UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Variações inter-individuais em biomarcadores de
exposição ao mercúrio em uma população ribeirinha do
rio Tapajós, Pará**

Aretha Rodrigues Schulz

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Variações inter-individuais em biomarcadores de exposição ao mercúrio
em uma população ribeirinha do rio Tapajós, Pará

Aretha Rodrigues Schulz

Ribeirão Preto - SP

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Variações inter-individuais em biomarcadores de exposição ao mercúrio
em uma população ribeirinha do rio Tapajós, Pará

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção título de Mestre
em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia.

Aluna: Aretha Rodrigues Schulz
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa
Júnior

Ribeirão Preto - SP

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Schulz, Aretha Rodrigues

Variações inter-individuais em biomarcadores de exposição ao mercúrio em uma população ribeirinha do rio Tapajós, Pará
Ribeirão Preto, 2009.

54p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração:
Toxicologia.

Orientador: Barbosa, Fernando Jr.

1. Biomarcadores de Exposição. 2. Mercúrio. 3. Variações interindividuais.

Aretha Rodrigues Schulz

Variações inter-individuais em biomarcadores de exposição ao mercúrio em uma população ribeirinha do rio Tapajós, Pará

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção título de Mestre em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia.

Aluna: Aretha Rodrigues Schulz
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

A Deus, por me conceder mais uma oportunidade de crescimento e força para superar os desafios ao longo desta caminhada.

Aos meus queridos pais e eternos incentivadores Arthur e Elizabeth, pelos inúmeros conhecimentos, e aos meus irmãos Arthur e Amanda. Vocês são os responsáveis por esta vitória.

Ao meu querido companheiro Carlos Henrique por todo amor, apoio e compreensão. Dedico esta conquista a você também.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Ao professor Fernando Barbosa Júnior, pelo exemplo, paciência, empenho e presteza. Meu mais profundo agradecimento e minha admiração por sua competência.

Aos colegas de laboratório, pelo apoio sempre presente, pelos momentos de trocas, descontração e agradável convívio.

Aos funcionários da CPG, especialmente à Ana, pela competência em lidar com a parte burocrática e prontidão na resolução de problemas.

Enfim, a todos que de alguma forma acreditaram, contribuíram e estiveram presentes durante esta etapa. A todos eles registro minha gratidão.

Todas as substâncias são venenos, não existe nada que não seja veneno.
Somente a dose correta diferencia o veneno do remédio.
Paracelsus (1493 – 1541)

RESUMO

SCHULZ, A.R. **Variações inter-individuais em biomarcadores de exposição ao mercúrio em uma população ribeirinha do rio Tapajós, Pará.** 2009. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo-2009.

O mercúrio (Hg) é um metal tóxico extensamente estudado em todo mundo, distribuído no ambiente a partir de fontes naturais ou antropogênicas e que oferece risco a população por ser altamente biocumulativo e possuir efeitos nocivos à saúde. Até algum tempo atrás, acreditava-se que a principal fonte de exposição ao Hg na Região Amazônica, decorria do uso deste metal para amalgamação de ouro nos garimpos da região. No entanto, o Hg é encontrado naturalmente nos solos da Região Amazônica e ao atingir os sistemas aquáticos, favorecidos principalmente pela erosão e pelas chuvas, passa por um processo de metilação catalisada por microorganismos, dando origem à forma orgânica do metal, o metilmercúrio (MeHg). Esta forma do metal se acumula no sedimento dos rios e em peixes representando atualmente a principal fonte de exposição ao mercúrio em população ribeirinha. Os biomarcadores de exposição ao Hg são freqüentemente utilizados para identificar e estimar o risco em que um indivíduo ou uma população está exposta. No entanto, pouco se conhece a respeito das variações inter-individuais de cada um deles. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar as variações inter-individuais em biomarcadores de exposição ao Hg em uma população ribeirinha do rio Tapajós, Pará. Para tal, 410 ribeirinhos, residentes em 12 comunidades ao longo do rio Tapajós, no estado do Pará participaram do estudo. Foram determinadas as concentrações de mercúrio total (THg) em sangue total, plasma, eritrócito, urina e de IHg e MeHg em cabelo dos voluntários. As concentrações de THg no sangue total variaram de 1,7 a 288,9 µg/L e no plasma de 0,2 a 40,0 µg/L. A concentração de THg no plasma apresentou uma alta correlação com as concentrações de THg em sangue total ($r=0,7529$, $p<0,0001$). A fração plasmática de THg variou 0,5% a 61% e não apresentou qualquer correlação com as concentrações de THg em sangue total ($r=0,06284$, $p=0,2041$), indicando que a mobilização de THg para o plasma não ocorre devido à saturação dos eritrócitos. A distribuição de THg entre eritrócitos e plasma observada nesta população, é diferente do que foi observado em outros estudos sobre exposição à MeHg. As concentrações de THg no cabelo variaram de 0,97 a 62,4 µg/g e apresentaram uma correlação muito forte com as concentrações no sangue ($r=0,8718$, $p<0,0001$) indicando que as concentrações de THg no cabelo refletem as concentrações de THg no sangue. Também foi observada uma forte correlação entre as concentrações de MeHg e de IHg no cabelo ($r=0,8979$, $p<0,0001$), confirmando as informações da literatura, que sugerem que a fração de IHg no cabelo se deve a demetilação no sangue, no folículo capilar ou no preparo da amostra e análise. Em relação a razão entre concentração de mercúrio entre cabelo e sangue, observamos uma elevada variação entre os indivíduos, de 1:13 a 1:13274. Entre as mulheres observamos que esta variação ocorre de acordo com a idade. Resultados preliminares apontam para uma considerável variação inter-individual nos biomarcadores de exposição na população em estudo, indicando a necessidade de se identificar os fatores que influenciam este achado. Considerando a cinética do mercúrio, podemos concluir que estas variações inter-individuais na fração plasmática, podem alterar a taxa de eliminação do Hg e também os efeitos tóxicos decorrentes da exposição.

Palavras- Chave: biomarcadores de exposição, mercúrio, variações inter-individuais

ABSTRACT

SCHULZ, A.R. **Inter-individual variations of mercury exposure biomarkers in a population of the Tapajós river, Pará.** 2009. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo-2009.

Mercury (Hg) is a toxic metal widely studied worldwide. In the atmosphere Hg may occur due to natural or anthropogenic sources. It offers risk to the population due to be highly bioaccumulated and to cause harmful effects to humans. Gold Mining activities were considered in the past the main sources of Hg contamination in the Amazon region. However, new findings indicated that Hg is naturally found in the soils of the Amazon area. When reaching the aquatic systems, facilitated mainly by the erosion and for the rains, the inorganic mercury is methylated, by microorganisms, forming the more toxic form methylmercury (MeHg). This form of the metal accumulates in the sediment of the rivers and in fish, meaning the main exposure source of mercury to riverine population. Biomarkers of exposure to Hg (levels of Hg in blood, plasma, urine, hair) are frequently used to identify and to estimate the risk of an individual or a population to harmful effects. However, little is known regarding the inter-individual variations of these biomarkers. In this sense, this study evaluated inter-individual variations in the biomarkers of exposure to mercury (Hg in plasma, blood, urine and hair) in a riverside population (Tapajós river, Pará). Volunteers (n=410), residents in 12 communities along the Tapajós river, in the state of Pará participated in the study. Total mercury (THg) levels were determined in whole blood, plasma, red blood cells and urine and of IHg and MeHg in hair. The concentration of mercury ranged from 1.7 to 288.9 µg/L and of plasma from 0.2 to 40.0 µg/L. The concentration of THg in the plasma presented a high correlation with concentrations of Hg in total blood ($r=0.7529$, $p<0.0001$). The plasmatic fraction of THg ranged from 0.5% to 61% and did not present any correlation with the concentrations of THg in the whole blood ($r=0.06284$, $p=0.2041$), indicating that the mobilization of Hg to the plasma does not occur to the saturation of the red blood cells. The distribution of THg between red blood cells and plasma observed in this population is in disagreement when compared to other populations. The mercury concentrations in hair ranged from 0.97 to 62.4 µg/g and presented a very strong correlation with the whole blood ($r=0.8718$, $p<0.0001$), indicating that the concentrations of Hg in hair reflect the concentrations of THg in blood. Also a strong correlation was observed among the concentrations of MeHg and of IHg in hair ($r=0.8979$, $p<0.0001$), confirming the information in the literature, that suggest the fraction of IHg in hair is due to demethylation process or by sample preparation and analysis. Regarding the ratio between concentration of mercury between hair and blood, we observed a high variation between individuals, ranged from 1:13 to 1:13274. Among the women we observed this variation occurring according to age. In conclusion our results together demonstrated a considerable inter-individual variation in the biomarkers of exposure to mercury in the study population, demonstrating probably a different rate of biotransformation and elimination of Hg in this population. Then, future studies are necessary to elucidate factors are influencing this variation.

Keywords: exposure biomarkers, mercury, inter-individual variations

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da rota cinética do Metilmercúrio no organismo	6
Figura 2. Mapa das comunidades de Itaituba participantes do estudo	21
Figura 3. Correlação de Spearman entre concentração de mercúrio plasmático em relação a concentração de mercúrio em sangue total	26
Figura 4. Correlação de Spearman entre a fração plasmática de mercúrio total em relação a concentrações de mercúrio total em sangue total	27
Figura 5. Correlação de Spearman entre mercúrio total em cabelo em relação a concentrações de mercúrio total em sangue total	28
Figura 6. Correlação de Spearman entre mercúrio inorgânico e orgânico no cabelo	28
Figura 7. Correlação de Spearman entre fração plasmática de mercúrio total no plasma e excreção urinária de mercúrio total, corrigida por creatinina	29
Figura 8. Correlação de Spearman entre mercúrio total no plasma e mercúrio total em urina sem correção por creatinina	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações médias de mercúrio na população ribeirinha do rio Tapajós - Pará.....	30
Tabela 2. Concentrações de mercúrio total nos biomarcadores de exposição na população ribeirinha do rio Tapajós – Pará, divididos por gênero e idade.....	31
Tabela 3. Concentrações de mercúrio nos biomarcadores de exposição na população ribeirinha do Tapajós – Pará, divididos por comunidades.....	33
Tabela 4. Razão entre concentração de mercúrio em sangue e cabelo	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Hg	Mercúrio
MeHg	Metilmercúrio
IHg	Mercúrio inorgânico
THg	Mercúrio total
ICP-MS	Espectrômetro de massas com plasma acoplado
g/L	Gramas por litro
v/v	Volume/volume
SNC	Sistema nervoso central
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-s-transferase
®	Marca registrada
M Ω .cm	Unidade de condutividade elétrica
%	Porcentagem
μ L	Microlitros
$\pm$	Mais ou menos
mg	Miligramas
mL	Mililitros
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Exposição ao mercúrio e seus impactos à saúde humana.....	2
1.2 Toxicocinética do mercúrio.....	4
1.2.1 Substâncias que alteram a toxicocinética do mercúrio.....	8
1.3 Exposição ao mercúrio na Região Amazônica.....	9
1.4 Biomarcadores de exposição a agentes tóxicos.....	11
1.4.1 Biomarcadores de exposição ao mercúrio.....	12
1.5 Relação entre a concentração de mercúrio em biomarcadores de exposição ...	14
1.6 Variações inter-individuais nas concentrações de mercúrio entre os biomarcadores de exposição.....	14
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos gerais.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Modelo de estudo.....	21
3.2 Local de estudo.....	21
3.3 Seleção de voluntários.....	22
3.4 Reagentes e solventes.....	22
3.5 Coleta e armazenamento das amostras.....	23
3.6. Determinação de mercúrio.....	23
3.7 Validação dos resultados.....	24
3.8 Análise estatística.....	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Mercúrio em sangue e suas frações.....	26
4.2 Mercúrio em cabelo.....	27
4.3 Mercúrio em urina.....	29
4.4 Variável idade.....	30
4.5 Variável gênero.....	31
4.6 Variável comunidades.....	32
4.7 Razão entre concentração de mercúrio no sangue e no cabelo.....	34
5 DISCUSSÃO	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7 REFERÊNCIAS	42

1.1 Exposição ao mercúrio e seus impactos à saúde humana

O mercúrio é um metal comprovadamente bioacumulativo, cujo efeito nocivo para a saúde humana já foi extensamente comprovado (MERGLER et al., 2007; CLARKSON & MAGOS, 2006; AKAGI et al., 1995; CLARKSON, 1972). Este elemento químico é encontrado naturalmente no meio ambiente nas formas de mercúrio metálico (Hg^0), mercúrio inorgânico (IHg) ou mercúrio orgânico (principalmente como metilmercúrio, MeHg).

Dependendo das condições físico-químicas, o mercúrio que alcança o meio ambiente pode se transformar em diferentes formas químicas (ULLRICH et al., 2001), cada uma apresentando potencial tóxico bem diferenciado, onde a forma orgânica é atualmente considerada de maior relevância devido ao fato de possuir maior potencial de absorção e toxicidade (D'ITRI, 1972).

A principal fonte de exposição à forma metálica é o amálgama dentário. Já a forma orgânica é encontrada em peixes e também em alimentos de origem marinha, após um processo de metilação da forma inorgânica, ainda em água, por algas e bactérias aquáticas (ERCAL, 2001).

O mercúrio presente no solo, sob a forma de IHg, não é capaz de causar danos à saúde pois é fracamente absorvido pela pele. No entanto, quando é liberado no ambiente aquático e atinge os ecossistemas aquáticos, pela erosão favorecida pelo desmatamento, e na presença de certas bactérias denominadas metalogênicas, é metilado e transformado na forma orgânica, o metilmercúrio (FADINI & JARDIM, 2001).

As raízes de plantas macrófitas aquáticas flutuantes, comuns nos sistemas aquáticos de regiões tropicais, retêm partículas em suspensão na água e são colonizadas por microalgas e bactérias. Nesse microambiente, a intensa atividade microbiana e a produção de compostos húmicos e fúlvicos, que podem fornecer radicais metil, parecem favorecer a metilação do mercúrio. Como estas raízes representam para os peixes uma fonte essencial de carbono, os peixes passam parte da vida próximos a elas e a bioacumulação de metilmercúrio, mais disponível nesse ambiente que no sedimento de fundo é facilitada (MARINS, et al., 1998). A metilação de mercúrio junto a estas raízes, é uma das peculiaridades do ciclo do

mercúrio em ambientes tropicais como o que ocorre nos solos da Amazônia (MAURO et al., 1999, GUIMARÃES et al., 1998).

Após a metilação do mercúrio, este passa a ter a capacidade de se dissolver na água e pode ser incorporado pelo plâncton, entrando assim na cadeia alimentar aquática (MAURO et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2000), e em seguida se acumulando em peixes (ROULET et al., 1998; 1999, FARELLA, 2001; FARELLA, 2005; DÓREA et al., 2006). O mercúrio é capturado diretamente da água, quando é absorvido pelas brânquias, junto com o oxigênio, na troca gasosa do processo de respiração. O Hg também é absorvido pelo trato gastrointestinal a partir do alimento consumido pelo peixe contendo o metal e é excretado naturalmente pelo animal por meio de mecanismos de eliminação e durante a desova, pois no material reprodutivo pode ser observada uma determinada concentração considerável de Hg. O mercúrio também sofre um processo de diluição à medida que o peixe aumenta seu tamanho. Quando o fluxo total de mercúrio da entrada supera o da saída, o metal é acumulado (TRUDEL & RASMUSSEN, 2001). Este processo constitui o fenômeno de biocumulação (acúmulo em organismos vivos) desse metal, que se explica principalmente pela alta afinidade por gorduras e proteínas, e também pela baixa taxa de eliminação desse elemento no organismo (MEILI, 1991). Além disso, é reconhecido que as concentrações de Hg nos organismos aumentam ao longo das cadeias tróficas (CABANA & RASMUSSEN, 1994; ATSDR, 1999).

Na Região Amazônica, o processo de biomagnificação (acúmulo ao longo da cadeia alimentar) do Hg já foi várias vezes identificado (BARBOSA, 1995; MALM et al., 1995; SAMPAIO DA SILVA, 2002; SAMPAIO DA SILVA et al., 2005; BASTOS et al., 2006; DÓREA et al., 2006).

Nos organismos do topo da cadeia alimentar aquática, tais como os peixes carnívoros, quase todo o mercúrio acumulado está na forma metilada (BOUDOU & RIBEYRE, 1984) e ligado a cisteína no tecido muscular. As espécies orgânicas de mercúrio circulam no sangue por um longo período, e gradualmente se acumulam nos rins, fígado e sistema nervoso central (SNC), onde os efeitos tóxicos são mais pronunciados. A meia vida biológica do MeHg é de 50 a 70 dias e sua eliminação do corpo acompanha uma cinética de primeira ordem (MITCHELL et al., 2005).

As manifestações clínicas da intoxicação por mercúrio podem ser agudas ou crônicas. A aguda produz um quadro que varia de leve a letal, com vômitos freqüentes, tremores, ataxia, parestesia, paralisia, perda de voz, cegueira, coma e

morte. A intoxicação crônica afeta principalmente SNC, causando parestesia, ataxia, dificuldade de articular palavras, sensação generalizada de fraqueza, fadiga e incapacidade de concentração, perda de visão e audição, coma e morte (COUNTER & BUCHANAN, 2004; NRC, 2000). Os efeitos clínicos, porém, não são imediatos.

No caso de exposição ambiental, o período latente pode chegar a 10 anos, e, é inversamente proporcional ao nível de exposição. Há relatos de caso, nos quais os sintomas clínicos pioram com o tempo e continuam apesar de se reduzir ou interromper a exposição. O MeHg tem efeito teratogênico, com alterações irreversíveis para o feto, mesmo sem o aparecimento de sintomas na mãe. Os sintomas observados em neonatais e crianças, devido à exposição pré-natal, são a paralisia cerebral, distúrbios mentais, retardamento do desenvolvimento de várias funções psicomotoras, convulsões, cegueira e má-formação interna e externa dos ouvidos (IGATA, 1991).

Um dos casos mais conhecidos de intoxicação por mercúrio aconteceu em Minamata no Japão em 1956. Após o lançamento de elevadas quantidade de mercúrio na Baía de Yatsushiro por uma indústria de polímeros, os micro-organismos presentes no local metilaram o IHg, resultando em um acúmulo de MeHg na fauna da Baía. Após alguns anos, a contaminação da água e dos organismos aquáticos tiveram consequências drásticas para a população local, que tinha como base de sua dieta o pescado. Vários efeitos tóxicos decorrentes da contaminação passaram a serem observados na população local, que consumia os peixes da Baía. Foram relatados 2520 casos de intoxicação, dos quais 1043 resultaram em óbitos (HARADA, 1995).

1.2 Toxicocinética do mercúrio

Estudos experimentais em adultos desde a década de 70, sugerem que cerca de 95% do MeHg ingerido a partir de peixe, alcançam o sangue (WHO, 1990; BORNMANN et al., 1970). O MeHg no peixe, está sob forma de um complexo metilmercúrio-cisteína, que está conjugado no tecido muscular (HARRIS et al., 2003).

Após a distribuição aos tecidos, em aproximadamente 30 horas, cerca de 5% da dose absorvida permanece no sangue e em 2 dias alcança o cérebro. Após este período, cerca de 6% da dose de MeHg em que o indivíduo esteve exposto se encontra no cérebro, representando 10% do que está em todo corpo (WHO, 1990). Este processo é bem seletivo, e apenas o enantiômero L-cisteína é transportado. Provavelmente, a absorção intestinal se dê por este mesmo mecanismo (LEANER & MASON, 2002; WETTERHAHN-JENNETTE, 1981). A molécula formada entre MeHg e cisteína apresenta uma estrutura química que se assemelha ao aminoácido metionina, presente abundantemente no organismo, e por esta razão atravessam facilmente as células por meio de transportadores de aminoácidos presentes nas membranas (ASCHNER et al., 1990; ASCHNER & CLARKSON, 1989; KERPER et al., 1992; ZALUPS, 2005a, 2005b). Neste sentido, é provável que a rápida movimentação de MeHg no organismo se deva a este mecanismo (CLARKSON, 2006; SIMMONS-WILLIS et al., 2002; BRIDGES & ZALUPS, 2005).

Uma vez na circulação sanguínea, o mercúrio pode se ligar com outras moléculas com grupamentos tiol (SH), como o aminoácido cisteína, a glutatona, a N-acetilcisteína, a albumina e a homocisteína (FUHR & RABENSTEIN, 1973; KERPER et al., 1992; CLARKSON, 2006; CASARETT & DOLLS, 2001). Ao alcançar o fígado, o MeHg forma nas células hepáticas um complexo com a glutatona (GSH) e deixa os hepatócitos por meio dos transportadores de membrana deste peptídeo sendo transportado pela bile (BALLATORI & CLARKSON, 1985; CLARKSON, 2002). Nesta etapa, o complexo metilmercúrio-glutatona pode ser hidrolisado por enzimas extracelulares e ser reabsorvido como metilmercúrio-cisteína (Figura 1). Uma fração de MeHg lançada no intestino pode ser hidrolisada por enzimas da microflora e ser reabsorvido complexado a cisteína, alcançando novamente o sangue, fazendo a recirculação portal, ou ser demetilado, formando IHg que é então eliminado nas fezes, visto que este é fracamente absorvido pela via gastrointestinal (CLARKSON, 2007; ROWLAND, 1988; RAHOLA et al., 1973; FRIBERG & NORDBERG, 1973).

Figura 1 – Esquema da rota cinética do Metilmercúrio no organismo

Tem sido sugerido que o IHg encontrado nos tecidos, após a exposição ao MeHg ocorra devido à absorção de parte que foi demetilada pela microflora intestinal ou por microssomas hepáticos por ação da NADPH-citocromo P450 redutase, ou pela conversão de MeHg a IHg por células fagocíticas (SUDA et al., 1993). Estudos em animais demonstram que a maior parte do mercúrio no fígado está sob a forma inorgânica, sugerindo que a demetilação do MeHg ocorra neste órgão (CAURANT et al., 1996; HOLSBECK et al., 1998; WAGEMANN et al., 1998).

O IHg é pouco mobilizado no organismo. No entanto, ele pode ser encontrado no cérebro mesmo após muitos anos da última exposição ao MeHg (DAVIS et al., 1994; HARGREAVES et al., 1988; NYLANDER et al., 1989; OPITZ et al., 1996; TAKEUCHI et al., 1989), devido a longa meia vida biológica neste tecido (até 10 anos) (MAGOS et al., 1985; CHARLESTON et al., 1995, 1996; VAHTER et al., 1994, 1995). Alguns autores sugerem que após a passagem do MeHg pela barreira hematoencefálica, o mesmo sofre demetilação (CLARKSON et al., 2007; MAGOS et

al., 1979; MAGOS & WEBB, 1977) e em seguida o IHg forma um complexo com selênio que se deposita no cérebro (MAGOS & WEBB, 1977; WHO, 1990). Parte deste mecanismo pode ser confirmado pelo estudo realizado por Vahter et al. (1995), que observaram um maior acúmulo de IHg em cérebros de macacos tratados com metilmercúrio do que os tratados com mercúrio inorgânico. Outro estudo realizado no Iraque na década de 70, onde a população esteve exposta a doses diárias elevadas de metilmercúrio, foi encontrada uma fração entre 16-40% do total de mercúrio inorgânico no fígado (MAGOS & WEBB, 1976).

Índios canadenses continuamente expostos a altas doses de MeHg por meio do consumo de peixes, apresentaram uma fração de mercúrio inorgânico no sangue igual a 5%, enquanto no cabelo esta fração foi de 20% (PHELPS et al., 1980). As concentrações de MeHg no cabelo refletem uma exposição temporal, já que o cabelo apresenta uma taxa de crescimento de aproximadamente 1cm por mês. Além disso, os níveis de mercúrio encontrados no cabelo apresentam uma ótima correlação com os níveis sanguíneos (CERNICHIARI, 1995). A partir do início da exposição ao MeHg a eliminação no cabelo terá início após 20 dias (CLARKSON et al., 1988).

É sugerido que uma vez no interior das células, tanto MeHg quanto IHg formam ligações covalentes com glutathione (GSH) e com resíduos de cisteína das proteínas, ocasionando depleção dos reservatórios de GSH, a primeira linha de defesa antioxidante das células (HULTBERG, 2001). Este fenômeno ocasiona o aumento da concentração livre de Hg e conseqüente formação de espécies reativas de oxigênio, nos quais são normalmente eliminadas conjugadas a GSH (SARAFIAN, 1999) e posterior peroxidação lipídica e danos citogenéticos caracterizando o estresse oxidativo (AMORIM et al., 2000). De fato, em indivíduos contaminados por metilmercúrio, é observada uma depleção do reservatório intracelular GSH e demais proteínas contendo o grupamento sulfidril livre, potencializando a produção de radicais livres (VALKO et al., 2006).

Em um estudo para avaliar estresse oxidativo e neurotoxicidade em ratos após administração de metilmercúrio (5mg/kg), Label e colaboradores (1992) confirmaram a relação direta entre exposição ao metal e aumento de marcadores de estresse oxidativo. (LEBEL et al., 1992).

Linares e colaboradores (2004) afirmam após concluir um estudo com cultura de células hipotalâmicas de ratos wistar, que parte da toxicidade do metilmercúrio se

deve aos fenômenos metabólicos que culminam com a produção de EROS e estresse oxidativo (LINARES et al., 2004). Estudos em peixes também evidenciam o elevado potencial de bioacumulação deste metal, e ainda, como demonstrado por Marc e colaboradores (2003) ocorreram peroxidação lipídica e depleção de GSH em *Salmo salar* L alimentados com doses diárias de metilmercúrio (MARC et al., 2003).

Alterações celulares típicas de estresse oxidativo foram encontradas em amostras de um grupo de moradores as margens do rio Tapajós, como aberrações poliploides e quebras cromossomiais associadas às concentrações de metilmercúrio em cabelo, utilizado como marcador de exposição (AMORIM et al., 2000).

Como podemos observar, há vários estudos envolvendo este metal e sua relação com formação de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo. E vários mecanismos são sugeridos para explicar os efeitos tóxicos do MeHg, porém acredita-se que nenhum deles atue de maneira isolada.

1.2.1 Substâncias que alteram a toxicocinética do mercúrio

Algumas substâncias estão relacionadas com alterações na toxicocinética do MeHg, entre elas o selênio. Em geral, como demonstram muitos estudos, o selênio tem um efeito protetor contra a ação nociva ao organismo provocada pela exposição ao MeHg (CHANG & SUBER, 1982, BALZILE et al., 2006; SUZUKI & OGRA, 2001).

Após a ingestão de alguns alimentos contendo selênio na forma de selenito e selenometionina ocorre absorção de parte deste elemento que, ao alcançar os eritrócitos, é reduzido a seleneto (Se^{2-}) na presença de GSH eritrocitário. Em seguida, o Se^{2-} é transportado no plasma ligado à albumina e ao atingir o fígado passa a integrar os processos de síntese de selenoproteínas, que são proteínas que contêm selênio na forma de selenocisteína ou selenometionina, como a glutathione, glutathione peroxidase e selenoproteína P. O excesso de selênio ingerido na dieta seguirá a rota para excreção urinária. Tem sido demonstrado que diante da presença de mercúrio no plasma, o Se^{2-} formado no eritrócito forma uma forte ligação com este metal e em seguida este complexo liga-se a Selenoproteína P, alterando a distribuição de mercúrio nos órgãos alvos e especialmente reduzindo sua acumulação nos rins (SUZUKI & OGRA, 2001).

Entretanto, enzimas antioxidantes que utilizam selênio em sua estrutura podem ser prejudicadas pela diminuição de selênio disponível para síntese devido a uma grande quantidade estar ligada ao mercúrio, quando este estiver muito elevado no sangue, aumentando o risco de danos gerados por estresse oxidativo (CHEN et al., 2006; GAILER, 2002).

Evidências indicam que a qualidade nutricional pode influenciar fortemente a toxicidade do metilmercúrio. Alguns nutrientes como selênio, vitamina E, ácido Omega-3, parece diminuir efeitos danosos do metilmercúrio. Em contrapartida, outros componentes da dieta como o etanol, aparentemente podem aumentar a toxicidade do metilmercúrio. Deficiências nutricionais também podem alterar de maneira significativa a interpretação de resultados da avaliação toxicológica em indivíduos expostos ao metilmercúrio, seja pela redução da sensibilidade ao teste, ou pela exacerbação dos efeitos tóxicos, aumentando potencialmente a sensibilidade à toxicidade do metal. Alguns fatores nutricionais como a deficiência de ferro ou de ácido fólico, que atuam no desenvolvimento neuronal, possivelmente podem aumentar o impacto da exposição ao metilmercúrio (BAETA et al., 2006).

1.3 Exposição ao mercúrio na Região Amazônica

Após anos da intensa atividade de mineração na Região Amazônica, principalmente durante os anos 80, foram empregadas grandes quantidades de IHg no processo de amalgamação do ouro (BIDONE et al., 1997).

Atividades de mineração do ouro foram responsáveis pela liberação de cerca de 3000 toneladas de mercúrio entre 1980 e 2000 (MALM et al., 1997). É estimado que entre 1980 a 1993 foram liberados na Amazônia 1300 toneladas de mercúrio, sendo mais de 50% destinadas ao uso em garimpos localizados na bacia do rio Tapajós no estado do Pará (BIDONE et al., 1997).

Recentemente, tem sido evidenciado que esse enriquecimento relativo ao mercúrio em rios amazônicos não decorre apenas do extrativismo mineral, como foi demonstrado nos últimos anos, mas também ocorrendo de forma natural (TELMERA et al., 1995; MAINVILLE et al., 2006; ROULET et al., 1999).

Em 2001, um estudo demonstrou que teores elevados de mercúrio no rio Negro eram de origem natural e foram creditados à mobilização do metal acumulado durante milhares de anos nos solos argilosos, antigos e profundos que predominam na região, através de complexos orgânicos que são liberados pelo processo de podzolização (FADINI & JARDIM, 2001).

A erosão do solo devido ao desmatamento e as atividades agrícolas são fatores relacionados diretamente com contaminação natural de mercúrio e sua passagem para os sistemas aquáticos no rio Tapajós e devem ser considerados quando avaliamos os riscos associados à exposição ambiental ao mercúrio (ROULET et al., 1999). Nestas áreas, os peixes acumulam grandes quantidades desta forma do metal, e são consumidos pelas comunidades ribeirinhas (AKAGI et al., 1995, MALM et al., 1995, 1997; LEBEL, 1997; DOLBEC, 2001; SAMPAIO DA SILVA et al., 2005). Alguns efeitos na saúde desta população já foram identificados, como danos neurológicos em vários graus de intensidade assim como alterações imunológicas e cardiovasculares, tanto em adultos quanto em crianças (LEBEL et al., 1996; GRANDJEAN et al., 1999; BRABO et al., 2000, DOLBEC et al., 2000; ALVES et al., 2006; FILLION et al., 2006).

Limites de tolerância de mercúrio em alimentos foram estabelecidos com o objetivo de assegurar a saúde da população. Para o pescado, tem sido apontados limites de tolerância na concentração entre 0,4 e 1,0 mg de Hg/kg de peixe. No Japão o limite é de 0,4 mg/kg, na Noruega, Suíça, Austrália, Israel, e Tailândia é de 0,5 mg/kg, na Itália é de 0,7 mg/kg e na Finlândia, Nova Zelândia, Alemanha, Dinamarca, Estados Unidos, e Suécia é de 1,0 mg/kg. No Brasil está estabelecida tolerância de 0,5 mg/kg para pescado não predador e de 1,0 mg/kg para pescado predador (BRASIL, 1998).

No Brasil, o limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde para ingestão do alimento é de 400g de pescado com concentração de 0,5 mg/kg consumido semanalmente (BRASIL, 1988).

Os peixes constituem a alimentação básica e a principal fonte de proteínas para os moradores das comunidades ribeirinhas. A determinação de mercúrio no peixe e em amostras de cabelo tem sido útil para estimar o grau de exposição ao metilmercúrio das populações humanas (LEMIRE et al., 2006).

Neste sentido, uma série de pesquisas vem sendo desenvolvida na Região Amazônica, direcionadas a melhor compreensão o ciclo biogeoquímico deste metal

e conseqüentemente as implicações a saúde da população exposta principalmente à forma metilada de mercúrio. Harada e colaboradores (2001) mostraram que os níveis de mercúrio no cabelo da população da região do rio Tapajós, especificamente nas comunidades próximas a cidade de Itaituba variaram em média de 14.1 a 20.8 µg/g com valores encontrados de até 62.9 µg/g (HARADA et al., 2001). Em geral, em população não exposta ao metilmercúrio, os níveis no cabelo deste metal são inferiores a 5 µg/g (WHO, 1990).

Um estudo realizado no ano 2000 por Amorim e colaboradores, encontrou relação direta entre os níveis elevados de MeHg em cabelo com a ocorrência de alterações citogenéticas na população as margens do rio Tapajós - PA (AMORIM et al., 2000).

Estudos mais recentes demonstraram que um maior consumo de frutas tropicais na região apresenta um grande potencial de influenciar a toxicocinética do Hg nessas populações, podendo talvez alterar o processo de excreção fecal do MeHg e diminuir as concentrações excretadas no cabelo. Foi sugerido que fitoquímicos e fibras presentes nestas frutas podem interagir com o MeHg durante sua absorção e excreção, transporte, ligação a proteínas, metabolismo e seqüestro (PASSOS, 2003; PASSOS et al., 2007; ROWLAND et al., 1984, 1986). Alguns autores sugerem que as fibras atuam interrompendo a recirculação entero-hepática do MeHg após se ligar a ele, e visto que não são solúveis, aumentam a excreção nas fezes (OU et al., 1999).

Vários outros estudos na região indicam que a exposição humana ao mercúrio através da ingestão de peixes pode constituir risco potencial para o desenvolvimento de sintomas e sinais da intoxicação por mercúrio (PINHEIRO et al., 2006). Desta maneira, é indispensável o monitoramento das concentrações desse metal, associado às avaliações clínicas, epidemiológicas e às medidas de prevenção e controle, direcionadas a minimizar ou evitar o aparecimento de intoxicação por Hg nas comunidades expostas a este risco.

1.4 Biomarcadores de exposição a agentes tóxicos

Avaliação do risco da exposição ao poluente envolve mensuração de um resíduo químico específico em solo, água, ar, que além de consumir muito tempo, muitas vezes não são bons indicadores de biodisponibilidade do agente químico. O uso de marcadores biológicos de exposição ou biomarcadores pode fornecer informações mais precisas sobre a exposição ao metilmercúrio por um determinado indivíduo. Os biomarcadores são classificados em três tipos: de exposição (dose interna), que podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna (LAUWERYS, 1993), de efeito que podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde decorrente da exposição e absorção da substância química (AMORIM, 2003), e de suscetibilidade, que indicam os fatores que aumentam ou diminuem um risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição ao agente químico (RÜDIGER, 1999).

Estes biomarcadores podem ser obtidos a partir de tecidos humanos ou fluidos biológicos coletados por métodos invasivos ou não invasivos. Métodos não invasivos como análise de cabelo, são preferidos pela melhor acessibilidade e conforto para o indivíduo exposto (KAKKAR, 1999).

1.4.1 Biomarcadores de exposição ao mercúrio

Determinações de Hg em sangue e cabelo são utilizadas para avaliar a exposição a diferentes formas orgânicas deste metal, enquanto a determinação na urina é utilizada para avaliar a exposição a formas inorgânicas (MAGOS & CLARKSON, 2006; WHO, 1993). Entretanto, pouco se sabe a respeito do comportamento do MeHg em outros compartimentos biológicos como o plasma.

A concentração de Hg em sangue é frequentemente utilizada para avaliar a exposição ao MeHg em indivíduos que se alimentam de grandes quantidades de peixe, presumindo-se que as concentrações de IHg no sangue são muito baixas, devido ao seu caráter hidrofílico (SCHOBER et al., 2000; WEIL et al., 2005). No sangue, mais de 90% do MeHg está ligado a hemoglobina dos eritrócitos, enquanto o IHg está mais frequentemente dividido entre eritrócitos e plasma (MIETTINEN,

1973; KERSHAW et al., 1980). Por esta razão, o Hg em eritrócitos é também algumas vezes utilizado como uma ferramenta para avaliar a exposição ao MeHg, enquanto que a determinação do Hg em plasma é um bom biomarcador para avaliar a exposição ao IHg (WHO, 1991; SKERFVING, 1988). Entretanto, alguns fatores, ainda não bem conhecidos, podem interferir na mobilização do MeHg entre os compartimentos biológicos, além de talvez contribuir para a transformação de MeHg em IHg.

O Hg é incorporado pelos aminoácidos presentes no cabelo durante a formação do folículo capilar, e a demanda de aminoácidos para formação de proteínas, principalmente a queratina para o crescimento do cabelo é bem mais expressiva em relação a outros órgãos. (CLARKSON & MAGOS, 2006). Para este processo nas células que sintetizam proteínas, os transportadores de membrana são componentes necessários. Por esta razão, as concentrações de MeHg em cabelo podem representar uma ferramenta de avaliação das concentrações de metilmercúrio-cisteína presentes no plasma, que são as mesmas formas transportáveis que chegam ao cérebro (CLARKSON, 2007).

A concentração de THg no cabelo é frequentemente utilizada como ferramenta de avaliação de exposição somente ao MeHg, assumindo que mais de 80% do Hg no cabelo se encontra sob esta forma. A pequena fração de IHg encontrado no cabelo se deve a uma possível demetilação no folículo capilar (LINDBERG et al., 2004).

A concentração de THg em urina é usada para avaliar a exposição somente a mercúrio inorgânico, visto que o MeHg é excretado complexado a glutathione pela bile e eliminado nas fezes. Apenas 10% ou menos são eliminados na urina (BERGLUND et al., 2005). No entanto, parece que mecanismos ainda não conhecidos, podem ser responsáveis por uma parcela de demetilação do MeHg no organismo e posterior excreção urinária (CLARKSON et al., 1988).

O complexo formado a partir de MeHg ligado a um grupo tiol da cisteína, contribui com menos de 1% do total de MeHg circulante no sangue (LORSCHIEDER et al., 1995). Acredita-se que a maior parte do MeHg está ligada a hemoglobina nas células vermelhas, com uma pequena fração ligada a glutathione. Da fração encontrada no plasma, a maior parte está ligada à albumina (ANCORA et al., 2002). O uso de sangue total como biomarcador de exposição reflete apenas as espécies não transportáveis, já que menos de 1% do mercúrio está na forma transportável

(mercúrio-cisteína), que efetivamente alcança os órgãos alvos (CLARKSON et al., 2007).

Para exposição aguda e recente a MeHg, suas concentrações no sangue e urina podem ser utilizadas (CLARKSON, 2002; RISHER & DEWOSKIN, 1999; RISHER & AMLER, 2005). Entretanto, para avaliar o histórico de uma exposição crônica a baixas doses, a determinação das concentrações de Hg no sangue e urina não é adequado (RISHER & DEWOSKIN, 1999). Estes biomarcadores de exposição podem não mais refletir o grau de exposição após um longo período (BRAUNWALD et al., 2002; HARGREAVES et al., 1988; OPITZ et al., 1996; TAKEUCHI et al., 1989).

Para determinação de mercúrio em urina, a determinação de creatinina urinária deve ser realizada para controlar os efeitos de hidratação (ROONEY, 2007).

1.5 Razão entre as concentrações de mercúrio nos biomarcadores de exposição

É comum a procura de correlações entre os valores de concentrações de mercúrio em diferentes amostras biológicas humanas. Em alguns casos as correspondências encontradas são boas. No estudo de Barbosa e colaboradores (1995) foi correlacionado o teor de mercúrio no cabelo das mães com o nas crianças lactentes (com menos de 2 anos), mostrando-se uma correlação estatisticamente significativa para mulheres e crianças das comunidades ribeirinhas.

Tem sido estimado que a concentração de mercúrio no cabelo expressa em mg/kg é 250 vezes maior que a concentração no sangue expressa em µg/L (CLARKSON et al., 2007).

1.6 Variações inter-individuais nas concentrações de mercúrio entre os biomarcadores de exposição

Equívocos na interpretação dos resultados das análises de biomarcadores de exposição a agentes tóxicos, podem ocorrer devido à interferência de variações biológicas mesmo entre indivíduos saudáveis (DALPINO et al., 2006).

Variáveis de caráter biológico inter-individuais como sexo, idade e raça são amplamente conhecidas e geram intervalos de referência próprio para alguns analitos, predeterminados em estudos populacionais (RIFAI et al., 1997). Para avaliação da exposição ao mercúrio, ainda não se tem disponíveis estudos neste sentido. Outras fontes de variações são menos exploradas, mas não devem ser consideradas menos importantes, como as ambientais (alimentação, tabagismo, atividade física), clínicas (uso de medicamentos), e as relacionados à coleta (jejum, postura, hemólise, condições de transporte e armazenamento) (BATCHLET et al., 1973).

A exposição em diferentes doses ao mercúrio pode comprometer severamente a saúde do exposto dependendo de sua suscetibilidade individual, como características genéticas, nutricionais, sexo, idade etc. Estes fatores podem afetar a absorção, distribuição, biotransformação, excreção e consequentemente a toxicidade do MeHg (GUIMARÃES et al., 2005). Por esta razão, cada vez mais se buscam os determinantes que potencializam ou minimizam os efeitos a determinada exposição (KAKKAR & JAFFERY, 2005).

Existem diversidades entre indivíduos da espécie humana e entre os animais utilizados em estudos experimentais que determinam diferenças na distribuição de MeHg entre eritrócitos e plasma. Em um estudo com humanos, Kershaw e colaboradores (1980) encontraram após a ingestão de peixes contaminados uma razão de MeHg nos eritrócitos em relação ao MeHg no plasma de 20:1. Outros estudos reportaram a razão de MeHg entre sangue e plasma de 10 (BIRKE et al., 1972; BAKIR et al., 1973; ABERG et al., 1969; MIETTINEN, 1973). Em macacos a razão é bem parecida, mas em camundongos a média é 7 e em ratos 100 (MAGOS et al., 1987).

Em uma população exposta ao MeHg no Iraque foram determinadas as concentrações de IHg nos biomarcadores de exposição em relação ao Hg total, encontrando-se 7% no sangue, 22% no plasma, 39% em leite materno e 73% na urina (MAGOS & WEBB, 1976).

Berglund e colaboradores (2005) observaram que cerca de 90% do mercúrio encontrado em células vermelhas estava sob a forma de metilmercúrio e sofria

pouca variação inter-individual. O Hg total no plasma estava nas formas de IHg e MeHg, e apresentou grande variação inter-individual na distribuição entre plasma e eritrócitos, sendo que do total no plasma apenas 9,6% eram MeHg (BERGLUND et al., 2005). Em contrapartida, Grotto e colaboradores (2008) observaram na população ribeirinha do Tapajós, que do total de Hg no sangue, alguns voluntários apresentavam até 60% deste no plasma, demonstrando que existe a influência de fatores ainda não determinados que contribuam para uma diferença nas concentrações de Hg de biomarcadores de exposição ao mercúrio. Estes fatores devem ser identificados para uma melhor compreensão da dinâmica e cinética do mercúrio no nosso organismo, bem como, para uma melhor utilização dos diferentes biomarcadores de exposição na avaliação de risco.

A população avaliada no presente estudo apresenta características bem peculiares, que lhe conferem um perfil diferenciado quando se avaliam as frações de Hg nos biomarcadores em relação a outras populações expostas estudadas em todo o mundo. Características alimentares podem ser atribuídas a este fato.

Alguns estudos mostram característica própria no que se refere à dieta desta população, que inclui grande variedade de frutas (PASSOS et al., 2001; PASSOS, 2003) e grande consumo de peixe como fonte principal de proteínas (LEBEL et al., 1997; DOLBEC et al., 2001; PASSOS et al., 2001; LEMIRE, 2006). Inquéritos epidemiológicos realizados nas proximidades da área do presente estudo mostraram que 100% das pessoas entrevistadas consomem peixe (LEBEL, 1997; DOLBEC, 2001; PASSOS et al., 2001).

Um possível biomarcador de suscetibilidade genética já foi avaliado em algumas populações na Região Amazônica, definido por um polimorfismo no gene GSTM1 que expressa glutathione-s-transferase (GST) uma enzima responsável pela biotransformação de mercúrio em humanos (GUIMARÃES et al., 2005). Neste estudo, parte da população (frequência de 26%) tinha o genótipo GSTM1 nulo e níveis mais elevados de MeHg no cabelo, já que a síntese de GST está diminuída (XU et al., 1998).

Os biomarcadores de exposição ao mercúrio são freqüentemente utilizados para estimar a exposição e os riscos à saúde, mas pouco ainda se sabe a respeito das variações inter-individuais. A disponibilidade de informações da cinética do mercúrio está baseada em estudos que datam mais de 30 anos, muitas vezes envolvendo um baixo número de indivíduos e experimentos *in vitro* ou em animais,

desconsiderando as diferenças para estudos *in vivo* assim como as características inerentes à espécie humana.

A idéia de que existam importantes variações inter-individuais nos biomarcadores de exposição aos agentes tóxicos, se reforça pelo fato de alguns estudos observarem na avaliação de biomarcadores de dose interna, resultados muito distintos entre os indivíduos, mesmo com consideráveis semelhanças frente a um mesmo tipo de exposição. Os prováveis determinantes para estas diferenças inter-individuais e suas relações, serão objetos de estudo desta pesquisa, visando a busca de informações acerca das variações inter-individuais, de grande importância para essa área do conhecimento, o que poderá possibilitar uma adequada aplicação do uso de biomarcadores frente às características individuais a diferentes tipos de exposição.

Nesse contexto, caracteriza-se a questão da exposição ao mercúrio como um desafio a ser enfrentado no campo da saúde pública, toxicologia e para as demais ciências interdisciplinares e, sobretudo, para a população residente às margens do rio Tapajós, exposta excessivamente a uma forma de Hg bastante bioacumulativa e nociva à saúde.

A avaliação do risco à exposição ao Hg utilizando biomarcadores de exposição, é fundamental para orientar a definição e implantação de políticas públicas que permitam uma maior prevenção e controle das intoxicações, contribuindo sobremaneira para a melhoria da saúde da população ribeirinha do Tapajós.

Nesse sentido, o presente estudo além de nos trazer um panorama geral sobre o grau de contaminação desta população, nos permitirá também determinar se há variáveis que devam ser consideradas quando da utilização de biomarcadores de exposição na avaliação do risco frente à exposição ao mercúrio, em condições que não comprometam a qualidade de vida atual ou futura destes indivíduos.

2.1 Objetivos gerais

- Determinar as concentrações de Hg total em sangue, plasma, eritrócito, urina e cabelo em uma população ribeirinha do Rio Tapajós, Pará;
 - Avaliar a correlação existente entre os diferentes biomarcadores de exposição ao Hg na mesma população;
 - Apontar possíveis variáveis que interfiram nas relações entre variações inter-individuais em biomarcadores de exposição ao Hg;
 - Avaliar a razão entre concentração de mercúrio em sangue e cabelo e relacionar com valores estabelecidos na literatura.
-

3.1 Modelo de estudo

Este estudo transversal é parte do projeto Caruso, desenvolvido através de uma parceria da Universidade de São Paulo com a Universidade de Québec, que utiliza uma abordagem integrada para investigar os fatores envolvidos com a mobilização de Hg nos meio ambiente, contaminação humana e toxicidade em populações ribeirinhas do rio Tapajós, principal afluente do rio Amazonas (CARUSO, 2007).

3.2 Local de estudo

Na região da bacia do rio Tapajós existem cerca de 50 comunidades, onde as populações se diferem em tamanho, práticas agrícolas e de pesca, religião, acesso aos serviços de saúde, educação. A área é composta por diversos tipos de solos e sistemas aquáticos, apresentado uma larga variedade de peixes e frutas. Para o desenvolvimento do presente estudo, selecionamos 12 comunidades ribeirinhas ao longo do Rio Tapajós: Açaituba, Brasília Legal, Curí-Teçá, Curí-Timbó, Ipaupixuna, Mussum, Nova Canaã, São Luiz do Tapajós, Santa Cruz, Santo Antônio, Vista Alegre e Novo Paraíso na região de Itaituba no estado do Pará (Figura 2).

Figura 2. Mapa das comunidades de Itaituba participantes do estudo

3.3 Seleção de voluntários

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Após esclarecimento detalhado sobre o projeto, assinatura do voluntário no termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletadas por amostragem de conveniência amostras de sangue, cabelo e urina (n=453) de adultos, com idades entre 16 e 83 anos, expostos ao MeHg residentes nas 12 comunidades do rio Tapajós citadas acima.

Foi distribuído um questionário contendo questões sobre variáveis como: idade, sexo, peso, hábitos alimentares e tempo de residência no local para conhecimento do tempo de exposição.

3.4 Reagentes e solventes

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ.cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) foi utilizada em todo o trabalho. Ácido nítrico 20% v/v previamente destilado em temperatura inferior à de ebulição, empregando-se destilador de quartzo da Kürner Analysentechnik para eliminação de impurezas. Todos os reagentes utilizados são de grau de pureza analítica.

A análise de baixas concentrações de mercúrio requer uma limpeza especial do material que será utilizado no preparo das amostras e armazenamento de soluções. Neste sentido todas as soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polietileno após prévio tratamento para eliminação de contaminantes. Frascos de plástico e materiais de vidro foram mergulhados em solução contendo 20% v/v HNO₃ por 24h, lavados 5 vezes com água deionizada pelo sistema Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar. Todas as operações para preparo das soluções foram realizadas em sala limpa classe 1000.

3.5 Coleta e armazenamento das amostras

As amostras de sangue (10ml) foram coletadas em tubos livre de metais da BD (Vacutainer®) contendo anticoagulante heparina. Após a coleta, um volume de 5ml de sangue foi transferido para microtubos (Eppendorf®) previamente descontaminados e armazenados a -20°C até a análise. Os 5 ml restantes foram centrifugados em centrífuga (Centrífuga® 80-2B) a 1000 x g durante 5 minutos para separação do plasma. Após esta etapa o plasma foi armazenado em microtubos (Eppendorf®) previamente descontaminados e mantidos à - 20°C até a análise.

As amostras de urina foram coletadas em tubos de polietileno de 100 ml previamente descontaminados. Após a coleta um volume de 5ml de urina foi transferido para tubos cônicos (Falcon®) e adicionado 1 ml de solução conservante (ácido clorídrico 2% v/v) e armazenadas a - 20°C até a análise.

As amostras de cabelo (aproximadamente 100 mg) foram coletadas em diferentes regiões do escalpo, próximo à nuca. Para a coleta foi utilizada tesoura de aço inoxidável, previamente descontaminada, e seca em estufa a 60°C por uma noite. Em seguida, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos previamente descontaminados até a análise.

3.6. Determinação de mercúrio

Para a determinação de THg em sangue total, eritrócitos e urina, foi aplicado o método proposto por Palmer e colaboradores (2006), onde, um espectrômetro de massas com plasma acoplado (ICP-MS) foi utilizado. A determinação das concentrações de THg no plasma, foi obtida pela aplicação do método proposto por Goullé e colaboradores (2005).

Em relação ao fracionamento de mercúrio e determinação das concentrações de IHg e MeHg em cabelo, foi aplicado o método de Ebbestadt e colaboradores (1975), onde um espectrômetro de absorção atômica com vapor frio foi utilizado.

3.7 Validação dos resultados

O dados foram validados com análise de Materiais de Referência Certificada de sangue provenientes da *National Institute of Standards and Technology* (NIST) (NIST 966 Hg in bovine blood), e Materiais de Referência de sangue e plasma provenientes do Programa de Proficiência de Laboratórios do Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque (NYS DOH) nos Estados Unidos e do INSP-Quebec ICPMS *Intercomparison Program* no Canadá.

Os valores obtidos experimentalmente foram confrontados com os valores alvo, aplicando-se o teste *t* de Student para 95 e 99% de confiança.

3.8 Análise estatística

Para associar as concentrações de mercúrio entre os biomarcadores analisados, foi utilizada análise de correlação entre parâmetros aplicando-se correlação não paramétrica de Spearman (*r*), e posterior regressão linear para desenvolvimento de associação entre parâmetros, utilizando o software GraphPad Prism® versão 4.03.

Dos 453 voluntários do início do estudo, foram selecionados 410 indivíduos, após exclusão dos que não coletaram urina ou que apresentaram valores < que 0,3 g/L de creatinina urinária ou > que 3,0 g/L, como recomenda ALESSIO (1985).

4.1 Mercúrio em sangue e suas frações

Com o objetivo de avaliar a exposição ao mercúrio e correlacionar sua concentração entre os biomarcadores de exposição, foram determinadas suas concentrações nas amostras dos voluntários. Um resumo das concentrações de Hg em sangue total, eritrócitos, urina e cabelo são apresentados na Tabela 1.

As concentrações de THg no sangue dos voluntários variaram de 1,7 a 288,9 $\mu\text{g/L}$ (média de $49,6 \pm 35,7 \mu\text{g/L}$) e mediana foi de 41. Quando os voluntários foram separados por gênero, os homens apresentaram uma média de THg no sangue igual a $58,5 \pm 40,4 \mu\text{g/L}$ e mediana de 46,6. Já as mulheres apresentaram uma média de THg no sangue de $41,8 \pm 27,9 \mu\text{g/L}$ com mediana de 37,3.

Figura 3. Correlação de Spearman entre concentração de mercúrio plasmático em relação a concentração de mercúrio em sangue total

As concentrações de THg no plasma dos voluntários variaram de 0,2 a 40,0 $\mu\text{g/L}$ (média de $7,6 \pm 6,4 \mu\text{g/L}$) e mediana de 6,0. Quando os voluntários foram separados por sexo, os homens apresentaram uma média de THg no plasma igual a $8,9 \pm 7,2 \mu\text{g/L}$ e mediana de 7,4 e as mulheres $6,6 \pm 5,3 \mu\text{g/L}$ com mediana de 5,2. A fração de THg no plasma em relação ao sangue total teve grande variação entre os indivíduos, de 0,5% a 61%. Quando separado por sexo, a fração plasmática para

mulheres foi de $16,55 \pm 9,8\%$ e para os homens de $15,7 \pm 8,9\%$. As concentrações de THg no plasma apresentam correlação com os níveis de THg em sangue total (Figura 3). A fração plasmática de THg no sangue, não apresentou qualquer correlação com os níveis de THg em sangue total (Figura 4).

Figura 4. Correlação de Spearman entre a fração plasmática de mercúrio total em relação a concentrações de mercúrio total em sangue total

4.2 Mercúrio em cabelo

As concentrações de THg no cabelo dos voluntários variaram de 0,97 a 62,4 µg/g ($14,1 \pm 10,3$ µg/g) e mediana de 10,9. Quando os voluntários foram separados por sexo, os homens apresentaram uma média de Hg no cabelo igual a $13,1 \pm 9,3$ µg/g e mediana de 10,9 e as mulheres $14,9 \pm 11,1$ µg/g com mediana de 11,3. As concentrações de MeHg no cabelo variaram entre 72% a 100%, com uma média de 85,7%, tendo pouca variação inter individual. As concentrações de THg no cabelo apresentaram uma forte correlação com as concentrações de THg no sangue (Figura 5).

Figura 5. Correlação de Spearman entre mercúrio total em cabelo em relação a concentrações mercúrio total em sangue total

As concentrações de IHg no cabelo dos voluntários variaram de 0,0 a 8,0 µg/g (média de $2,0 \pm 1,5$ µg/g) e mediana de 1,6. Quando os voluntários foram separados por sexo, os homens apresentaram uma média de IHg no cabelo igual a $1,9 \pm 1,4$ µg/g e mediana de 1,7 e entre as mulheres a média foi de $2,1 \pm 1,6$ µg/g com mediana de 1,6.

As concentrações de MeHg no cabelo variaram entre 72% a 100%, com uma média de 85,7%, tendo pouca variação inter-individual e forte correlação com as concentrações de IHg (Figura 6).

Figura 6. Correlação de Spearman entre mercúrio inorgânico e orgânico no cabelo

4.3 Mercúrio em urina

As concentrações de THg na urina dos voluntários avaliados variaram de 0,05 a 98,0 µg/g creatinina (média de $3,13 \pm 7,39$ µg/g creatinina) e mediana de 1,1. Quando os voluntários foram separados por gênero, os homens apresentaram uma média de THg na urina igual a $2,3 \pm 4,5$ µg/g creatinina e mediana de 1,1 e as mulheres $4,0 \pm 9,2$ µg/g creatinina com mediana de 9,2. Foi observada uma correlação média entre as concentrações de THg no plasma e na urina, usando correção ou não de creatina (Figura 7 e 8).

Figura 7. Correlação entre fração plasmática de mercúrio total no plasma e excreção urinária de mercúrio total, corrigida por creatinina

Figura 8. Correlação de Spearman entre mercúrio total no plasma e mercúrio total em urina, sem correção por creatinina

Tabela 1. Concentrações médias de mercúrio na população ribeirinha do rio Tapajós - Pará

Biomarcador		Concentração de Hg
Sangue total (THg µg/L)	Média ± DP	49,6 ± 35,7
	Mediana	41,0
	Variação	1,7 – 288,9
Plasma (THg µg/L)	Média ± DP	7,6 ± 6,4
	Mediana	6,0
	Variação	0,2 – 40,0
Eritrócito (THg µg/L)	Média ± DP	48,0 ± 31,0
	Mediana	35,1
	Variação	1,5 – 248,9
Urina (THg µg/g creatinina)	Média ± DP	3,2 ± 7,4
	Mediana	1,1
	Variação	0,05 – 98,1
Cabelo (THg µg/g)	Média ± DP	14,1 ± 10,3
	Mediana	10,9
	Variação	1,0 – 62,4
Cabelo (IHg µg/g)	Média ± DP	2,0 ± 1,5
	Mediana	1,6
	Variação	0,0 – 8,0
Cabelo (MeHg µg/g)	Média ± DP	12,1 ± 8,9
	Mediana	9,5
	Variação	0,9 – 56,0

4.4 Variável idade

Quando divididos por faixa etária, os homens com idade entre 30 e 45 anos apresentaram a maior média de THg em sangue, plasma, urina e cabelo. Entre as mulheres, uma maior média de THg na urina e cabelo foi também observada para a faixa etária entre 30 e 45 anos. No entanto, as mulheres na faixa etária entre 46 e 83 anos apresentaram a maior média de THg no sangue e plasma.

A Tabela 2 apresenta resumidamente as concentrações de THg em sangue, plasma, urina e cabelo divididas por gênero e idade.

4.5 Variável gênero

Os homens apresentaram maiores concentrações de THg em sangue, plasma e cabelo em relação às mulheres, enquanto as mulheres apresentaram maior concentração de THg na urina em relação aos homens. Observamos que os homens na faixa etária entre 30 e 45 anos apresentaram as maiores concentrações de THg em sangue e plasma e os homens entre 46 e 81 anos apresentaram maiores concentrações no cabelo. Entre as mulheres, as maiores concentrações de THg em sangue, plasma e urina esteve na faixa etária entre 46 e 83 anos (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações de mercúrio total nos biomarcadores de exposição na população ribeirinha do rio Tapajós – Pará, divididos por gênero e idade

Homens				
Idade	THg Sangue	THg Plasma	THg Urina	THg Cabelo
	µg/L	µg/L	µg/g creatinina	µg/g
16 – 29	49,9 ± 33,9	6,9 ± 6,0	1,5 ± 1,6	10,6 ± 7,2
30 – 45	66,2 ± 38,6	11,3 ± 7,3	3,0 ± 7,3	12,9 ± 7,6
46 - 81	59,1 ± 45,5	8,5 ± 7,5	2,2 ± 3,0	15,1 ± 11,3
Mulheres				
Idade	THg Sangue	THg Plasma	THg Urina	THg Cabelo
	µg/L	µg/L	µg/g creatinina	µg/g
16 - 29	37,3 ± 29,1	5,0 ± 4,6	1,4 ± 1,7	9,0 ± 7,2
30 – 45	42,4 ± 28,2	5,5 ± 4,8	5,6 ± 12,9	17,7 ± 10,8
46 - 83	44,9 ± 27,3	8,9 ± 5,7	4,7 ± 8,8	17,4 ± 12,5

4.6 Variável comunidades

Na comunidade de Curí-Teçá, foi observada a maior média de THg no sangue ($73,8 \pm 34,1 \mu\text{g/L}$) e urina ($19,2 \pm 9,6 \mu\text{g/g creatinina}$), enquanto a maior média de THg no plasma foi observada na comunidade de Santa Cruz ($12,0 \pm 8,0 \mu\text{g/L}$). A comunidade de Curí-Timbó apresentou a maior média de THg no cabelo ($20,1 \pm 13,9 \mu\text{g/g}$). A Tabela 3 apresenta em resumo as concentrações de THg em sangue, plasma, urina e cabelo divididos por comunidades.

Tabela 3. Concentrações de mercúrio nos biomarcadores de exposição na população ribeirinha do Tapajós – Pará, divididos por comunidades

Comunidade		THg sangue ($\mu\text{g/L}$)	THg plasma ($\mu\text{g/L}$)	THg urina ($\mu\text{g/g}$ creatinina)	THg cabelo $\mu\text{g/g}$
Açaituba	Média $\pm$ DP	45,8 $\pm$ 20,0	5,1 $\pm$ 2,6	1,1 $\pm$ 1,3	8,4 $\pm$ 3,8
	Mediana	46,0	4,8	0,4	7,9
	Variação	12,9 - 82,3	0,8 - 12,2	0,10 - 4,7	2,1 - 15,5
Brasília Legal	Média $\pm$ DP	31,7 $\pm$ 26,3	6,2 $\pm$ 5,5	1,3 $\pm$ 1,7	8,7 $\pm$ 7,2
	Mediana	25,3	4,9	0,6	6,8
	Variação	4,7 - 164,2	0,2 - 30,2	0,05 - 8,5	1,0 - 44,9
Curí-Teçá	Média $\pm$ DP	73,8 $\pm$ 34,1	5,3 $\pm$ 4,6	7,3 $\pm$ 19,7	19,2 $\pm$ 9,6
	Mediana	67,7	4,0	2,5	15,7
	Variação	16,3 - 152,7	0,8 - 20,2	0,06 - 98,1	5,2 - 45,2
Curí-Timbó	Média $\pm$ DP	54,6 $\pm$ 37,8	4,8 $\pm$ 4,6	5,6 $\pm$ 6,4	20,1 $\pm$ 13,9
	Mediana	42,2	3,3	4,4	15,5
	Variação	14,0 - 159,4	0,2 - 16,8	0,17 - 28,7	2,3 - 57,9
Ipaupixuna	Média $\pm$ DP	45,3 $\pm$ 32,6	7,7 $\pm$ 6,6	3,2 $\pm$ 6,8	17,1 $\pm$ 11,5
	Mediana	36,8	5,3	1,5	13,9
	Variação	4,3 - 146,9	0,3 - 26,8	0,09 - 46,2	2,3 - 46,8
Mussum	Média $\pm$ DP	47,4 $\pm$ 30,2	9,1 $\pm$ 6,3	4,4 $\pm$ 11,5	14,1 $\pm$ 9,9
	Mediana	38,5	8,1	1,1	12,3
	Variação	11,4 - 119,3	1,3 - 24,4	0,07 - 53,7	3,3 - 44,8
Nova Canaã	Média $\pm$ DP	59,1 $\pm$ 33,5	11,0 $\pm$ 6,3	2,6 $\pm$ 3,7	18,1 $\pm$ 11,9
	Mediana	63,7	11,5	1,8	17,2
	Variação	10,3 - 115,2	2,2 - 23,9	0,07 - 16,9	3,1 - 40,8
Santa Cruz	Média $\pm$ DP	65,0 $\pm$ 52,2	12,0 $\pm$ 8,0	1,9 $\pm$ 2,8	13,8 $\pm$ 12,0
	Mediana	57,3	11,1	0,9	10,7
	Variação	7,4 - 288,9	1,9 - 40,0	0,06 - 13,1	1,1 - 62,4
Santo Antônio	Média $\pm$ DP	42,3 $\pm$ 37,5	4,9 $\pm$ 7,1	3,5 $\pm$ 7,0	14,0 $\pm$ 10,6
	Mediana	31,9	2,5	0,6	9,8
	Variação	1,7 - 179,3	0,2 - 30,9	0,06 - 31,7	2,8 - 55,5
São L. Tapajós	Média $\pm$ DP	54,9 $\pm$ 34,5	11,6 $\pm$ 6,9	6,6 $\pm$ 10,3	18,8 $\pm$ 11,3
	Mediana	51,9	10,9	2,6	16,6
	Variação	4,8 - 164,9	1,9 - 28,7	0,07 - 50,9	4,8 - 47,6
Vista Alegre	Média $\pm$ DP	65,9 $\pm$ 32,2	10,6 $\pm$ 3,8	2,8 $\pm$ 2,6	14,4 $\pm$ 6,0
	Mediana	61,8	9,5	2,0	13,8
	Variação	23,0 - 141,8	3,6 - 18,4	0,13 - 11,7	3,5 - 29,6
Novo Paraíso	Média $\pm$ DP	31,5 $\pm$ 25,8	2,5 $\pm$ 2,2	0,7 $\pm$ 0,7	7,1 $\pm$ 5,5
	Mediana	23,6	2,3	0,4	6,5
	Variação	7,2 - 87,0	0,2 - 6,6	0,07 - 2,6	1,3 - 21,8

4.7 Razão entre concentração de mercúrio no sangue e no cabelo

Quando estabelecemos a razão entre as concentrações de THg em sangue e cabelo, observamos uma variação de 1:13 a 1:13274 e média de 1:282. Entre as mulheres a média foi de 1:349 e entre os homens de 1:211.

Acerca da variabilidade individual da razão entre a concentração de THg no cabelo e em sangue, observamos que entre os homens em diversas faixas etárias, esta média está próxima a 1:250. Já para as mulheres, esta mesma razão apresenta uma elevada variação com a idade (Tabela 4).

Tabela 4. Razão entre concentração de mercúrio em sangue e cabelo

Homens		
Idade	Razão	Variação
16 – 29	211,7 ± 946,1	19,5 – 6820,0
30 – 45	194,5 ± 275,8	40,3 – 1462,0
46 - 81	255,5 ± 1490,0	13,2 – 13274,5
Mulheres		
Idade	Razão	Variação
16 - 29	240,2 ± 696,4	30,8 – 4425,0
30 – 45	417,0 ± 769,0	31,1 – 5287,5
46 - 83	387,9 ± 804,0	39,4 – 4809,5

A correlação observada entre THg no plasma e THg no sangue total (Figura 3), indica que a exposição foi realmente a MeHg e que algum processo subsequente à ligação de MeHg ao eritrócito foi responsável pela mobilização de Hg para o plasma, visto que o aumento da concentração de THg no plasma não ocorreu independente da concentração de THg no sangue. No sangue, MeHg está predominantemente ligado aos eritrócitos, enquanto IHg está em sua maior parte no plasma (MAGOS et al., 1985; CLARKSON et al., 2007). Quando a exposição é a IHg, o aumento de THg no plasma ocorre independente da concentração de THg no sangue, visto que IHg se liga fracamente aos eritrócitos (CLARKSON, 2002).

Não foi observada correlação entre aumento da fração plasmática de THg e concentração de THg em sangue total (Figura 4), indicando que mesmo com o aumento de THg no sangue, não ocorre efeito de saturação de eritrócitos provocando mobilização de THg para o plasma.

A distribuição de THg entre eritrócitos e plasma observada nesta população, é diferente do que foi observado em outros estudos sobre exposição a MeHg. Até 61% de THg no sangue foi encontrado no plasma, enquanto em outros estudos com indivíduos expostos a MeHg foi observado menos de 20% (KERSHAW, 1980). Segundo Berglund e colaboradores (2005), 90% do THg ligado ao eritrócito está na forma de MeHg e apenas 10% na forma inorgânica, e do total de IHg no sangue 64% está no plasma com pouca variação inter-individual. Diante da elevada fração de THg no plasma e considerando que a população ribeirinha do Tapajós está majoritariamente exposta a forma orgânica do THg, podemos inferir que algum processo envolvido com a demetilação do MeHg está ocorrendo nos indivíduos desta população, ou ainda que o mercúrio no plasma está sob a forma orgânica. Estudo realizado por Kershaw e colaboradores (1980), no qual foi administrado na dieta dos voluntários peixes contendo MeHg, mostrou que as concentrações de IHg no plasma não se alteraram após a ingestão do peixe contendo MeHg. No entanto, as concentrações de THg no plasma aumentaram 10 vezes após o consumo de peixe, mostrando que o THg que aumentou no plasma provavelmente era orgânico. O processo de demetilação do MeHg no organismo já é descrito em alguns trabalhos, e parece ser lento e ocorrer nos tecidos (principalmente fígado e rins) (CLARKSON et al., 2007) e não no próprio plasma. Pouco se sabe acerca dos mecanismos envolvidos na conversão de MeHg em IHg no organismo e a variação

inter-individual que influencia o processo. Essa elevada fração plasmática de THg nos voluntários estudados, pode se tratar de IHg ou mesmo MeHg.

Houve uma forte correlação entre as concentrações de THg no sangue e THg no cabelo (Figura 5), indicando que as concentrações de THg no cabelo refletem as concentrações de THg no sangue. A correlação observada entre IHg e MeHg no cabelo (Figura 6), confirmam as informações a respeito da origem de IHg no cabelo nas exposições a MeHg. Segundo alguns autores, a fração de IHg no cabelo se deve a demetilação no sangue, no folículo capilar ou no preparo da amostra e análise (CERNICHIARI et al., 1995; BERGLUND et al., 2006). Por esta razão, o mercúrio total no cabelo é um bom biomarcador para exposição a MeHg (KAKKAR & JAFFERY, 2005; CLARKSON et al., 2007).

A concentração média de THg no cabelo dos voluntários foi de $14,1 \pm 10,3$ µg/g, indicando uma alta taxa de exposição a MeHg, já que a concentração observada em indivíduos não expostos é inferior 5 µg/g (WHO, 1990). As concentrações de MeHg no cabelo variaram entre 72% a 100%, com uma média de 85,7%, tendo pouca variação inter-individual. Este resultado está de acordo com dados disponíveis na literatura (WHO, 1990; BERGLUND et al., 2005). A Organização Mundial de Saúde refere o aparecimento de sintomas de intoxicação pelo metilmercúrio em concentrações capilares variando de 50 a 120 µg/g (WHO, 1990).

A média de excreção urinária de THg ($3,128 \pm 7,378$ µg/g creatinina), foi maior do que observado em outros estudos com indivíduos expostos à MeHg. A média em indivíduos expostos a MeHg a partir da ingestão de peixe segundo Berglund e colaboradores (2006) é de 0,75 µg/g creatinina para homens e de 2,1 µg/g creatinina para mulheres. Provavelmente esta observação se deve ao fato dos voluntários estudados estarem mais expostos ao MeHg em relação aos outros estudos.

Mais de 98% de mercúrio na urina está na forma de IHg e por esta razão atualmente, a urina é usada como biomarcador apenas para exposição ao IHg (CLARKSON et al., 1988; WHO, 1990). No entanto, a excreção urinária de mercúrio pode ser aumentada também na exposição a MeHg como podemos observar nos voluntários neste estudo. Já que praticamente todo o mercúrio excretado é inorgânico, o processo de demetilação está ocorrendo e é mais acentuado em alguns indivíduos.

Quando correlacionamos THg excretado na urina com nível plasmático de THg (Figuras 7 e 8), encontramos uma correlação média. Chen e colaboradores (2006) encontraram uma forte correlação ($r = 0,746$) entre Hg plasmático e excreção urinária sem correção por creatinina em trabalhadores expostos a mercúrio inorgânico. Entretanto, é adequado ajustar o efeito da diluição para reduzir a variação devido a diluição inconstante de amostras pontuais, no qual podem flutuar consideravelmente ao longo do dia, especialmente após a ingestão de líquidos ou aumento da sudorese. Obviamente, amostras diluídas aparentemente irão apresentar baixos teores de Hg, e amostras concentradas irão apresentar teores de Hg mais elevados (ALESSIO et al., 1985). A relação entre a concentração de creatinina em amostras pontuais de urina é relativamente constante ao longo do dia (CHEN, et al., 1992, 1995; GONDA & LINDBERG, 1994).

Os homens com idade entre 30 e 45 anos apresentaram a maior média de THg em sangue, plasma, urina e cabelo. Entre as mulheres, a maior média de THg na urina e cabelo, também foi na faixa etária de 30 a 45 anos. No entanto, as mulheres na faixa etária de 46 a 83 anos apresentaram a maior média de THg no sangue e plasma. Wakisaka e colaboradores (1990) encontraram diferença significativa entre a concentração média capilar de mercúrio em homens adultos comparada à de suas esposas. Oskarsson e colaboradores (1990), pesquisando a concentração de mercúrio em cabelo de 50 pessoas, também verificaram que o teor médio no sexo masculino foi significativamente maior do que no sexo feminino. Suzuki e colaboradores (1989) não encontraram diferença estatística entre as concentrações de mercúrio em cabelo com relação ao sexo. Birke e colaboradores (1972) encontraram em adultos não expostos ao mercúrio o teor capilar médio de 1,6 µg/g. Em 12 adultos com elevado consumo de peixe na dieta, Birke e colaboradores observaram a concentração média de 35,0 µg/g.

Foi observada uma considerável diferença nas concentrações de THg no sangue e cabelo entre as comunidades, provavelmente devido as diferenças no consumo de peixe, como a quantidade e as espécies mais consumidas. Peixes carnívoros apresentam consideravelmente mais mercúrio que peixes não carnívoros.

A média das razões entre as concentrações de THg entre cabelo e sangue foi de 1:281, próximo ao valor de 1:250 estabelecido a partir de estudos de várias populações expostas continuamente ao metilmercúrio. No entanto a elevada variação observada (1:13 - 1:13274), apontam para a prevalência de variações inter-

individuais decorrentes de fatores endógenos ou exógenos que exercem influência sobre a mobilização fisiológica do mercúrio.

No estudo de Akagi & Naganuma (2000), as concentrações de MeHg e THg no cabelo estiveram fortemente correlacionados com as concentrações de THg no sangue. A relação entre as concentrações de mercúrio no sangue e no cabelo foi de 1:242. Esse valor é próximo ao valor estabelecido de 1:250.

Muitos estudos sobre o metabolismo do MeHg têm sido desenvolvidos em modelos animais e as informações extrapoladas para humanos. Entretanto, existem diferenças inter-espécies que refletem na mudança de comportamento na ligação de MeHg com eritrócitos o que poderia explicar parte do mecanismo envolvido com as variações inter-individuais (NAGANUMA & IMURA, 1979).

Com base nos resultados obtidos, podemos considerar que:

- A população estudada, apresenta elevadas concentrações de mercúrio em relação a indivíduos não expostos;
 - Embora a média geral das razões das concentrações de mercúrio entre cabelo/sangue seja próxima ao relatado na literatura, a população apresenta um extenso intervalo de variação entre as razões das concentrações de mercúrio entre cabelo/sangue;
 - As variações inter-individuais nos diferentes biomarcadores avaliados neste estudo, indicam variações no perfil cinético do mercúrio nos voluntários avaliados, como por exemplo, alterações na absorção, transporte, deposição, aumento da demetilação, reabsorção, eliminação ou outros processos envolvidos na biotransformação do MeHg a IHg;
 - Este conjunto de resultados indica que futuros estudos precisam ser realizados na tentativa de identificar os fatores, que estariam causando tais variações.
-

ABERG, B.; EKMAN, L.; FALK, R.; GREITZ, U.; PERSSON, G.; SNIHS, J.O.; Metabolism of methyl mercury compounds in man. **Arch Environ Health**, v.19, p. 478-484, 1969.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for mercury. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1999.

AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO, Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F.J.P.; PFEIFFER, W.C.; KATO, H.; Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 175, p. 85-95, 1995.

AKAGI, H; NAGANUMA, A. Human exposure to mercury and the accumulation of methylmercury that is associated with gold mining in the Amazon Basin, Brazil **J Health Science**, v. 46, n. 5 , p. 323-328, 2000.

ALESSIO, L.; BERLIN, A.; TOFFOLETTO, F.; GHEZZI, I. Reability of urinary creatinine as a parameter used to adjust of urinary biological indicators. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 55, p. 99-106, 1985.

ALVES, M. F. A.; FRAIJI, N.A.; BARBOSA, A. C.; LIMA, D. S. N.; SOUZA, J. R.; DÓREA, J. G.; CORDEIRO, G, W. O. Fish consumption, mercury exposure and serum antinuclear antibody in Amazonians, **Int J Environ**, v. 16, n. 4, p. 255-262, 2006.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação aos agentes químicos ambientais . **Rev Bras Epidem**, v.6, n.2, p.158-170, 2003.

AMORIM, M.; MERGLER, D.; BAHIA, M.O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R.R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. **An Acad Bras Cienc**, p. 497-507, 2000.

ANCORA, S.; ROSSI, R.; SIMPLICIO, P.D.; LUSINI, L.; LEONZIO, C. In vitro study of methyl mercury in blood of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 42, n. 3, p. 348-353, 2002.

ASCHNER, M.; CLARKSON, T.W. Methyl mercury uptake across bovine brain capillary endothelial-cells invitro-the role of amino-acids. **Pharmacol Toxicol**, v. 64, n. 3, p. 293-299, 1989.

ASCHNER, M.; EBERLE, N.B.; GODERIE, S.; KIMELBERG, H.K. Methylmercury uptake in rat primary astrocyte cultures: the role of the neutral amino acid transport system. **Brain Res**, v. 521, p. 221-228, 1990.

BAETA, A. P.; KEHRIG, H. A.; MALM, O.; MOREIRA, I. Total mercury and methylmercury in fish from a tropical estuary. **Env Toxicol**, v.10, p. 183-192, 2006.

BAKIR, F.; DAMLUJI, S.F.; AMINZAKI, L.; MURTADHA, M.; KHALIDI, A.; ALRAWI, N.Y.; TIKRITI, S.; DHAHIR, H.I.; CLARKSON, T.W.; SMITH, J.C.; DOHERTY, R.A.

Methylmercury poisoning in Iraq - Interuniversity Report. **Science**, v. 181, n. 4096, p.230-241, 1973.

BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. **Fund Appl Toxicol**, v. 5, n. 5, p. 816-831, 1985.

BALZILE, N.; WU, G. J.; CHEN, Y. W.; APPANNA, V. D. Detoxification of selenite and mercury by reduction and mutual protection in the assimilation of both elements by *pseudomonas fluorescens*. **Sci Total Environ**, v. 367, p. 704-714, 2006.

BARBOSA, A. C. Mercury contamination in the Brazilian Amazon. Environmental and occupational aspects. **Water Air Soil Pollut**, v. 80 n. 1-4, p. 109-21, 1995.

BASTOS, W.R.; GOMES, J. P.O.; OLIVEIRA, R.C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E. L.; BERNARDI, J. V. E.; LACERDA L. D. SILVEIRA, E. G.; PFEIFFER, W.C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 368, n. 1, p. 344-351, 2006.

BATCHELET E.; HILMAN D.; SMOLENSKY M.; HALBERG F. Angular-linear correlation coefficient for rhythmometry and circannual change in human birth rates at different geographic latitudes. **Int J Chronobiol**, v. 1, p. 183-202, 1973.

BERGLUND M.; LIND, B.; BJÖRNBERG, K. S.; PALM, B.; EINARSSON, Ö.; VAHTER, M. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. **Environ Health**, v. 4 p. 20, 2005.

BIDONE, E.D.; CASTILHOS, Z.C.; DE SOUZA, T.M.C. Fish contamination and human exposure to mercury in the Tapajos river basin, Para state, Amazon, Brazil: A screening approach. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 59, n. 2, p. 194-201, 1997.

BIRKE, G.; SJOSTRAN, B.; SKERVIN, S.; WESTERMA, T.; JOHNELS, A.G.; PLANTIN, L.O. Studies on humans exposed to methyl mercury through fish consumption. **Arch Environ Health**, v. 25, n. 2, p. 77, 1972.

BORNMANN, G.; HENKE, G.; ALFES, H.; MOLLMANN, H. Intestinal absorption of metallic mercury. **Arch Toxicol**, v. 26, p. 203-209, 1970.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F.; Influence of exposure length on the direct bioaccumulation of two mercury compounds by *Salmo gairdneri* (fry) and the relationship between organism weight and mercury concentrations. **Water Res**, v. 18, n. 1, p. 81-86, 1984.

BRABO, E. D.; SANTOS, E. D.; DE JESUS I. M.; MASCARENHAS, A. F. S.; FAIAL, K. D. Mercury contamination of fish and exposures of an indigenous community in Para State, Brazil. **Environ Res**, v. 84, n. 3, p. 197-203, 2000.

BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. McGraw-Hill, p. 467-469, 2592-2593, 2002.

- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria no 685/98. **Diário Oficial**, Brasília, seq 1, pt. 1, p. 1415-1437, 24 set. 1998.
- BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 204, p. 274–308, 2005.
- CABANA, G.; RASMUSSEN, J.B. Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. **Nature**, v 372, n. 6503, p. 255-257, 1994.
- CARUSO, 2007. Mercury exposure and ecosystem health in the Amazon. <http://www.unites.uqam.ca/gmf/caruso/caruso.htm>.
- CASARETT & DOLLS, **Toxicology, the basic science of poisons**. Curtis D. Klassen, 6ª Edição; Mc.Graw Hill, p. 834–837, 2001.
- CAURANT, F.; NAVARRO, M.; AMIARD, J.C. Mercury in pilot whales: possible limits to the detoxification process. **Sci Total Environ**, v. 186, p. 95-104, 1996.
- CERNICHIARI, E.; BREWER, R.; MYERS, G. J.; MARSH, D. D.; LAPHAM, L. W., COX, C., SHAMLAYE, C. F., BERLIN, M., DAVIDSON, P. W., CLARKSON, T.W. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. **Neurotoxicology**, v.16, n. 4, p. 705-710, 1995.
- CHANG, L. W., SUBER, R. Protective effect of selenium on methylmercury toxicity: a possible mechanism. **Bull. Environ Contam Toxicol**, v. 29, p. 285-289, 1982.
- CHARLESTON, J. S.; BODY, R. L.; MOTTET, N. K.; VAHTER, M. E.; BURBACHER, T. M. Autometallographic determination of inorganic mercury distribution in the cortex of the calcarine sulcus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical exposure to methylmercury and mercuric chloride. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 132, p. 325–333, 1995.
- CHARLESTON, J. S.; BODY, R. L.; BOLENDER, R. P.; MOTTET, N. K.; VAHTER, M. E.; BURBACHER, T. M. Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical methylmercury exposure. **Neurotoxicology**, v. 17. n. 1, p. 127-138, 1996.
- CHEN, X. B.; GRUBIC, G.; ORSKOV, E. R.; OSUJI, P. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. **An Prod**, v. 55, n. 2, p.185-191, 1992.
- CHEN, X. B.; MEJIA, A. T.; KYLE, D. J.; ORSKOV, E. R. Evaluation of the use of the purine derivative:creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. **J Agric Sci**, v. 125, n. 1, p. 137-143, 1995.
- CHEN, C.; YU, H.; ZHAO, J.; LI, B.; QU, L.; LIU, S.; ZHANG, P.; CHAI, Z. The roles of serum selenium and selenoproteins on mercury toxicity in environmental and occupational exposure. **Environ Health Perspect**, v. 14, n. 2, p. 297-301, 2006.
-

CLARKSON, T. W. Recent advances in the toxicology of mercury with emphasis on the arylmercurials. **Crit Rev Toxicol**, v. 1, p. 203-234, 1972.

CLARKSON, T. W.; HURSH, J. B.; SAGER, P. R.; SYVERSEN, T. L. M. **Mercury: Biological Monitoring of Toxic Metals**. Edited by CLARKSON, T.W.; FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; SAGER, P.R. New York and London, Plenum Press, p. 199-246, 1988.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspect**, v. 110, n. 1, p. 11-23, 2002.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit Rev Toxicol**, v. 36, n. 8, p. 609-662, 2006

CLARKSON, T. W.; VYAS, J. B.; BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **Am J Ind Med**, v. 50, n. 10, p. 757 – 764, 2007.

COUNTER, S. A.; BUCHANAN, L. H. Mercury exposure in children: a review **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 198, n. 2, p. 209-230, 2004.

DALPINO, F.; MENNA-BARRETO, L.; OLIVEIRA, H.; FAXIA, E. Biological rhythms in serum lipids and lipoproteins of a Brazilian population correlate with the prevalence of atherosclerotic cardiovascular disease. **Epid Card disease**, Mon, June 19, 2006.

DAVIS, L. E.; KORNFELD, M.; MOONEY, H. S.; FIEDLER, K. J.; HAALAND, K. Y.; ORRISON, W. W.; CERNICHIARI, E.; CLARKSON, T. W. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. **Ann Neurol**, v. 35, p. 680-688, 1994.

D'ITRI, F.M. **The environmental mercury problem**. CRC-Press, Michigan, 1972.

DOLBEC, J.; MERGLER, D.; SOUSA PASSOS, C. J.; DE MORAIS, S. S.; LEBEL, J. Methylmercury exposure effects motor performance of a riverine population of the Tapajós river, Brazilian, Amazon. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 73, n. 3, p. 195-203, 2000.

DOLBEC, J. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 271, p. 87-97, 2001.

DOREA, J. G.; BARBOSA, A. C.; SILVA, G. S. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. **Comp Biochem Physiol C**, v. 142, p. 275-283, 2006.

EBBESTADT, U, GUNDERSON N, TORGRIMSEN TA. Simple method for the determination of inorganic mercury and methylmercury in biological samples by flameless atomic absorption. **At Absorpt Newsl**, v.14, p. 142-143, 1975.

ERCAL, D.; ORHAN, H. G.; BURNS, N. A. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. **Curr Top Med Chem**, v. 1, p. 529-539, 2001.

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **Sci Total Environ**, v. 275, n. 1-3, p. 71-82, 2001.

FARELLA, N. Deforestation modifying terrestrial organic transport in the Rio Tapajos, **Brazilian Amazon Org Geochem**, v. 32, p. 1443-1458, 2001.

FARELLA, N. *Les fermes familiales de la région frontière du Tapajós en Amazonie brésilienne: relations entre les origines, les pratiques agricoles, les impacts sur les sols et le déboisement*. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) – Université du Québec à Montréal. Montréal, Canadá, 2005.

FILLION, M.; MERGLER, D.; PASSOS, C. J. S.; LARRIBE, F.; LEMIRE, M.; GUIMARÃES, J. R. D. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. **Environ Health**, v. 5, p. 29, 2006.

FRIBERG, L.; NORDBERG, G. Inorganic mercury – a toxicological and epidemiological appraisal. **Mercury, Mercurial and Mercaptans**. Edited by Miller MW and Clarkson TW. Springfield, CC. Thomas, 1973.

FUHR, B. J.; RABENST, D. L. Nuclear magnetic-resonance studies of solution chemistry of metal complexes: Binding of cadmium, zinc, lead and mercury by glutathione. **J Am Chem Soc**, v. 95, n. 21, p. 6944-6950, 1973.

GAILER, J. Reactive selenium metabolites as targets of toxic metals/metalloids in mammals: a molecular toxicological perspective **Appl Organom Chem**, v. 16, n. 12, p. 701-707, 2002.

GONDA, H. L.; LINDBERG, J. E. Evaluation of dietary nitrogen utilization in dairy cows based on urea concentration in blood, urine and milk, and on urinary concentration of purine derivatives. **Acta Agricul Scand**, v. 44, n. 4, p. 236-245, 1994.

GOULLÉ JP, MAHIEU L, CASTERMANT J, NEVEU N, BONNEAU L, LAINÉ G, BOUIGE D, LACROIX C. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair reference values, **Forensic Science International**, v. 153, p. 39-44, 2005.

GRANDJEAN, P.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; WHITE, R. F.; JORGENSEN, P. J.; WEIHE, P.; DEBES, F.; KEIDING, N. Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in children aged 7 years. **Am J Epidemiol**, v. 150, n. 3, p. 301-305, 1999.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; FILLION, M.; PASSOS, C. J. S.; BARBOSA, F.; GARCIA, S.; MERGLER, D. Mercury exposure in fish consumption communities of the Brazilian Amazon is associated with oxidative stress. **Toxicol Lett**, No prelo, 2009.

GUIMARÃES, J. R. D.; MEILI, M.; MALM, O.; BRITO, E. M. S. Hg methylation in sediments and floating meadows of a tropical lake in the Pantanal floodplain, Brazil. **Sci of the Total Environment**, v. 213, p. 165-175, 1998.

GUIMARÃES, J. R. D.; MEILI, M.; HYLANDER, L. D.; ROULET, M.; MAURO, J. B. N.; LEMOS, R. A. Mercury net methylation in five tropical flood plain regions of Brazil: high in the root zone of floating macrophyte mats but low in surface sediments and flooded soils. **Sci of the Total Environment**, v. 261, p. 99 -107, 2000.

GUIMARÃES, M. N. K.; D'ASCENÇÃO, R.; CALDART, F. A.; GRISOLIA, C. K.; SOUZA, J. R.; BARBOSA, A. C.; CORDEIRO, C. M. T.; FERRARI, I. Analysis of genetic susceptibility to mercury contamination evaluated through molecular biomarkers in at-risk Amazon Amerindian populations. **Gen Mol Biol**, v. 28, n. 4, p. 827-832, 2005.

HARADA, M. Minamata disease - methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Crit Rev Toxicol**, v. 25, n. 1, p. 1-24, 1995.

HARADA, M.; NAKANISHI, J.; YASODA, E.; PINHEIRO, M. C. N.; OIKAWA, T. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon. Mercury level of head hair and health effects. **Environ Int**, v. 27, p. 285-290, 2001.

HARGREAVES, R. J.; EVANS, J. G.; JANOTA, I.; MAGOS, L.; CAVANAGH, J. B. Persistent mercury in nerve cells 16 years after metallic mercury poisoning. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 14, p. 443-452, 1988.

HARRIS, H.; PICKERING, I. J.; GEORGE, G. N. The chemical form of mercury in fish. **Science**, v. 301, p. 1203, 2003.

HOLSBEEK, L.; SIEBERT, U.; JOIRIS, C. R. Heavy metals in dolphins stranded on the French Atlantic Coast. **Sci Total Environ**, v. 217, p. 241-249, 1998.

HULTBERG, B.; ANDERSSON, A.; ISAKSSON, A. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. **Toxicology**, v. 156, p. 93-100, 2001.

IGATA, A. Epidemiological and clinical features of Minamata Disease. In: SUZUKI, T.; IMURA, N.; CLARKSON, T.W. **Advances in mercury toxicology**. Plenum Press, New York, p. 439-457, 1991.

KAKKAR, P. **Use of biomarkers in environmental health**. Course manual of WHO MOEF Sponsored Programme on Environmental Epidemiology, p. 55-61, 1999.

KAKKAR, P.; JAFFERY, F. Biological markers for metal toxicity. **Environ. Toxicol Pharmacol**, v. 19, p. 335-359, 2005.

KERPER, L. E.; BALLATORI, N.; CLARKSON, T. W. Methylmercury transport across the blood brain barrier by amino acid carrier. **Am J Physiol**, v. 262, p.761-765, 1992.

KERSHAW, T. G.; CLARKSON, T. W.; DHAHIR, P. H. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man, **Arch Environ Health**, v. 35, p. 28-36, 1980.

LAUWERYS, R. R. **Industrial chemical exposure** – Guidelines for biological monitoring, 2^ªed. London: Lewis Publishers, 1993.

LEANER, J. J.; MASON, R. P. Methyl mercury accumulation and fluxes across the intestine of channel catfish. *Ictalurus punctatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol Pharmacol*, v. 132, n. 2, p. 47-259, 2002.

LEBEL C. P; ALI S.F.; BONDEY S.C.; Deferoxamine inhibitions methylmercury induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 112, p. 161-165, 1992.

LEBEL, J.; MERGLER, D.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; DOLBEC, J.; MIRANDA, D.; ARANTES, G.; RHEAULT, I.; PICHET, P. Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. *Neurotoxicology*, v. 17, n. 1, p. 157-167, 1996.

LEBEL, J. Fish diet and mercury exposure in riparian Amazonian population. *Water Air Soil Pollut*, v. 97, p. 31-44, 1997.

LEMIRE, M.; MERGLER, D. ; FILLION, M. ; PASSOS, C. J. S. ; GUIMARÃES, J. R. D.; DAVIDSON, R.; LUCOTTE, M. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. *Sci Total Environ*, v. 366, n.1, p. 101-111, 2006.

LINARES, A. F.; LOIKKANEN, J.; JORGE, M. F.; SORIA, R. B.; NOVOA, A. V. Antioxidant and neuroprotective activity of the extract the Seaweed, *Halimeda incrassata*, against in vitro and in vivo toxicity induced by methylmercury. *Hum Toxicol*, v. 46, n. 1, p. 1-5, 2004.

LINDBERG, A.B.; JORNBERG, K.A.; VAHTER, M.; BERGLUND, M. Exposure to methyl mercury in non fish eating people in Sweden. *Environ Res*, v. 96, p. 28-33, 2004.

LORSCHIEDER, F.L.; SUMMERS, A. O.; VIMY, M. J. Mercury in dental amalgam - reply. *FASEB J*, v. 9, n. 14, p. 1499-1500, 1995.

MAGOS, L.; WEBB, M. Difference in distribution and excretion of selenium and cadmium or mercury after their simultaneous administration subcutaneously in equimolar doses. *Arch Toxicol*, v. 36, p. 63-69, 1976.

MAGOS, L.; WEBB, M. The effect of selenium on the brain uptake of methylmercury. *Arch Toxicol*, v. 38, p. 301-307, 1977.

MAGOS, L.; WEBB, M.; HUDSON, A.R.; Complex formation between selenium and methyl mercury. *Chem Biol Interact*, v. 28, p. 359-362, 1979.

MAGOS, L.; BROWN, A. W.; SPARROW, S.; BAILEY, E.; SNOWDEN, R. T.; SKIPP, W. R. The comparative toxicology of ethyl- and methylmercury. *Arch Toxicol*, v. 57, p. 260-267, 1985.

MAGOS, L.; CLARKSON, T. W.; SPARROWS, S.; HUDSON, A. R. Comparison of the protection given by selenite, selenomethionine and biological selenium against the renotoxicity of mercury. **Arch Toxicol**, v. 60, n. 6, p. 422-426, 1987.

MAGOS, L.; CLARKSON, T. W. Overview of the clinical toxicity of mercury. **Ann Clin Biochem**, v. 43, p. 257-268, 2006.

MAINVILLE, N.; WEBB, J.; LUCOTTE, M.; DAVIDSON, R.; BETANCOURT, O.; CUEVA, E.; MERGLER, D. Decrease of soil fertility and release of mercury following deforestation in the Andean Amazon, Napo River Valley, Ecuador. **Sci of the Total Environment**, v. 368, n. 1, p. 88-98, 2006.

MALM, O.; BRANCHES, F. J. P.; AKAGII, H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós River Basin, Brazil. **Sci Total Environ**, v.175, p. 141-150, 1995.

MALM, O.; GUIMARÃES, J. R. D.; CASTRO, M. B.; BASTOS, W. R.; VIANA, J. P.; BRANCHES, F. J. P.; SILVEIRA, E. G.; PFEIFFER, W. C. Follow-up of mercury levels in fish, human hair and urine in the Madeira and Tapajós basins, Amazon, Brazil. **Water Air Soil Pollut**, v. 97, n. 1-2, p. 45-51, 1997.

MARC, H. G.; BERNTSEN, A.A.; RICHARD, D. H. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Aquat Toxicol**, v. 65, n. 1, p. 55-72, 2003.

MARINS, R. V.; LACERDA, L. D.; PARAQUETTI, H. H. M.; DE PAIVA, E. C.; VILLAS BOAS, R. C. Geochemistry of Mercury in Sediments of a Sub-Tropical Coastal Lagoon, Sepetiba Bay, Southeastern Brazil. **Bull Environ Contam Toxicol**, v.61, p. 57 – 64, 1998.

MAURO, J. B. N.; GUIMARAES, J. R. D.; MELAMED, R. Mercury methylation in a tropical macrophyte: Influence of abiotic parameters. **Applied Organom Chem**, v. 13 n. 9, p. 631-636, 1999.

MEILI, M. The coupling of mercury and organic matter in the biogeochemical cycle - towards a mechanistic model for the boreal forest zone. **Water Air Soil Pollut**, v. 56, p. 333-347, 1991.

MERGLER, D.; HENRY, A.; ANDERSON, H. A.; CHAN, H. M.; MAHAFFEY, K.R.; MICHAEL, M.M.; SAKAMOTO, M.; STERN, A.H.; Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. **Ambio**, v. 36, p. 3–11, 2007.

MIETTINEN, J.K. Absorption and elimination of dietary (Hg 2+) and methylmercury in man. **Mercury, Mercurial and Mercaptans**. Edited by MILLER, M.W.; CLARKSON, T.W. Springfield, CC. Thomas, p. 233-246, 1973.

MITCHELL, R. J.; OSBORNE, P. B.; HAUBENREICH, J. E.; **J Long Term Eff Med Implants**, v. 15, n. 6, p. 709-21, 2005.

-
- NRC. **Toxicological effects of methylmercury**. Edited by Council NR, Washington, DC, National Academy Press, p. 344, 2000.
- NAGANUMA, A.; IMURA, N. Methylmercury binds to a low molecular weight substance in rabbit and human-erythrocytes. **Toxicol App Pharmacol**, v. 3, p. 613-616, 1979.
- NYLANDER, M.; FRIBERG, L.; EGGLESTON, D.; BJORKMAN, L. Mercury accumulation in tissues from dental staff and controls in relation to exposure. **Swed Dent J**, v. 13, p. 235-243, 1989.
- OPITZ, H.; SCHWEINSBERG, F.; GROSSMANN, T.; WENDT-GALLITELLI, M. F.; MEYERMANN, R. Demonstration of mercury in the human brain and other organs 17 years after metallic mercury exposure. **Clin Neuropathol**, v. 15, p. 139-144, 1996.
- OSKARSSON, A.; OHLIN, B.; OHLANDER, E.M.; ALBANUS, L. Mercury levels in hair from people eating large quantities of Swedish freshwater fish. **Food Add Contam**, v. 4, p. 555-62, 1990.
- OU, S.; GAO, K.; LI, Y. An in vitro study of wheat bran binding capacity for Hg, Cd, and Pb. **J Agric Food Chem**, v. 47, p. 4714-4717, 1999.
- PALMER CD, LEWIS MEJR, GERAGHTY CM, BARBOSA FJR, PARSONS PJ. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochim Acta**, part B, v. 61, p. 980-990, 2006.
- PASSOS, C. J. S.; MERGLER, D.; GASPAR, E.; MORAIS, S.; LUCOTTE, M.; LARRIBE, F.; GROSOBOIS, S. Caracterização do consumo alimentar de uma população ribeirinha na Amazonia Brasileira. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 4, n.1-2, p. 72-84, 2001.
- PASSOS, C. J. Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon. **Environ Res**, v. 93, p. 123-130, 2003.
- PASSOS, C. J. S.; MERGLER, D.; LEMIRE, M.; FILLION, M.; GUIMARÃES, J. R. D. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. **Sci Total Environ**, v. 373, p. 68-76, 2007.
- PHELPS, R. W.; CLARKSON, T. W.; KERSHAW, T. G.; WHETLEY, B. Interrelationships of blood and hair mercury concentrations in a North American population exposed to methylmercury, **Arch Environ Health**, v. 35, p. 161-168, 1980.
- PINHEIRO, M. C. N.; OIKAWA T.; VIEIRA J. L. F.; GOMES, M. S. V.; GUIMARÃES, G. A.; CRESPO-LÓPEZ, M. E.; MÜLLER, 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. **Braz J Med Biol Res** v. 39, n. 3, p. 411-414, 2006.
-

RAHOLA, T.; HATTULA, T.; KOROLAINEN, A.; MIETTINEN, J. K. Elimination of free and protein bound ionic mercury in man. **Ann Clin. Res**, v. 5, p. 214-219, 1973.

RIFAI, N.; DUFOUR, R.; COOPER, G. R.; Preanalytical variation in lipid lipoprotein, and apolipoprotein testing. In: RIFAI, N.; WARNICK, R.; DOMINICZAK, M. **Handbook of lipoprotein testing**. c. 4 Washington, DC: AACC Press, 1997.

RISHER, J.; DEWOSKIN, R. **Toxicological profile for Mercury**. In: Services, U.D. O. H. A. H. (Ed.), Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.

RISHER, J. F.; AMLER, S. N. Mercury exposure: Evaluation and intervention - The inappropriate use of chelating agents in the diagnosis and treatment of putative mercury poisoning. **Neurotoxicology**, v. 26, n. 4, p. 691-699, 2005.

ROONEY, J. P. K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology**, v. 234, p. 145-156, 2007.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; CANUEL, R.; RHEAULT, I.; TRAN, S.; DE FREITAS, Y.G., FARELLA, N.; SOUZA DO VALE, R.; SOUZA PASSOS, C.J., DE JESSUS DA SILVA, E.; MERGLER, D.; AMORIM, M. Distribution and partition of total mercury in waters of the Tapajós River Basin, Brazilian. **Amazon Sci Total Environ**, v.213, p. 203-211, 1998.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; FARELLA, N.; SERIQUE, G.; COELHO, H.; SOUSA PASSOS, C. J.; DE JESUS DA SILVA, E.; SCAVONE DE ANDRADE, P.; MERGLER, D.; GUIMARÃES, J.R.D.; AMORIM, M. Effects of Recent Human Colonization on the Presence of Mercury in Amazonian Ecosystems. **Water Air Soil Pollut**, v. 112, n. 3-4, p. 297-313, 1999.

ROWLAND, I. R. Interactions of the gut microflora and the host in toxicology. **Toxicol Pathol**, v. 16. n. 2, p. 147 – 153, 1988.

ROWLAND, I. R.; ROBINSON, R. D.; DOHERTY, R. A. Effects of diet on mercury metabolism and excretion in mice given methylmercury: role of gut flora. **Arch Environ Health**, v. 39, n. 6, p. 401 – 408, 1984

ROWLAND, I. R.; MALLET, A. K.; FLYNN, J.; HARGREAVES, R. J. The effect of various dietary fibres on tissue concentration and chemical form of mercury after methylmercury exposure in mice. **Arch Toxicol**, v. 59, n. 2, p. 94-98, 1986.

RÜDIGER, H. W. **Biomonitoring in occupational medicine**. In: MARQUART, H.; SCHÄFER, S. G., MCCLELLAN, R.; WELSCH, F. (eds.). Toxicology. San Diego: Academic Press, p. 1027-1039, 1999.

SAMPAIO DA SILVA, D. *Structure trophique et contamination au mercure dès communautés de poissons du fleuve Tapajós en Amazonie*. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Université du Québec à Montréal. Montréal, Canadá, 2002.

SAMPAIO DA SILVA, D.; LUCOTTE, M.; ROULET, M.; POIRIER, H.; MERGLER, D.; OLIVEIRA SANTOS, E.; CROSSA, M. Trophic structure and bioaccumulation of mercury in fish of three natural lakes of the Brazilian Amazon. **Water Air Soil Pollut**, v. 165, p. 77-94, 2005.

SARAFIAN, T. A. Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. **Met Ions Biol Syst**, v. 36, p. 415-444, 1999.

SCHOBER, S. E.; SINKS, T. H.; JONES, R. L.; BOLGER, P. M.; MCDOWELL, M.; OSTERLOH, J.; GARRET, E. S.; CANADY, R. S.; DILLON, C. F.; SUN, Y.; JOSEPH, C. B.; MAHAFFEY, K. R. Blood mercury levels un US childrens and woman of child-bearing age. **JAMA**, p. 1667-1674, 2000.

SIMMONS-WILLIS, T. A.; KOH, A. S.; CLARKSON T. W.; BALLATORI, N. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino transporter (LAT)-1 and LAT2. **Biochem J**, v. 367, p. 239-246, 2002.

SKERFVING, S. Mercury in women exposed to methylmercury throught fish consumption, and in their newborn babies and breast milk. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 41, p. 475-482, 1988.

SUDA, I.; SUDA, M.; HIRAYAMA, K. Phagocytic cells as a contributor to. In vivo degradation of alkyl mercury. **Bull. Environ Contam Toxicol**, v. 51, p. 594-400, 1993.

SUZUKI, K. T.; OGRA, Y. Metabolism of selenium and its interaction with mercury: mechanism by a speciation study. **Phosphorus, Sulfur and Silicon**, v.171, p. 135-169, 2001.

SUZUKI, T.; WATANABE, S.; MATSUO, N. Comparison of hair with nail as index media for biological monitoring of mercury. **Sangyo Igakn**, v. 31, p. 235-8, 1989.

TAKEUCHI, T.; ETO, K.; TOKUNAGA, H. Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty-six years. **Neurotoxicology**, v. 10, p. 651-657, 1989.

TELMERA, B. K.; COSTA, C. D. M.; SIMÕES, R.; ANGÉLICA, B. E.; ERIC, S. A. F.; MAURICE, Y. G. The source and fate of sediment and mercury in the Tapajós River, Pará, Brazilian Amazon: Ground- and space-based evidence. **J Environ Manage**, v. 81, p. 101-113, 1995.

TRUDEL, M.; RASMUSSEN, J. B. Predicting mercury concentration in fish using mass balance models. **Ecol Appl**, v. 11, n. 2, p. 517-529, 2001.

ULLRICH, S. M.; TANTON, T. W.; ABDRAHITOVA, S. A. Mercury in the Aquatic Environment: A Review of Factors Affecting Methylation. Critical Reviews in **Environ Sci Technol**, v. 31, n. 3, p. 241-293, 2001.

VAHTER, M.; MOTTET, N. K.; FRIBERG, L.; LIND, B.; SHEN, D. D.; BURBACHER, T. Speciation of mercury in the primate blood and brain following long-term exposure to methyl mercury. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 12, p. 221-229, 1994.

VAHTER, M. E.; MOTTET, N. K.; FRIBERG, L. T.; LIND, S. B.; CHARLESTON, J. S.; BURBACHER, T. M. Demethylation of methyl mercury in different brain sites of *Macaca fascicularis* monkeys during long-term subclinical methyl mercury exposure. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 134, p. 273-284, 1995.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metal and antioxidants in oxidative stress induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

WAGEMANN, R.; TREBACZ, E.; BOILA, G.; LOCKHART, W. L. Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals. **Sci Total Environ**, v. 218, p. 19-31, 1998.

WAKISAKA, I.; YANAGIHASHI, T.; SATO, M.; NAKANO, A. Factors contributing to the difference of hair mercury concentrations between the sexes. **Nippon Eiseigaku Zasshi**, v. 45, p. 654-664, 1990.

WEIL, M.; BRESSLER, J.; PARSONS, P.; BOLLA, K.; GLASS, T.; SCHWARTZ, B. Blood mercury levels and neurobehavioral function, **JAMA**, v. 293, p. 1875-1882, 2005.

WETTERHAHN - JENNETTE, K. The role of metals in carcinogenesis: Biochemistry and Metabolism. **Environ Health Perspect**, v. 40, p. 233-252, 1981.

WHO. International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Environmental Health Criteria 101: Methylmercury**. International Program on Chemical Safety. Geneva. World Health Organization, 1990.

WHO. **Inorganic mercury. Environmental Health Criteria**, volume 118. Edited by IPCS, Geneva, World Health Organization, 1991.

WHO – International Programme on Chemical Safety (IPCS) – **Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva; 1993.

XU, S.; WANG, Y.; ROE, B.; PEARSON, W. R. Characterization of the human class I glutathione S-transferase gene cluster and GSTM1 deletion. **J Biol Chem**, v. 273, p. 3517-3527, 1998.

ZALUPS, R. K.; AHMAD, S. Handling of the homocysteine S-conjugate of methylmercury by renal epithelial cells: role of organic anion transporter 1 and amino acid transporters. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 315, p. 896-904, 2005a.

ZALUPS, R. K.; AHMAD, S. Transport of *N*-acetylcysteine S-conjugates of methylmercury in Madin-Darby canine kidney cells stably transfected with human isoform of organic anion transporter. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, p. 1158-1168, 2005b.