérebro de peixes teleósteos como biomarcadores. Tese (Doutorado) -Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2005.

LU, Y.; ALLEN, H. E. Partitioning of copper onto suspended particulate matter in river waters. Sci. Total Environ., v. 277, n.1-3, p. 119- 132, 2001.

LUOMA, S N. Processes affecting metal concentrations in estuarine and coastal marine sediments. In RAINBOW, R. W. F. A. P. S.(ed.) Heavy metals in the marine environment. Boca Raton, Florida CRC Press, 1990. p. 51-66.

MAJER, B. J.; TSCHERKO, D.; PASCHKE, A.; WENNRICH, R.; KUNDI, M.; KNASMULLER, S. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: A comparative investigation. Mutat Res, v. 515, n. 1-2, p. 111-124, 2002.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, A. M. I.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. Genet Mol Biol, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MCCARTY, L. S.; MUNKITTRICK, K. R. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? Hum Ecol Risk Assess, v. 2, n. 2, p. 268-274, 1996.

MUTO, N.; REN, H. W.; HWANG, G. S.; TOMINAGA, S.; ITOH, N.; TANAKA, K. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by airpumping stress, dexamethasone, and metals. Comp Biochem Physiol, v. 122, n. 1. p. 75-82, 1999.

NAKAHARA, T. Applications of Hydride Generation Techniques in Atomic Absorption, Atomic Fluorescence and Plasma Atomic Emission Spectroscopy. Prog. Analyt. Atomic Emission Spectrometry, v. 6, p. 163-223, 1983.

NIENCHESKI, L. F.; MILANI, M. R.; MILANI, I. Metais traço: Água. In: Baptista-Neto JA, Walner-Kersanach M, Patchineelam SM. Poluição Marinha. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p.412.

NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. Talanta, v. 46, n. 2, p. 243-254, 1998.

OLIVEIRA, M. M. Potencial da Acetilcolinesterase cerebral de peixes marinhos como biomarcadora de exposição a pesticidas. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2000.

OLIVEIRA, M. R. Investigação da contaminação por metais pesados da água e do sedimento de corrente nas margens do rio São Francisco e tributários, a jusante da represa da CEMIG, no município de Três Marias, Minas Gerais. Tese (Doutorado) - Instituto de Geociências, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

PHILLIPS, D. J. H.; RAINBOW, P. S. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. London: Elsevier Applied Science, 1993. p.371.

SANTOS, C. R. Ácido delta aminolevulínico desidratase (ALAD) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) na biomarcação do impacto ambiental por chumbo. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000. p.48.

SCHMITT, C. J.; CALDWELL, C. A.; OLSEN, B.; SERDAR, D.; COFFEY, M. Inhibition of erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (alad) activity in fish from waters affected by lead smelters. Environ Monit Assess, v. 77, n. 1, p. 99-119, 2002.

SHAW, T. J.; GIESKES, J. M.; JAHNKE, R. A. Early diagenesis in differing depositional

environments: The response of transition metals in pore water. Geochim Cosmochim Acta, v. 54, n. 5, p. 1233-1246, 1990.

SIGG, L. Partitioning of metals to suspended particles. In: ALLEN, H. E.; GARRISON, A. W.; LUTHER III, G. W. (Ed). Metals in surface waters. Chelsea: Ann Arbor Press, 1998. p. 221-239.

SILVA, C. Metais Pesados em peixes (Micropogonias furnieri e Cynoscion acoupa) E OSTRAS (Crassostrea brasiliiana), oriundos da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ, 2009.

SILVA, J. C. Biomarcadores morfológicos e análise química da bile em peixes para a avaliação da qualidade da água do rio Iguaçu. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2010.

SOLOMON, F. Impacts of metals on aquatic ecosystems and human health. Mining.com: a mine of information. 2008. p.14-19.

STENESH, J. Biochemistry. In: COSTA, JRMA. Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR). 1998.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. 2<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley & Sons – Wiley Interscience Publications 1996. p.780.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. Mar Environ Res, v. 47, n. 4, p. 389-398, 1999.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol, v. 13, n. 2, p. 57-149. 2003.

VENEZUELA, T. C. Determinação de Contaminantes Metálicos (Metal Tóxico) num solo adubado com composto de lixo em área olerícola no município de Nova Friburgo- R.J. Dissertação (Mestrado) - Escola de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, 2001. p. 96.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; DONDERO, F.; MARRO, A.; FABBRI, R. Metallothionein as a tool in biomonitoring programs. Biomarkers, v. 4, n. 6, p. 455–466, 1999.

VIARENCO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, F. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antarctic molluscs. Mar Environ Res., v. 44, n. 1, p. 69-84, 1997.

WALNER-KERSANACH, M.; BIANCHINI, A. Metais traço em organismos: monitoramento químico e de efeitos biológicos. In: BAPTISTA-NETO, J. A.; WALNER-KERSANACH, M.; PATCHINEELAM, S. M. Poluição Marinha. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p.412.

WASSEMAN, J. C.; WASSEMAN, M. A. Comportamento de metais em sedimentos In: BAPTISTA-NETO, J. A.; WALNER-KERSANACH, M.; PATCHINEELAM, S. M. Poluição Marinha. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

WETMUR, J.; BISHOP, D.; CANTELMO, C.; DESNICK, R. J. Human d-Aminolevulinatase Dehydratase: Nucleotide Sequence of a Full-length cDNA Clone. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 83, n. 20, p. 7703-7701, 1986.

WIGFIELD, D. C.; FARANT, J. P. Assay of d-Aminolevulinatase Dehydratase in 10ml of Blood. Clinical Chems, v. 27, n. 1, p. 100-103, 1981.

YALE, M.; OLIVEIRA, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. Quim Nova, v. 21, n.5, p. 551-556. 1998.

ZHANG, Y. J.; BRYAN, N. D.; LIVENS, F. R.; JONES, M. N. Complexing of metal ions by humic substances. In: GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A.; CLARK, S. B. Humic and fulvic: isolation, structure and environmental role. New York: Wiley & Sons, 1996. p. 194-206.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Anal Chim Acta, v. 606 n. 2, p. 135-150, 2008.

*Artigo recebido em: 1 fev. 2013*

*Aceito para publicação em: 12 ago. 2013*