

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Avaliação da Biodistribuição de Mercúrio em Roedores
Após Exposição Crônica**

Mariana Zanotelli Gomes Fornazier

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2016**

Mariana Zanotelli Gomes Fornazier

**Avaliação da Biodistribuição de Mercúrio em Roedores Após
Exposição Crônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro.

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo dos Santos.

**VITÓRIA
2016**

Avaliação da Biodistribuição de Mercúrio em Roedores Após Exposição Crônica

Mariana Zanotelli Gomes Fornazier

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Aprovado (a) em: 31/ 10/2016 por

Profa. Dra. Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Leonardo dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientador

Profa. Dra. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde
Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. Tatiana Dillenburg Saint’Pierre
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro- PUC-Rio

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, 31 de outubro de 2016

*Dedico este trabalho a minha família,
em especial, minha mãe, Eloá, meu pai,
Natal, aos meus irmãos e ao meu
querido esposo, Juan.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois reconheço que sem a autorização e a bênção Dele não estaria na Universidade Federal do Espírito Santo e não estaria terminando mais uma fase da minha vida – a Pós-Graduação. Agradeço a Nossa Senhora, por sempre estar passando na frente.

Agradeço aos meus pais, pela paciência, companheirismo, força e acima de tudo pelo amor. E agradeço mais ainda por eles serem os meus pais. Eles foram e continuarão sendo o alicerce da minha vida. Mãe, Pai te amo! E pelos meus irmãos por todo apoio.

Agradeço também ao meu querido esposo, por toda a compreensão, parceria, paciência e apoio.

Agradeço a todos os meus amigos que participaram diretamente e indiretamente desta conquista.

Agradeço também a minha querida orientadora, Prof^a. Dr. Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro, por ter me aceitado como mestranda, pela paciência e dedicação durante a orientação deste trabalho.

Agradeço o meu co-orientador, Prof. Dr. Leonardo dos Santos, por todo o apoio e incentivo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da bioacumulação e biomagnificação do metilmercúrio	2
Figura 2 – Rato Wistar	12
Figura 3 – Ilustração do local onde é injetada a uretana	13
Figura 4 - Ilustração dos locais das incisões para acesso aos órgãos coletados	14
Figura 5 - Distribuição de mercúrio, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$, em órgãos de rato após exposição crônica por 30 dias a diferentes doses: (A) G1 ($2,172 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e (B) G2 ($21,71 \mu\text{g.kg}^{-1}$). *A concentração de mercúrio nos rins do G2 está em escala 1:100.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos causados pelo mercúrio a diferentes sistemas do corpo humano.	6
Tabela 2- Condição de operação do ICP-MS	16
Tabela 3. Concentração de Hg no material de referência DORM 4 utilizando diferentes temperaturas de secagem e diferentes padrões interno, cujo valor de referência é igual a $0,412 \pm 0,036 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Hg.	17
Tabela 4. Características de desempenho do método utilizado para determinação de mercúrio em amostras de sangue e órgãos de rato utilizando ICP-MS.	19
Tabela 5. Percentual de recuperação obtido para determinação de mercúrio em amostras de sangue e órgãos de rato, após fortificação com 1 e $2 \mu\text{g.L}^{-1}$.	19
Tabela 6. Média do peso corpóreo (g) dos ratos dos grupos CT, G1 e G2 após a 1 ^a e 4 ^a semana de tratamento com HgCl_2 .	20
Tabela 7. Média do peso seco e úmido dos órgãos dos ratos dos grupos CT, G1 e G2.	21
Tabela 8. Resultados das concentrações de mercúrio em amostras de sangue dos ratos CT, G1, G intermediário e G2 no ICP-MS.	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSHA	Ocupação da saúde a Agência de segurança
P.A	Para análise
i.p	Intraperitoneal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
CRM	Certified Reference Material
R ²	Coeficiente de determinação
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
CV AAS	Cold vapor atomic absorption spectrometry
DNA	Ácido desoxirribonucleico

RESUMO

O mercúrio necessita constantemente de monitoramento devido à sua capacidade tóxica em concentrações em níveis traços, acarretando vários distúrbios biológicos, como problemas renais, de asma, no sistema nervoso central e nas doenças como o Alzheimer e Parkinson. O presente estudo descreve a biodistribuição do mercúrio em sangue e órgãos de ratos (coração, encéfalo, rim, fígado e testículo) após administração de cloreto de mercúrio (HgCl_2). Os animais foram divididos em três grupos experimentais, sendo 6 ratos controles, (CT) tratados com NaCl ; 7 ratos tratados com $2,172 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cloreto de mercúrio (G1) e 7 ratos tratados com $21,72 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cloreto de mercúrio (G2). Após 30 dias, os ratos foram mortos, sendo coletados o sangue e os órgãos. Para o processo de decomposição assistida por radiação micro-ondas dos órgãos, pesou-se cerca de 0,1 g de amostra em um tubo de Teflon, ao qual foram adicionadas as seguintes soluções: 1 mL de H_2O_2 30%v/v; 6 mL de H_2O ultrapura e 1 mL de HNO_3 concentrado. Para a determinação no sangue, 200 μL de sangue foram adicionados em um tubo de polipropileno de 15 mL sendo diluído com Triton-X 0,005 % m/v em ácido nítrico 0,5 % v/v a 10 mL (diluição foi de 1+49). O mercúrio foi determinado por ICP-MS, obtendo-se valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), respectivamente, 6,0 ng. L^{-1} e $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Em relação aos órgãos, para o grupo G1, o rim foi o único órgão cujas concentrações de Hg foram acima do LQ, $302,00 \pm 45,07 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, os demais ficaram abaixo. Para o grupo G2, todos os órgãos ficaram acima do LQ, sendo que coração, encéfalo e testículos foram os órgãos que apresentaram as menores concentrações de mercúrio: $15,61 \pm 4,64$; $13,92 \pm 2,03$ e $15,85 \pm 2,45 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente. O fígado apresentou uma concentração de mercúrio igual a $25,51 \pm 7,69 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e o rim foi o órgão alvo, cuja concentração encontrada foi de $2818 \pm 1586 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. A concentração de mercúrio encontrada no sangue nos grupos G1 e G2 foram respectivamente: $3,76 \pm 0,58 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4,29 \pm 0,51 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Os resultados indicam que o mercúrio se concentra preferencialmente nos rins e fígado e não fica disponível no sangue.

Palavras – Chaves: amostra biológica; ICP-MS; mercúrio; elemento traço

ABSTRACT

Mercury needs to be constantly monitoring due to of its toxic characteristics in concentrations at trace levels, leading to various disorders in the kidney, respiratory tract and in the central nervous system and diseases such as Alzheimer and Parkinson. The present study describes the mercury biodistribution in rat blood and organs (heart, brain, kidney, liver and testicle) after chronic administration of mercury chloride (HgCl_2). The animals where divided into three experimental groups: 6 control (CT) treated with NaCl; 7 treated with $2.172 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of HgCl_2 (G1) and 7 treated with $21.72 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of HgCl_2 (G2). After 30 days, the rats were killed, and blood and organs were collected. For the microwave assisted decomposition, about 0.1 g of sample was weighed into a Teflon tube, to which were added: 1 mL 30% v/v H_2O_2 ; 6 mL of ultra-pure H_2O and 1 mL of concentrated HNO_3 . For determination of mercury in the blood, 200 μL of blood was added in a 15 mL polypropylene tube and diluted with 0.005% w/ v Triton-X in 0.5% v/v 10 mL nitric acid (dilution was 1 + 49). The mercury was determined by inductively couples plasma mass spectrometry (ICP-MS), obtaining limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 6.0 ng.L^{-1} and $10.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively. Regarding the organs, for group G1, the kidney Hg concentration was $302.0 \pm 45.1 \mu\text{g.kg}^{-1}$, the remaining ones were below LOD. For the G2 group heart, brain and testicles being the organs with the lowest concentrations of mercury: 15.6 ± 4.6 ; 13.9 ± 2.0 and $15.8 \pm 2.4 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively. The liver had a mercury concentration of $25.5 \pm 7.7 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and the kidney was the target organ, whose concentration was $2818 \pm 1586 \mu\text{g.kg}^{-1}$. The concentration of mercury found in blood in groups G1 and G2 were respectively: $3.8 \pm 0.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $4.3 \pm 0.5 \mu\text{g.kg}^{-1}$. The results indicate that mercury is preferentially concentrated in the kidneys and liver and is not available in the blood.

Key words: biological sample; ICP-MS; Mercury; trace element

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Mercúrio	1
1.2	Vias de exposição	2
1.3	Toxicidade do mercúrio.....	4
1.3.1.	Toxicidade do mercúrio no sistema cardiovascular Erro! Indicador não definido.7	7
1.3.2.	Toxicidade do mercúrio sistema servoso central.....	8
1.3.2	Toxicidade do mercúrio no sistema renal.....	8
2.	Objetivos	9
2.1	Objetivo geral	9
2.2	Objetivos específicos.....	9
3.	Procedimento experimental	10
3.1	Materiais e Reagentes.....	10
3.2	Amostras – tecidos e órgãos de ratos Wistar.....	10
3.3	Modelos de Exposição.....	11
3.4	Coleta de amostras	12
3.5	Pré-tratamento das Amostras	13
3.6	Análise das amostras.....	15
3.7	Análise estatística dos resultados.....	15
4.	Resultados e discussão.....	16
4.1	Características de Desempenho do Procedimento Analítico.....	16
4.2	Efeito da exposição do mercúrio sobre o ganho de peso dos animais e efeito do peso úmido e seco dos órgãos.....	19
4.3	Dosagem de mercúrio total no sangue.....	20
4.4	Distribuição do mercúrio em diferentes órgãos	21
5.	Conclusão.....	26
6.	Referências Bibliográficas	27

1. Introdução

1.1. Mercúrio

O mercúrio à temperatura ambiente e pressão, encontra-se como um líquido branco perolado, ele é um metal pesado de alta volatilidade no meio ambiente. É encontrado na natureza, pois pode ser encontrado no fundo dos rios, lagos e mares (HADDAD, 2015). Ele é liberado e distribuído ao meio ambiente através de fontes naturais, como por exemplo, atividades vulcânicas, processo de erosão e desgastes da crosta terrestre e também através de processos antropogênicos como indústria de cloro-soda, produção de aparelhos elétricos, instrumentos científicos, lâmpadas fluorescentes, catalisadores, odontologia, indústria farmacêutica e pilhas (BRANCO, SILVA, 2006; MARTINEZ-FINLEY, ASCHNER, 2014).

O mercúrio pode apresentar-se na forma de inorgânica e/ou orgânica, sendo que na forma inorgânica, três diferentes espécies de oxidação podem ser encontradas: o mercúrio elementar (Hg^0), o íon mercurioso (Hg_2^{2+}) e o íon mercúrico (Hg^{2+}) sendo que cada espécie difere em relação aos níveis de toxicidade e propriedade físico-química. Essas diferentes formas do mercúrio, podem ligar a outros elementos como por exemplo, enxofre, cloro e oxigênio, originando compostos de mercúrio inorgânico, como sais de mercúrio. A toxicidade do mercúrio inorgânico está relacionada com o estado de oxidação e a com a solubilidade, sendo que as espécies Hg^{2+} são mais tóxicas do que os íons Hg_2^{2+} . Os compostos de mercúrio inorgânicos como os cloretos de mercúrio (HgCl_2 e Hg_2Cl_2), o acetato de mercúrio (II) e o sulfureto de mercúrio (II) são os mais usuais em pesquisas de toxicologia (MARTINS, 2007).

Já na forma orgânica, o mercúrio pode ligar-se covalentemente a um átomo de carbono dando origem a compostos de metilmercúrio e dimetilmercúrio, sendo os mais comuns, sabe-se que as espécies orgânicas são mais tóxicas do que as espécies inorgânicas devido a sua estabilidade e por estes compostos serem absorvíveis no organismo humano, pois são lipossolúveis (AZEVEDO, 2003; MICARONI, BUENO, JARDIM, 2000). O metilmercúrio é a forma mais predominante no meio ambiente e é a forma mais tóxica do mercúrio (MARTINS, 2007).

As espécies de mercúrio, como o metilmercúrio, dimetilmercúrio, o mercúrio elementar e os compostos de Hg^{2+} passam por processos químicos, biológicos e físico-químicos nos sistemas atmosféricos, terrestres e aquáticos. No sistema atmosférico, o mercúrio elementar permanece por longos períodos, podendo ser transportado e atingindo outros lugares. No sistema aquático pode acontecer trocas de espécies inorgânicas para as formas metiladas, fazendo com que espécie orgânica do mercúrio entre na cadeia alimentar através da rápida difusão, atingindo concentrações elevadas em tecidos de peixes causando a bioacumulação e a biomagnificação ao longo dos níveis tróficos. A figura 1 mostra a relação do tempo com a bioacumulação e a biomagnificação no ambiente marinho (ROCHA, 2009). A reação de metilação e desmetilação ocorrem em todos os compartimentos ambientais, porém a espécie do mercúrio em cada ecossistema atinge seu próprio estado de equilíbrio (MICARONI, BUENO, JARDIM, 2000).

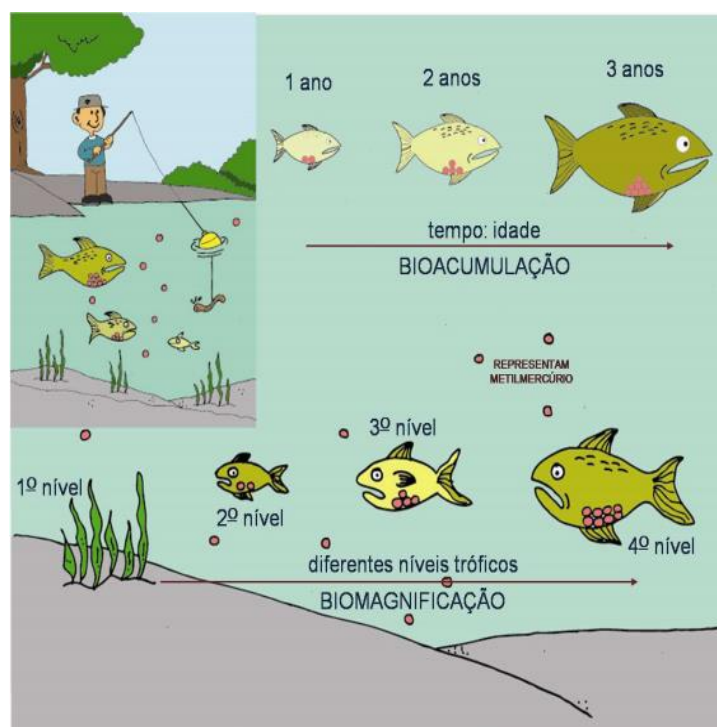


Figura 1. Representação da bioacumulação e biomagnificação do metilmercúrio. Fonte: ROCHA, 2009.

1.2. Vias de exposição

A forma do mercúrio, a via de exposição e a duração desta exposição indicam a extensão dos efeitos adversos causados pelo mercúrio. Estudos mostram que

independente da via de exposição, o mercúrio causa danos ao sistema cardiovascular, ao sistema gastrointestinal, ao sistema neurológico, aos rins e ao fígado (BRIDGES, ZALUPES, 2005).

Os seres humanos estão expostos ao mercúrio por vários tipos de exposições, como por exemplo, ocupacionais e ambientais. Esta exposição pode ser por meio de inalação, absorção ou ingestão. (COCKER, JONES, BOS, 2014).

A exposição ao mercúrio pode ocorrer através da inalação no processo de mineração de ouro (AGRAWAL, FLORA, BHATNAGAR, *et al.* 2014).

O uso de amálgamas dentárias e a alimentação são exemplos de exposição por ingestão (BRIDGES, ZALUPES, 2005). O descarte de fluorescentes e lâmpadas de descarga (mista, vapor de mercúrio, vapor de sódio e vapor metálico), pilhas e baterias pode ser considerado outra via de exposição ao mercúrio.

Sabe-se que a maioria das vezes o descarte é feito de maneira errônea e o mercúrio presente pode ser lixiviado e contaminar solo, lençol freático, fauna e flora (KEMERICH, MENDES, VORPAGEL, *et al.* 2012).

Peixes contaminados por exemplo podem ser vias de exposição ao mercúrio, onde o seu consumo pode gerar efeito direto ao organismo humano, podendo reduzir o efeito protetor do ômega-3 contra riscos cardiovasculares (PEÇANHA, 2008).

Para um melhor entendimento sobre as vias e fontes de exposição ao mercúrio, é de extrema importância o monitoramento biológico para a associação de alguns parâmetros físico-químicos e as alterações do estado de saúde do indivíduo e no interesse nas atividades de prevenção, com o principal objetivo de limitar as patologias que estão correlacionadas ao ambiente (PIVETTA, MACHADO, ARAÚJO, *et al.* 2001).

O monitoramento consiste no ato de controlar e observar qualquer matriz que é entendida como contínua de uma variável no tempo, sendo uma prática preventiva desenvolvida para evidenciar ou medir um risco, visando melhor condição de vida para o ser humano. No monitoramento, a quantificação das substâncias químicas, em fluidos, secreções, excreções e tecidos é avaliada e estudada (PIVETTA, MACHADO, ARAÚJO, *et al.* 2001). O monitoramento acaba sendo uma medida periódica de um marcador de exposição (MUTTI, 1999).

O monitoramento em pesquisa com animais é muito utilizado e pode ser

realizado de diversas formas como, a avaliação pela exposição respiratória, pela injeção por via cutânea, intravenosa e intramuscular. A exposição pode ser realizada de forma aguda que se refere a altos níveis de exposição em curto espaço de tempo e/ou diretamente pelo trato intestinal. Já a exposição crônica resulta no efeito tóxico após a exposição prolongada a doses cumulativas do agente tóxico, num período prolongado (PIVETTA, MACHADO, ARAÚJO, *et al.* 2001).

1.3. Toxicologia do mercúrio

O mercúrio tem sido associado a vários distúrbios biológicos, como problemas renais, de asma, no sistema nervoso central e nas doenças como o Alzheimer e Parkinson (AGRAWAL, FLORA, BHATNAGAR, *et al.* 2014). Os principais sintomas, são: tremor, vertigem, fraqueza, distúrbios visuais, dor de cabeça, depressão, entorpecimento, tosse, inflamações gastrointestinais, vômitos e quedas de cabelo (MICARONI, BUENO, JARDIM, 2000). Visando estabelecer um entendimento sobre a toxicidade do mercúrio, vários estudos vêm sendo realizados.

YONAGA *et al.* (1985) pesquisou sobre os efeitos do HgCl_2 em ratos e foi relatado que ratos contaminados com doses de 2, 4 e 8 mg. Kg^{-1} de HgCl_2 por 6 dias apresentaram inibição do crescimento longitudinal das tíbias.

ZAVARIZ e GLINA (1993) realizaram um estudo com trabalhadores de uma indústria de lâmpadas elétricas localizada em São Paulo, com o intuito de verificar a intoxicação por mercúrio metálico. Para este trabalho 91 operários foram investigados, sendo que 84,62% (77 pessoas) demonstraram quadro de intoxicação crônica.

No ano de 1995, houve uma possível intoxicação cutânea por mercúrio através de um creme cujo nome é Belleza- Manning, sendo que um dos ingredientes era o cloreto de mercúrio, com isso o pesquisador WELDON (2000) e colaboradores realizaram uma pesquisa em voluntários em uma cidade no México. Cerca de 317 mulheres que faziam o uso do creme se inscreveram voluntariamente para análises de urina. O resultado foi que em 203 mulheres, a concentração média de mercúrio encontrada foi de $146,7 \mu\text{g.L}^{-1}$, devido a meia – vida do mercúrio inorgânico em seres humano (cerca de 40 dias), novas análises em urinas foram

coletadas nas mulheres, após 120 dias de interrupção do uso do creme, o resultado foi quem em 126 mulheres apresentaram concentrações superiores a $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de mercúrio na urina.

TRIUNFANTE e colaboradores (2009) descreveram em suas pesquisas sobre uma suspeita de intoxicação por mercúrio inorgânico em um farmacêutico, que foi internado no hospital, admitindo ter ingerido 50 g de cloreto de mercúrio. Após um dia de internação, foi realizado um exame de sangue e o nível encontrado de mercúrio foi de $6750 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 42 dias, o paciente faleceu com falência múltipla dos órgãos. Amostras de fígado, pulmão, cérebro e sangue da vítima foram coletadas para análise toxicológica, sendo encontrados valores de $0,33 \text{ ng.g}^{-1}$ no cérebro, $49,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ no fígado, $77,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ no rim e $3,27 \mu\text{g.g}^{-1}$ no pulmão. Esses resultados confirmaram a intoxicação por ingestão de mercúrio.

DIAS *et al.* (2016) realizaram uma investigação forense em uma mulher de 53 anos de idade, professora de química, que foi internada no hospital com suspeita de intoxicação crônica por ingestão de mercúrio, após ter ingerido intencionalmente óxido de mercúrio em uma quantidade não relatada pela paciente. Durante o tratamento da mulher, o hospital solicitou em dois diferentes dias análises de mercúrio no sangue e na urina. O primeiro exame, realizado no terceiro dia de internação, demonstrou níveis altos de mercúrio na urina (70000 g.L^{-1}) e no sangue ($6800 \mu\text{g.L}^{-1}$). O mesmo exame foi repetido no décimo segundo dia e relevou concentrações de $4375 \mu\text{g.L}^{-1}$ na urina e $3500 \mu\text{g.L}^{-1}$ no sangue. No décimo quinto dia a mulher veio a óbito com insuficiência renal aguda e síndrome da angústia respiratória aguda. Exames toxicológicos foram realizados e o mercúrio foi quantificado nas amostras de bÍlis, baço, fígado, pulmão, rim e sangue. Os resultados mostraram a presença de mercúrio no baço ($18,5 \mu\text{g.g}^{-1}$), bÍlis ($61,4 \mu\text{g.g}^{-1}$), cérebro ($3,43 \mu\text{g.g}^{-1}$), fígado ($217 \mu\text{g.g}^{-1}$), pulmão ($22,9 \mu\text{g.g}^{-1}$), rim ($77,3 \mu\text{g.g}^{-1}$) e sangue ($2,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi concluído que a paciente faleceu devido à intoxicação aguda por ingestão de mercúrio inorgânico.

Quando o organismo absorve o mercúrio, o sistema nervoso central e os rins são os primeiros locais a serem depositados e a eliminação geralmente é feita através da urina e fezes (PEÇANHA, 2008).

O mercúrio possui alta afinidade pelos grupos sulfídrico, ou seja, todo o mercúrio inorgânico encontrado no sangue está ligado às proteínas dos organismos (glutathiona e cisteína) (AGRAWAL, FLORA, BHATNAGAR, *et al.*

2014).

A ligação -SH com o mercúrio se dá de forma espontânea sob condições fisiológicas, e as constantes de formação da glutathiona com o metilmercúrio são elevadas. Essa ligação leva ao rompimento de membranas celulares e à inibição de enzimas. Este agrupamento afeta o DNA por ação direta sobre os microtúbulos (estruturas cilíndricas constituídas de inúmeras moléculas de uma proteína), causa danos nas estruturas das proteínas e bloqueia o canal de Ca^{2+} em neurônios ganglionares (PEÇANHA, 2008).

Como já foi citado ao longo do texto, o mercúrio causa danos a vários órgãos e tecidos. O metilmercúrio começa a ser absorvido no sistema gastrointestinal, entra na corrente sanguínea e em cerca de 30 horas atinge todos os tecidos e órgãos. Aproximadamente 10% do metilmercúrio acumula no cérebro e 5% permanece na corrente sanguínea. Estudos mostram que o cabelo e as unhas servem como indicadores de exposição de mercúrio a longo prazo (VIRTANEN, RISSANEN, VOUTILAINEN, TUOMAINEN, *et al.* 2007).

Contaminações por doses pequenas também pode causar danos, tanto em recém-nascidos quanto em pessoas adultas, sendo maiores em crianças do que em adultos. Vários estudos foram feitos com crianças e foram constatados efeitos sutis negativos sobre a função cerebral, tais como o domínio da linguagem, memória e sistema motor. Para melhor entendimento dos danos devido à contaminação em doses baixas de mercúrio, a tabela 1 mostra alguns efeitos do mercúrio em diferentes órgãos (ZAHIR, RIZWI, HAQ, *et al.* 2005).

Tabela 1. Efeitos causados pelo mercúrio a diferentes sistemas do corpo humano.

Sistema Nervoso	Danos
Adultos	Perda de memória, demência (incluindo Alzheimer), déficit de atenção, comprometimento da audição e visão, distúrbios sensoriais e aumento da fadiga.
Crianças	Déficit de linguagem, memória e atenção.
Sistema Motor	Danos

Adultos	O rompimento da função motora fina, diminuição da força muscular, cansaço excessivo.
Crianças	Compromete o desenvolvimento do andar
Sistema Renal	Aumento da creatinina plasmática (indica função renal alterada)
Sistema Cardiovascular	Altera a homeostase cardiovascular (Homeostase é a condição de relativa estabilidade da qual o organismo necessita para realizar suas funções adequadamente para o equilíbrio do corpo).
Sistema Imune	Diminui a imunidade global do organismo
Sistema Reprodutivo	Diminui a taxa de fertilidade de ambos sexo e causa má formação em fetos.

*Adaptado de ZAHIR, RIZWI, HAQ, *et al.* 2005

1.3.1 Toxicidade do mercúrio no sistema cardiovascular

Vários estudos sobre a relação da contaminação do mercúrio com o infarto agudo do miocárdio, mortalidade por doença arterial coronariana e doença cardiovascular são reportados na literatura. Esses estudos foram realizados através do coorte epidemiológico (tipo de estudo que relaciona a semelhança existente entre a presença dos fatores de riscos ou características e o desenvolvimento de enfermidades em grupos) (SALONEN, SEPPANEN, LAKKA, *et al.* 2000).

Um exemplo dos efeitos causados pelo mercúrio, foi o estudo realizado por PEÇANHA, *et al.* (2008), nos quais foram administradas agudamente concentrações de 5 nmol L⁻¹ e 50 nmol L⁻¹, demonstraram danos na inibição da atividade da ATPase miosínica nas tiras de ventrículo dos ratos, sugerindo um forte efeito tóxico. Os estudos mostraram que esse efeito da inibição depende da presença do grupamento –SH na molécula de miosina, tornando assim possível a união com o mercúrio (PEÇANHA, 2008; MOREIRA, OLIVEIRA, BONAN, *et al.* 2003).

Em concentrações mais elevadas de HgCl₂ em ratos, como por exemplo, 5 mg.Kg⁻¹, ocorre uma redução na pressão arterial diastólica (valor conhecido como pressão arterial mínima) e sistólica (valor da pressão arterial máxima) e houve um aumento na resistência vascular do pulmão. Já valores baixos, como 680 ng.Kg⁻¹

¹, ocasionaram um aumento na pressão arterial diastólica e sistólica e um aumento nos batimentos cardíacos dos ratos (PEÇANHA, 2008).

1.3.2 Toxicidade do mercúrio no sistema nervoso central

Para avaliação dos danos causados pela contaminação por mercúrio no sistema nervoso central, foi realizado um estudo com macacos. Eles foram expostos ao metilmercúrio na concentração de $50 \mu\text{g.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ durante 6,5 a 7 anos de idade. Quando os macacos completaram 13 anos, foram observados lentidão e déficits motores (DAY, REED, NEWLAND, 2005).

Estudos com hamsters foram realizados para verificar os efeitos da exposição do mercúrio em células embrionárias. O resultado demonstrou falha no processo de reparação do DNA e alterações no padrão normal da distribuição cromossômica durante a divisão celular (CRESPO-LÓPEZ, SÁ, HERCULANO, *et al.* 2007).

Quando um cérebro adulto é envenenado com mercúrio ocorre lesões nas áreas anatômicas localizadas no córtex visual e perda neuronal da camada de grânulos do cerebelo (CRESPO-LÓPEZ, SÁ, HERCULANO, *et al.* 2007).

1.3.3 Toxicidade do mercúrio no sistema renal

O sistema renal é o órgão alvo para o acúmulo de Hg^{2+} , a acumulação ocorre de maneira rápida, pois nos rins existe os segmentos de túbulo proximal que possuem os néfrons onde o mercúrio se concentra (BRIDGES, 2005).

O rim possui grande capacidade de extrair substâncias do organismo, logo ele pode ser considerado como um indicador de toxicidade do mercúrio. Uma das principais alterações que ocorre nos rins após exposição ao mercúrio é a perda da função glomerular (PEÇANHA, 2008). Estudos realizados com animais, através da ingestão de mercúrio inorgânico, mostraram que causam alterações no sistema renal tais como, necrose tubular, degeneração de células glomerulares e perda da função renal (PEÇANHA 2008).

Pesquisadores realizaram testes em macacos, expondo-os a amálgama dental, e isto acarretou um depósito de mercúrio nos túbulos proximais renais (PEÇANHA, 2008).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar a distribuição do mercúrio em ratos submetidos à exposição crônica a diferentes doses.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um procedimento analítico exato e preciso que permita a determinação de mercúrio em amostras de órgãos e sangue de ratos utilizando a técnica ICP-MS;
- Avaliar os efeitos da exposição do mercúrio sobre o ganho de peso dos animais;
- Definir os principais alvos teciduais de deposição do metal ao final da exposição.

3 Procedimento experimental

3.1 Materiais e Reagentes

Todos os materiais usados neste estudo foram descontaminados utilizando Extran MA 02 Neutro 2% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido nítrico a 20 % v/v. Após retirar do ácido, os materiais foram lavados com água purificada com resistividade de 18,2 M Ω (PURELAB Ultra, ELGA, UK), secos a temperatura ambiente e armazenados em locais isento de qualquer tipo de contaminação. Os reagentes utilizados para os tratamentos dos ratos foram: NaCl P.A (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e HgCl₂ (Sigma, EUA).

Para o preparo das amostras dos órgãos dos ratos foram utilizados H₂O₂ 30% v/v P.A (Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil), HNO₃ 65% m/m P.A (Merck Millipore, EUA), Triton x-100 (Nuclear, São Paulo, Brasil). O ácido nítrico foi purificado por destilação utilizando o Distillacid BSB939 IV (Berghof, Alemanha). Soluções monoelementares (SCP Science, Canadá) 10 mg.L⁻¹ de Hg, 1000 mg.L⁻¹ de Au, 10 mg.L⁻¹ de Rh e 10 mg.L⁻¹ de Ir foram utilizadas. Foi utilizado papel filtro quantitativo faixa branca C40 \varnothing 125 mm (Unifil, Alemanha). O material de referência DORM 4 (fish protein, NRC, Canadá) foi utilizado para a avaliação da exatidão do procedimento analítico.

Para a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, foi utilizado o forno Multiwave GO (Anton Paar, Áustria). Balança analítica ED224S com precisão de 0,0001g (Sartorius, Alemanha) foi usada para pesagem das amostras, e o espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado Nexlon 300D (Perkin Elmer, Estados Unidos) foi utilizado para a determinação de mercúrio. Foi utilizado para análise das amostras Argônio premier com pureza 99,9992% (Air Products Brasil Ltda, São Paulo) foi utilizado como o gás de plasma, auxiliar e nebulização.

3.2 Amostras – tecidos e órgãos de ratos Wistar

Para o estudo deste trabalho foram utilizados 22 ratos Wistar como mostrado na figura 2:



Figura 2 – Rato Wistar. Fonte: MACHADO, Camila Maria Longo *et al.* ROE – Wistar, 2012.

Os ratos escolhidos tinham aproximadamente dois meses de idade e pesavam cerca de 120-180 gramas. Eles foram fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, onde foram mantidos em gaiolas, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas, sob condições de controle de temperatura, com livre acesso à água e ração. Dois animais foram utilizados para treinamento dos procedimentos de injeção e coleta das amostras sem contaminação, enquanto 20 animais foram utilizados para os protocolos experimentais efetivos.

Os procedimentos dos experimentos foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos publicada pelo CONCEA (2013). Todos os procedimentos também foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Utilização de Animais na Universidade Federal do Espírito Santo, cujo número do protocolo é 061/2014 em conformidade com suas resoluções, previamente à realização dos mesmos.

3.3 Modelos de Exposição

Os Wistar foram distribuídos de forma aleatória em três grupos experimentais, sendo 6 ratos controles (CT); 7 ratos tratados com $2,172 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de cloreto de mercúrio (G1) e 7 ratos tratados com $21,72 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de cloreto de mercúrio (G2).

Os ratos que pertencem ao grupo controle receberam injeções intramusculares (*i.m*) de solução salina de cloreto de sódio, NaCl – 0,9 % m/v por 30 dias. Os ratos tratados com mercúrio receberam pelo mesmo período injeções intramusculares de HgCl_2 , sendo a primeira dose de $2,172 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e doses subsequentes de $0,029 \mu\text{g/kg/dia}$ para G1 e $21,72 \mu\text{g.kg}^{-1}$ como primeira dose e doses subsequentes de $0,29 \mu\text{g/kg/dia}$ G2.

As quantidades das doses injetadas foram determinadas através do cálculo teórico. Este cálculo se baseia em:

Dose= volume de distribuição x concentração plasmática.

Para este cálculo considera-se que o mercúrio se distribuiria no organismo e o volume de distribuição equivale à quantidade total de água corporal – 80% do volume de sangue total. O cálculo das concentrações das doses subsequentes foi baseado na meia-vida de 37 dias do HgCl_2 (AZEVEDO, 2003).

Foi calculada a eliminação diária e ajustaram-se as doses correspondentes a esta eliminação a fim de manter $2,172 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $21,72 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de concentração total.

3.4 Coleta de amostras

Após o tratamento de 30 dias, os ratos foram anestesiados com uretana (etil carbamato), $1,2 \text{ g.kg}^{-1}$ intraperitoneal (*i.p.*) como é mostrado na figura 3.



Figura 3 - Ilustração do local onde é injetada a uretana.

Após alguns minutos para que ocorra o efeito da anestesia, a manobra cirúrgica denominada laparotomia foi realizada, ou seja, uma incisão longitudinal entre o apêndice xifoide e a sínfise púbica através da parede abdominal para acessar a cavidade abdominal (Figura 4).

Depois da abertura da parede abdominal do rato, amostras sanguíneas de aproximadamente 4 mL foram coletadas da artéria aorta, por meio de seringa acoplada a agulhas estéreis, e transferidas para tubos *ependorf* contendo 200

μL de Heparina diluída, utilizada para evitar a coagulação do sangue. Os tubos foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das medidas.

Em seguida, foram feitas duas incisões transcostais (através das costelas, bilateralmente (Figura 4), com posterior rebatimento do gradil costal e exposição da cavidade torácica, para coleta do coração. Finalmente, após eutanásia por exsanguinação (ainda sob efeito da anestesia), os fêmures foram cuidadosamente dissecados, assim como a calota craniana foi aberta para coleta do encéfalo (cérebro). Foram coletadas também amostras de rins, testículos e fígado.

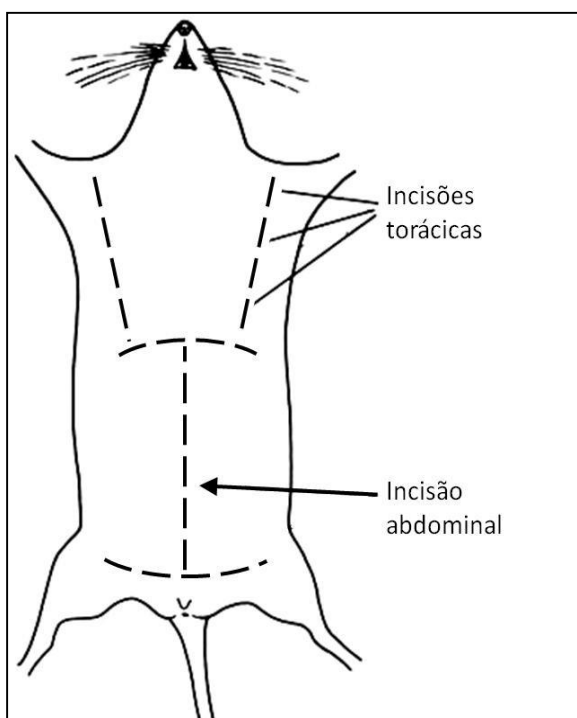


Figura 4 - Ilustração dos locais das incisões para acesso aos órgãos coletados.

As amostras foram lavadas com água destilada, para remoção do excesso de sangue e armazenadas em embalagens plásticas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os procedimentos de exposição e coleta das amostras foram realizados no laboratório de eletromecânica cardíaca e reatividade vascular. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Espectrometria Atômica do LabPetro/UFES para a realização do processo de secagem, digestão e análises.

3.5 Pré-tratamento das Amostras

As amostras foram secas por cerca de 72 horas a aproximadamente $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, em seguida as mesmas foram maceradas em gral e pistilo de vidro, transferidas

para um recipiente plástico e armazenadas no congelador até o momento da decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas.

Para o processo de decomposição assistida por radiação micro-ondas dos órgãos, de acordo com BARBOSA (2013), pesou-se cerca de 0,1 g de amostra em um tubo de teflon, ao qual foram adicionadas as seguintes soluções: 1 mL de H₂O₂ 30%v/v; 6 mL de H₂O ultrapura e 1 mL de HNO₃ concentrado. O programa de aquecimento utilizado teve uma rampa de aquecimento até 130 ± 5 °C em 10 min e permanência por 10 min. Em seguida, outra rampa de aquecimento at 180 ± 5 °C em 10 min e permanência por 10 min e, finalmente, uma rampa de resfriamento de 15 min. A potência utilizada foi de 800 W. Após a decomposição, as amostras foram filtradas e avolumadas para 15 mL em tubo de polipropileno. Antes da análise, 3 mL do digerido foram transferidos para outro tubo de polipropileno, no qual foram acrescentados Rh (10 ug.L⁻¹) e Au (1,0 mg.L⁻¹) e realizada uma diluição para 10,0 mL, Ródio foi usado como padrão interno e Au para evitar efeito de memória. O efeito de memória é decorrente quando se trabalha com mercúrio e a não correção desse efeito pode levar a problemas na calibração gráfica, longos tempo de limpeza, diminuição da sensibilidade e sinais dependentes da matriz (HARRINGTON, MERSON, D'SILVA, 2004). O mesmo procedimento foi realizado com o material de referência DORM 4 para verificação da exatidão do método.

O branco de preparo foi realizado nas mesmas condições que as amostras. As curvas analíticas foram construídas a partir de solução padrão de Hg na faixa de trabalho de 0, 1,0; 3,0; 5,0; e 7,0 µg.L⁻¹, contendo Rh e Au nas mesmas concentrações das amostras. Foram realizadas fortificações das amostras com 2,0 ug.L⁻¹ de mercúrio para avaliação do percentual de recuperação.

O método utilizado para a determinação de mercúrio total no sangue dos ratos foi de acordo com o trabalho de Palmer *et al.* (2006), ou seja, 200 µL de sangue foram adicionados em tubos de polipropileno de 15 mL sendo diluídos com Triton – X 0,005 % m/v em ácido nítrico 0,5 % v/v a 10 mL (diluição foi de 1+49). As amostras foram agitadas no vortex vigorosamente por cerca de 1 min e posteriormente centrifugadas para evitar qualquer tipo de entupimento no processo de introdução de amostra no ICP-MS. Foi utilizado Rh 10 µg.L⁻¹ e Au 1,0 mg.L⁻¹.

O branco de calibração foi preparado igual ao sangue. Para a curva analítica

foi utilizado um sangue de rato wistar sem qualquer tipo de exposição na faixa de trabalho de 0; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Fortificações foram realizadas na concentração de 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

3.6 Análise das amostras

As amostras foram analisadas no espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado, ICP-MS. Os parâmetros do equipamento estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Condição de operação do ICP-MS

Condições operacionais	
Câmara de nebulização	Ciclônica de vidro com anteparo
Nebulizador	Concêntrico Meinhard, tipo C
Cones	Níquel 1,1 mm i.d
Tocha	Tocha de Quartzo EasyGlide™
Potência de Radiofrequência	1550 W
Introdução de amostra	Bomba peristáltica
Fluxo de gás auxiliar	1,20 L.min ⁻¹
Fluxo de gás de plasma	16,00 L.min ⁻¹
Fluxo de gás nebulizador	1,04 L.min ⁻¹
Replicatas	3
Padrão interno	¹⁰³ Rh
Isótopo medido	²⁰² Hg
Taxa de aspiração	1,3 mL.min ⁻¹

3.7 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* não pareado e análise de variância (ANOVA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$. Foi realizado também o teste Q para avaliação de valores suspeitos.

4 Resultados e discussão

4.1 Características de Desempenho do Procedimento Analítico

Inicialmente, foi verificado o tempo de secagem das amostras, 24 h e 72 h. Para esse estudo foi utilizado o material de referência certificado DORM 4 (proteína de peixe) o qual estabelece um valor de $0,412 \pm 0,036 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Hg expressos numa base de massa seca. Concomitantemente ao tempo de secagem, foi avaliada a eficiência de Rh e Ir como padrão interno, ou seja, qual deles mostra uma melhor resposta garantindo a qualidade dos resultados das análises. Os resultados estão apresentados na tabela 3, na qual consta a informação dos valores de concentrações obtidos bem como a porcentagem em relação ao valor certificado.

Mediante os resultados, foi verificado que o tempo de 72 h para secagem e o padrão interno Rh são as condições mais satisfatórias, na qual houve uma melhor recuperação (103,5 %) e também se obteve um valor de peso de massa constante. Estes resultados permitem estabelecer que não deve estar havendo perda de mercúrio por volatilização durante a secagem das amostras, assim como durante o processo de aquecimento na digestão, e através destes resultados, o Rh demonstrou-se ser um melhor padrão interno do que Ir corrigindo efeito de matriz. Logo, as condições escolhidas para as análises das amostras de órgãos dos ratos foram a utilização do padrão interno Rh e a secagem em 72 h.

Tabela 3. Concentração de Hg no material de referência DORM 4 utilizando diferentes temperaturas de secagem e diferentes padrões interno, cujo valor de referência é igual a $0,412 \pm 0,036 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Hg.

Tempo de secagem do CRM (h)	Concentração mg.Kg^{-1}	Recuperação (%)
	Sem padrão interno	
72	$0,507 \pm 0,056$	123,2
24	$0,554 \pm 0,062$	134,7
	Com padrão interno, Rh	
72	$0,426 \pm 0,043$	103,5
24	$0,455 \pm 0,044$	110,5
	Com padrão interno, Ir	
72	$0,483 \pm 0,049$	117,3

24	0,537± 0,058	127,9
----	--------------	-------

Foram calculadas a linearidade e sensibilidade do procedimento dos órgãos e sangue, cujos valores são apresentados na Tabela 4.

O coeficiente de determinação da curva (R^2) indicou uma excelente linearidade, visto que quanto mais próximo de 1,0 mais linear é a relação entre a concentração do analito e a intensidade do sinal. O limite de detecção, LD, é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e é expresso em termos do desvio-padrão de medidas do branco. Ele pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos (BRITO, JUNIOR, POLESE, *et al.* 2003). Ou seja, LD é a concentração do elemento de interesse que produz um sinal analítico distinguível do ruído, e é calculado através das recomendações da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) como três vezes o desvio padrão de 20 leituras do branco da amostra, dividido pela inclinação da curva analítica.

Já o Limite de Quantificação, LQ, é a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, ou seja, menor concentração determinável. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos (BRITO, JUNIOR, POLESE, *et al.* 2003). O cálculo foi baseado nas recomendações da IUPAC, ou seja, dez vezes o desvio padrão de 20 leituras do branco da amostra, dividido pela inclinação da curva analítica, considerando a massa da amostra e o fator de diluição.

Os valores de LD ($6,0 \text{ ng.L}^{-1}$) e LQ ($10 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) foram obtidos para a solução de análise e para a amostra, respectivamente, considerando a diluição empregada (a massa utilizada foi de aproximadamente 0,1g o volume final foi de 10 mL).

No estudo da quantificação de mercúrio inorgânico em sangue humano utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, realizado por Rodrigues e colaboradores (2010), foi obtido um valor de LD igual a 250 ng.L^{-1} .

Ao fazer uma comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com o resultado reportado na literatura usando a HPLC- ICP-MS, considerada referência para mercúrio, constata-se que o método apresenta uma boa sensibilidade.

Tabela 4. Características de desempenho do método utilizado para determinação de mercúrio em amostras de sangue e órgãos de rato utilizando ICP-MS.

Parâmetros de mérito das amostras de órgãos	Resultados
Equação da regressão linear	$Y = 3268,6 X - 2,7739$
Coefficiente de determinação (R^2)	1,000
Limite de Detecção (LD)	$6,0 \text{ ng.L}^{-1}$
Limite de Quantificação (LQ)	$10,0 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$
Parâmetros de mérito das amostras de sangue	Resultados
Equação da regressão linear	$Y = 5296,3 X - 601,42$
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9907
Limite de Detecção (LD)	$0,319 \text{ ng.L}^{-1}$
Limite de Quantificação (LQ)	$0,5285 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$

O ensaio de adição e recuperação é um método muito utilizado para verificação de processos analíticos. Ele está relacionado com a exatidão e reflete a quantidade de determinado analito recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. Deve-se ressaltar que o processo de fortificação tenta simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem na própria amostra (BRITO JUNIOR; POLESE, *et al.* 2003).

O teste de recuperação foi realizado para alguns órgãos, e encontra-se na tabela 5.

De acordo com o autor Ribani (2004) e colaboradores as recuperações devem estar na faixa de 70 a 120%. Os teores de recuperação apresentados na tabela estão entre 85 e 99 %, indicando que as recuperações foram satisfatórias e que o método de determinação de mercúrio em amostras biológicas não está sujeito à interferências de matriz, indicando que o mesmo tem boa exatidão, como constatado anteriormente, e está adequado ao estudo proposto.

Tabela 5. Percentual de recuperação obtido para determinação de mercúrio em amostras de sangue e órgãos de rato, após fortificação com 1 e 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Órgão	Hg adicionado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Hg obtido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Fígado	2	1,85	92,5
Encéfalo	2	1,75	87,5
Fígado	2	1,70	85,5
Sangue	1	0,99	99,1
Sangue	1	0,99	99,2
Sangue	1	0,99	97,7

4.2 Efeito da exposição do mercúrio sobre o ganho de peso dos animais e efeito do peso úmido e seco dos órgãos.

Os ratos dos grupos CT, G1 e G2 foram pesados semanalmente, no mesmo dia, durante 4 semanas. Os resultados estão representados na tabela 6. Observa-se um aumento no peso dos ratos entre a primeira semana do experimento e a última, o que era esperado, pois eles cresceram e se desenvolveram. No entanto, quando se observa o ganho de peso corpóreo dos ratos do grupo G2, houve uma redução em relação aos ratos dos grupos CT e G1. Foi aplicada análise de variância (ANOVA) para verificar se havia diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 e os resultados indicaram uma diferença significativa entre os grupos. E posteriormente foi realizado o teste t e verificou-se que houve diferença significativa entre os grupos CT e G2. Esse resultado está de acordo com os trabalhos de Peixoto *et al.* 2003; 2007 e Roza *et al.* 2005, que avaliaram o ganho de peso corpóreo em ratos expostos a cloreto de mercúrio, no qual os ratos expostos a mercúrio têm um menor ganho, indicando um dano causado a exposição de mercúrio. É importante chamar atenção que os animais utilizados neste experimento fazem parte de um grupo homogêneo, em relação ao peso, ou seja, os ratos foram pegos de uma mesma ninhada e mesmo dia.

Tabela 6. Média do peso corpóreo (g) dos ratos dos grupos CT, G1 e G2 após a 1ª e 4ª semana de tratamento com HgCl₂.

Grupo	1ª semana	4ª semana
Controle	226,08 ± 32,93	384,42 ± 54,08
G1	279,50 ± 68,55	412,68 ± 39,17
G2	211,08 ± 28,75	338,50 ± 35,01

Em relação ao peso dos órgãos secos e órgãos úmidos não houve diferença significativa entre as médias dos pesos dos grupos CT, G1 e G2 ($p > 0,05$), conforme pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7 Média do peso seco e úmido (g) dos órgãos dos ratos dos grupos CT, G1 e G2.

Órgão úmido

Órgão	CT (g)	G1 (g)	G2 (g)
Rim	1,18 ± 0,19	1,22 ± 0,13	1,26 ± 0,21
Testículo	1,33 ± 0,13	1,39 ± 0,15	1,38 ± 0,12
Coração	1,11 ± 0,21	1,94 ± 0,27	1,11 ± 0,16
Encéfalo	1,47 ± 0,15	1,58 ± 0,15	1,61 ± 0,04
Fígado	14,24 ± 2,19	14,40 ± 1,58	14,21 ± 2,43

Órgão seco			
Órgão	CT (g)	G1 (g)	G2 (g)
Rim	0,32 ± 0,05	0,36 ± 0,080	0,36 ± 0,09
Testículo	0,20 ± 0,03	0,22 ± 0,048	0,22 ± 0,043
Coração	0,26 ± 0,08	0,26 ± 0,033	0,27 ± 0,064
Encéfalo	0,33 ± 0,39	0,38 ± 0,054	0,40 ± 0,036
Fígado	4,28 ± 0,69	4,44 ± 0,57	4,46 ± 1,01

4.3 Dosagem de mercúrio total no sangue

Análises de mercúrio no sangue de alguns ratos expostos à concentração de 10,86 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ também foram realizadas (G intermediário). A tabela 8 apresenta a concentração total de mercúrio encontrado no sangue dos ratos CT, G1, G intermediário e G2.

Foi realizado o teste t e verificou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, porém os resultados foram avaliados de acordo com a dose de tratamento.

À medida que o mercúrio entra na corrente sanguínea, ele liga-se às proteínas do plasma e assim é distribuído para os tecidos, podendo se concentrar em diferentes sítios, tais como: rins, fígado, medula óssea, intestino, cérebro, ossos, entre outros. Avaliando-se as concentrações sanguíneas obtidas no presente estudo, embora apresentassem uma tendência a maior nível do metal no grupo submetido a maior dose de exposição, não há uma clara relação entre esses dois fatores. Neste trabalho, três doses de HgCl_2 foram doses de ataque: 2,172 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 10,86 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ e 21,72 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, seguidas de injeções diárias para cobrir as perdas decorrentes da excreção de mercúrio pela urina e fezes. Entretanto, as

concentrações do mercúrio obtidas no sangue parecem todas semelhantes, variando entre 2,83 a 4,29 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Tabela 8. Resultados das concentrações de mercúrio em amostras de sangue dos ratos, CT G1, G intermediário e G2 no ICP-MS.

Amostra	CT	G1	G intermediário	G2
Sangue	2,99 \pm 0,76	3,76 \pm 0,58	2,83 \pm 0,85	4,29 \pm 0,51

Uma provável explicação para isso seriam os diferentes sítios nos quais o mercúrio poderia se depositar, incluindo sua ligação com proteínas no próprio sangue. Sabe-se que o mercúrio inorgânico é capaz de se ligar a grupamentos tiol (-SH) de proteínas, e conseqüentemente pode inativar enzimas e levar à lesão celular e tecidual, além de interferir em inúmeros processos vitais do organismo (GILMAN, (2007); ASANO (2000)). Considerando ainda que o mercúrio orgânico é lipossolúvel e altamente difusível enquanto o mercúrio inorgânico tem baixa lipossolubilidade e capacidade de adentrar membranas celulares (CLARKSON, VYAS, BALLATORI, 2007), pode-se especular que na medida em que se aumenta o nível de exposição, também ocorre o mesmo com a deposição deste metal nos tecidos, o que dificultaria uma elevação proporcional na corrente sanguínea. Outro fator que pode ser levado em conta é que o mercúrio é depositado nos ossos e pode permanecer por um longo período de tempo, e uma exposição contínua a pequenas quantidades iria potencialmente aumentar este teor nos ossos. De fato, o tecido ósseo possui uma área de superfície mineral extensa podendo adsorver toxinas e metais pesados, minimizando os efeitos dos mesmos sobre os órgãos (LOVERIDGE, (1999); FERNANDEZ, (2006)).

O resultado obtido no presente estudo está de acordo com o trabalho de Wiggers et al 2008, que avaliou a concentração de mercúrio encontrado no sangue de ratos Wistar após os ratos serem expostos com cloreto de mercúrio por 30 dias com dose administrada de 4,344 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. O estudo informou que, após os 30 dias, a concentração de 3,85 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ foi encontrada no sangue.

A concentração encontrada no sangue dos ratos expostos à dose de cloreto de sódio, do grupo CT, está bem próxima das concentrações dos grupos: G1, G intermediário e G2, o que pode sugerir uma possível contaminação advinda de fatores externo na hora da exposição dos ratos do grupo CT, como por exemplo, à temperatura não adequada no biotério e o manejo dos ratos controles perto dos ratos expostos a cloreto de mercúrio.

4.4 Biodistribuição do mercúrio em diferentes órgãos

A figura 5 A e 5 B mostra o comportamento do mercúrio nos órgãos de ratos expostos a cloreto de sódio 0,9% m/v (CT); 2,172 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de HgCl_2 (G1) e 21,72 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de HgCl_2 (G2). Os ratos do grupo controle e G1 apresentaram níveis muito baixos de mercúrio ficando a maioria abaixo do limite de quantificação, LQ ($< 10 \mu\text{g.kg}^{-1}$), com exceção do fígado e rim que apresentaram uma concentração igual a $12,51 \pm 0,64$ e $65,86 \pm 6,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso seco, respectivamente.

No grupo G1, pode-se concluir que o fígado não apresentou níveis confiáveis de mercúrio, pois foram encontradas concentrações maiores do que no fígado do grupo controle. A concentração de mercúrio nos órgãos: testículos, coração e encéfalo ficaram abaixo do limite de quantificação. Em relação ao rim, houve um acúmulo significativo de mercúrio ($302,00 \pm 45,07 \mu\text{g.kg}^{-1}$) quando comparado com o controle ($65,86 \pm 6,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Os outros órgãos do grupo G2, tais como: testículo, fígado, coração e encéfalo apresentaram níveis de mercúrio iguais a $15,85 \pm 2,45$; $25,51 \pm 7,69$; $15,61 \pm 4,64$ e $13,92 \pm 2,03 \mu\text{g.kg}^{-1}$ respectivamente.

O órgão que mais chamou atenção devido ao elevado nível de mercúrio encontrado foi o rim no grupo G2, 2819 ± 1587 ; houve um aumento em relação ao nível encontrado nas amostras de rins do grupo controle e no grupo G1.

Além disso, em todos os órgãos do G2 foram encontrados concentrações de Hg superiores ao LQ e superiores ao CT e G1.

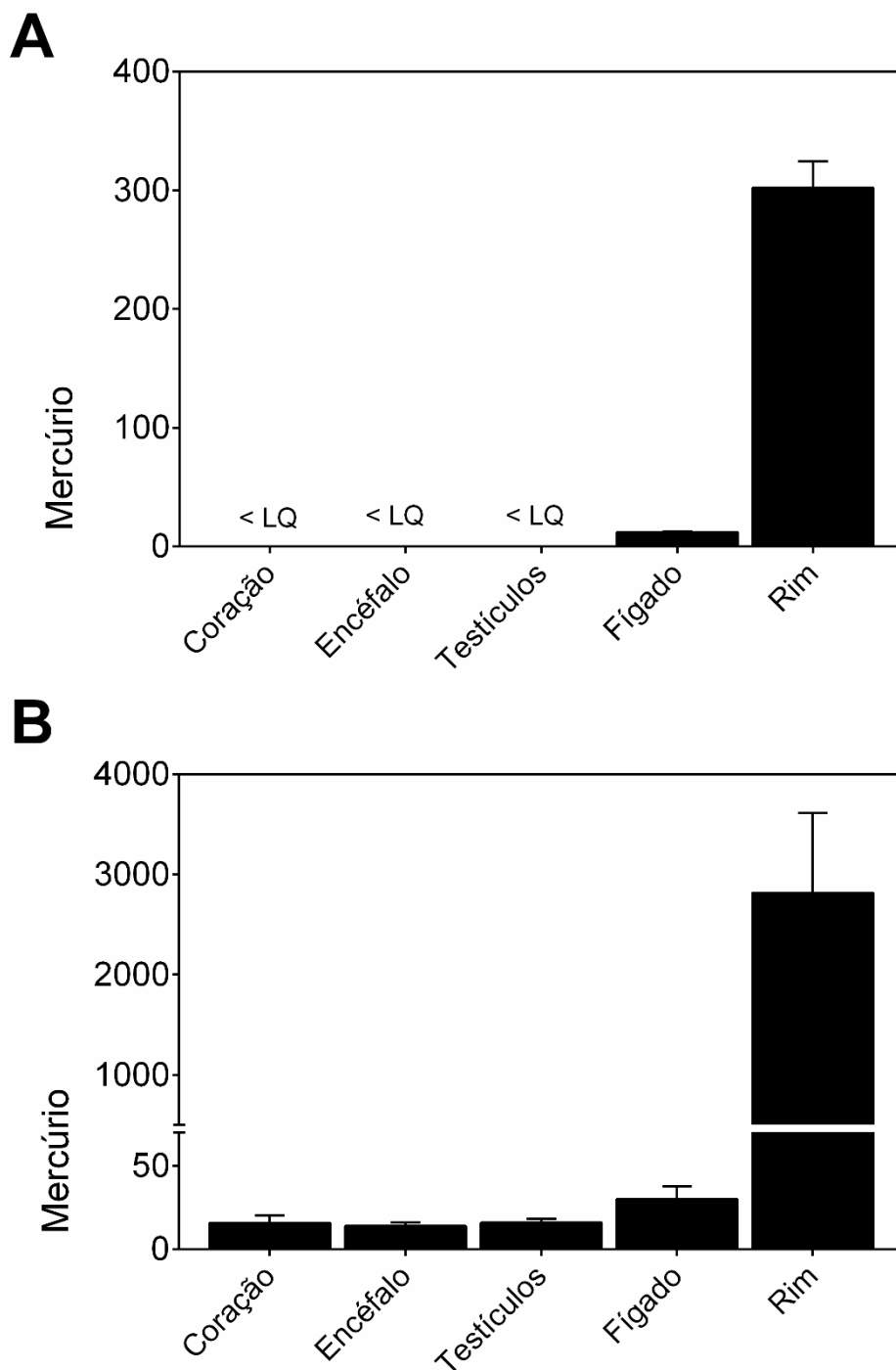


Figura 5 Distribuição de mercúrio, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$, em órgãos de rato após exposição crônica por 30 dias a diferentes doses: (A) G1 ($2,172 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e (B) G2 ($21,71 \mu\text{g.kg}^{-1}$). *A concentração de mercúrio nos rins do G2 está em escala 1:100.

Nosso estudo de biodistribuição de mercúrio demonstrou que o mesmo tem uma tendência de acumular-se nos rins, mesmo na menor dose utilizada, sugerindo ser este um dos primeiros sítios de deposição, provavelmente devido

ao seu alto fluxo de sangue com grande capacidade de filtração. Ao comparar as concentrações obtidas nos órgãos dos ratos G2, o rim obteve uma maior concentração. O acúmulo de mercúrio no rim de acordo com NASCIMENTO *et al.* (2001), é ocasionado devido a esse órgão ser a principal via de excreção e também por ser um órgão onde passa mais fluxo de sangue. Estudos demonstram que o mercúrio inorgânico causa danos ao sistema renal e é responsável pelo desenvolvimento de várias doenças renais (HODGSON, NIEUWENHUIJSEN, ELLIOTT, *et al.* 2007).

A principal alteração que o mercúrio promove no sistema renal é a perda da função glomerular, responsável pela primeira etapa na formação da urina e necrose tubular (insuficiência renal) (CARMIGNANI, *et al.* 1992).

Interessantemente, a concentração de mercúrio observada nos rins extraídos do grupo tratado com a dose de 21,72 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foi 10 vezes maior do que a concentração do grupo tratado com a dose de 2,172 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, o que pode indicar, diferente dos demais sítios estudados, uma linearidade entre o nível de exposição e as concentrações encontradas nas análises.

Os outros órgãos tiveram uma concentração bem menor, isso pode acontecer devido ao fato de possíveis tampões (proteção) que esses órgãos possuem (LOVERIDGE, (1999); FERNANDEZ *et al.* (2006)). Como foi citado anteriormente o osso é um exemplo de uma proteção, outro exemplo seria o baço, pois ele é o maior órgão imune secundário do corpo, responsável pela filtragem do sangue removendo assim microrganismos, substâncias estranhas e células vermelhas gastas ou danificadas do sangue (CESTA, 2006).

Reforçando essa linha de pensamento, no grupo G1 somente o fígado e o rim apresentaram níveis detectáveis de mercúrio, não sendo possível a quantificação de mercúrio nos outros órgãos estudados, ou seja, as concentrações ficaram abaixo do LQ. Entretanto, no grupo G2, o segundo órgão que obteve uma maior quantidade de mercúrio foi o fígado, seguido dos testículos, coração e encéfalo. O fígado apresentou uma elevada concentração provavelmente devido ao fato de que o sal de cloreto de mercúrio é inicialmente absorvido e distribuído entre os glóbulos vermelhos e o plasma, ligando - se aos grupos tiol, em seguida os íons Hg^{2+} se distribuem primeiramente no fígado, onde o mesmo é metabolizado (DIAS, BESSA, GUIMARÃES *et al.* 2016).

Comparando os órgãos estudados do G2, uma menor concentração foi

encontrada no encéfalo no grupo G2. De acordo com DIAS, BESSA, GUIMARÃES *et al.* (2016), o mercúrio inorgânico tem dificuldade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, porém pode ser encontrado no organismo humano alguns derivados orgânicos do mercúrio, alguns estudos apontam a possibilidade de biotransformação do mercúrio inorgânico, ou seja, mesmo com exposição a mercúrio inorgânico, pode haver no organismo metilação do mercúrio e assim, chegar ao cérebro. O fato do fígado ter sido também um órgão alvo do mercúrio se deve à função de metabolização desse órgão.

A presença de mercúrio no coração do grupo G2, reforça a relação com mercúrio e as doenças cardiovasculares. Rissanen (2000) relacionou a presença de mercúrio com episódios de infarto do miocárdio, hipertensão arterial, aterosclerose e doença arterial coronariana.

Não existem muitos estudos sobre os danos que o mercúrio inorgânico causa ao sistema reprodutor, mas estudos realizados em ratos tratados com cloreto de mercúrio relevam que há redução na motilidade (capacidade de locomoção), contagem e viabilidade espermática (BOUJBIHA, HAMDEN, GUERMAZI, BOUSLAMA, *et al.* 2009), e a exposição oral de cloreto de mercúrio em ratos altera a performance reprodutiva (KHAN, ATKINSON, GRAHAM *et al.* 2004). De acordo com o trabalho de Martinez 2013, que realizou exposição crônica a baixas doses de HgCl₂ em ratos machos durante 30 dias, sendo a dose de ataque igual a 4,6 µg.kg⁻¹, foram identificados danos funcionais e estruturais no sistema reprodutor de ratos.

5 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o método de quantificação de mercúrio por ICP-MS apresentou uma boa exatidão e sensibilidade, podendo ser utilizado com eficácia em estudos de avaliação de toxicidade por mercúrio.

A maior exposição ao mercúrio induz a uma perda de massa corpórea dos ratos.

O estudo da biodistribuição de mercúrio demonstrou que o mesmo tem uma tendência de acumular-se nos rins, sendo que a concentração do grupo G2 foi cerca de 10 vezes maior do que a concentração do grupo G1, indicando uma possível linearidade entre as concentrações encontradas e as doses injetadas nos ratos.

O segundo órgão que obteve uma maior quantidade de mercúrio foi o fígado, seguido do testículo, coração e encéfalo.

A quantificação do mercúrio no sangue não seguiu uma relação linear com a dose exposta.

A deposição preferencial de mercúrio nos órgãos justifica os baixos níveis de mercúrio no sangue, independente da dose de exposição.

6 Referências Bibliográficas

AGRAWAL, S; FLORA, G; BHATNAGAR, P; FLORA, S, J, S. Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cell. Mol. Biol*, **60**,13-21, 2014.

ASANO, S; ETO, K; KURISAKI, E; GUNJI, H; HIRAIWA,K; SATO,M; SATO, H; HASUIKE, M; HAGIWARA, N; WAKASA, H. Review Article:Acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Poisoning. Pathol Int.* **50**, 169-174,2000.

AZEVEDO, F. A de. Toxicologia do Mercúrio. São Carlos: RiMa, 2003.

BARBOSA, I. S; Distribuição de elementos essenciais e não essenciais em moluscos bivalves e sedimentos da baía de todos os santos, Bahia, Brasil (Tese de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013, 98 p.

BOUJBIHA, M. A; HAMDEN, K; GUERMAZI, F; BOUSLAMA, A; OMEZZINE, A; KAMMOUN, A; FEKI, A.E. Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: Association with oxidative stress. *Reproductive Toxicology*, **28**, 81–89, 2009.

BRANCO, J. C; SILVA, M, A, M; Mercado de mercúrio no Brasil- ACPO Associação de combate aos poluentes. 1-36, Santos-SP, 2006.

BRIDGES, C. C; ZALUPS, R. K. Molecular and ionic mimicry the transport of toxic metals. *Toxicol appl Pharmacol*, **204**, 274-308, 2005.

BRITO, N. M; JUNIOR, O. P. A; POLESE, L; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*,**13**, 2003.

CARMIGNANI, M; BOSCOLO, P; ARTESE, L; DEL ROSSO, G; PORCELLI, G; Felaco M, VOLPE, A.R; GIULIANO, G. Renal mechanisms in the cardiovascular

effects of chronic exposure to inorganic mercury in rats. *Br J Ind Med*, **49**, 226-32, 1992.

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

CESTA, M.F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *toxico. Pathol.*, **34**, 455-465, 2006.

COCKER, J; JONES, K; BOS, P. M.J. Biological monitoring guidance values for chemical incidents. *Toxicology Letters*, **231**, n. 3, 324-327, 2014.

CRESPO-LÓPEZ, M.E; SÁ, A.L; HERCULANO, A.M; BURBANO, R.R; NASCIMENTO, J.L.M. Methylmercury genotoxicity: A novel effect in human cell lines of the central nervous system. *Environment International*, **3**, 141-146, 2007.

DAY, J.J; REED, M.N; NEWLAND, M.C. Neuromotor deficits and mercury concentrations in rats exposed to methyl mercury and fish oil. *Neurol and Teratol*, **27**, 629-641, 2005.

DIAS, D; BESSA, J; GUIMARÃES, S; SOARES, M. E; BASTOS, M. L; TEIXEIRA, H. M. Inorganic mercury intoxication: A case report. *Forensic Sci. Int.* **259**, e20-e24, 2016.

FERNANDEZ, I; GRACIA, M.A.A; PINGARRÓN, M.D.C; JEREZ, L.B; Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med.Oral Patol. Cir. B.*, **11**, p E47-E51, 2006.

GILMAN Ag, HARDMAN J.G, LIMBIRD L.E. - Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11 ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana Brasil; 2007.

HADDAD, I. Eliminação do uso do mercúrio: uma reflexão para a saúde: Eliminating the use of mercury: a reflection for health. *Revista Acreditação: Compromisso com a qualidade em saúde*, **5**, 151-163, 2015.

HARRINGTON, C.F; MERSON, S.S; D'SILVA, T.M.D. Method to reduce the memory effect of mercury in the analysis of fish tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **505**, 247-254, 2004.

HODGSON, S; NIEUWENHUIJSEN, M. J; ELLIOTT, P; JARUP, L. Kidney disease mortality and environmental exposure to mercury. *Am J Epidemiol*, **165**, 72-7, 2007.

KEMERICH, P. D. C; MENDES, S.A; VORPAGEL, T. H; PIOVESAN, M. Descarte de pilhas e bateria: a percepção do problema no município de Frederico Westphalen. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, **8**, 1680-1688, 2012.

KHAN, A.T; ATKINSON, A; GRAHAM, T.C; THOMPSON, S.J; ALI, S; SHIREEN, K.F. Effects of inorganic mercury on reproductive performance of mice. *Food Chem Toxicol*, **42**, 571-7, 2004.

LOVERIDGE, N. Bone: More than stick. **Journal of Animal Science**, **77**, Suppl. 2/J. DairySci, **82**, Suppl. 2/1999, 1999.

MACHADO, C, M, L . ROE - Wistar. 2012. Disponível em: <http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17&caract=sim>. Acesso em: 16 jul. 2015

MARTINEZ, C.S. Efeito da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) no sistema reprodutor de ratos machos. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Pampa, Uruguaiana-RS, 2013, 111p.

MARTINEZ-FINLEY E. J; ASCHNER, M. Recent Advances in Mercury Research.

Curr Envir Health Rpt, **1**, 163–171, 2014.

MARTINS, P. A. A. T. Doseamento do mercúrio total e de derivados orgânicos de mercúrio em amostras de cadáveres - Estudo de dois casos. Dissertação de Mestrado. Serviço de Toxicologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal, 2007. 85 p.

MICARONI, R. C. C. M; BUENO, M. I. I. M. S; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Quím. Nova*, **23**, 487-495, 2000.

Ministério da ciência, tecnologia e inovação conselho nacional de controle de experimentação animal – CONCEA diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA, 2013.

MOREIRA, C.M; OLIVEIRA, E.M; BONAN, C.D; SARKIS, J.J.F; VASSALO, D.V. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **135**, 269-275, 2003.

MUTTI, Antonio. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. *Toxicology Letters*, **108**, 77-89, 1999.

NASCIMENTO, E.S; CHASIN, A. A.M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. Vol. 1. Salvador: Editora Alquimia, 2001, 176 p.

PALMER, C.D, LEWIS, M.E; GERAGHITY, C.M; BARBOSA, F; PARSONS, P.J. 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. *Spectrochimica Acta part B*, **61**, 980-990, 2006.

PEÇANHA, G. A. W. Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos. Tese de Doutorado. Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008, 145 p.

PEIXOTO, N.C; KRATZ, C.P; ROZA, T; MORSCH, V.M; PEREIRA, M.E. Effects of HgCl₂ on porphobilinogen-synthase (E.C. 4.2.1.24) activity and on mercury levels in rats exposed during different precocious periods of postnatal life. *Cell Biol Int*, 31, 1057-1062, 2007.

PEIXOTO, N.C; ROZA, T; FLORES, E.M.M; PEREIRA, M.E. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-δ-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol Lett*, 146, 17-25, 2003.

PIVETTA, F.; MACHADO, J.M.H.; ARAÚJO, U, C.; MOREIRA, M.F. R.; APOSTOLI, P. Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, 17, 545-554, 2001.

RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C..H; JARDIM, C.S.F; MELO, L.F.C; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*, 27, 771-780, 2004.

RISSANEN, T; VOUTILAINEN, S; NYSSÖNEN, K; LAKKA, T.A; SALONEN, J.T. Fish oil-derived fatty acids, Eicosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *Circulation*, 22, 2677-9, 2000.

ROCHA, C.A.M. Avaliação da genotoxicidade do cloreto de metilmercúrio em duas espécies de peixes neotropicais. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, Belém, 2009. 80 p.

RODRIGUES, J. L; SOUZA, S. S; SOUZA, V. C. O; BARBOSA, F. Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with

inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure. *Talanta*, **80**, 1158- 1163, 2010.

ROZA, T; PEIXOTO, N.C; WELTER, A; FLORES, E.M; PEREIRA, M.E. 2,3-Dimercapto-1-propanol does not alter the porphobilinogen synthase inhibition but decreases the mercury content in liver and kidney of suckling rats exposed to HgCl₂. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **96**, 302–308, 2005.

SALONEN, J.T; SEPPANEN, K; LAKKA, T.A; SALONEN, R., KAPLAN, G.A. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis*, **148**, 265–273, 2000.

TRIUNFANTE, P; SOARES, M. E; SANTOS, A; TAVARES, S; CARMO, H; BASTOS, M. L. M. Mercury fatal intoxication: Two case reports. *Forensic Sci. Int.* **184**, e1-e6, 2009.

VIRTANEN, J; RISSANEN, T.H; VOUTILAINEN, S; TUOMAINEN, T-P. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **18**, 75-85, 2007.

WELDON, M; SMOLINSKI, M; MAROUFI, A; HASTY, B.W; GILLISS, D. L; BOULANGER, L; BALLUZ, L. S; DUTTON, R. J. Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. *West J Med.* **173**, 15 – 18, 2000.

YONAGA, T; FUJINO, Y; KURABAYASHI, K; URAYA, T; AONO, K; YOSHIMURA, K. Effect of organic and inorganic Mercury compounds on the growth of incisor and tibia in rats. *Anatomischer Anzeiger*, **159**, 373-383, 1985

ZAHIR, F; RIZWI, S. J.; HAQ, S. K; KHAN, R.H. Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, **20**, 351-360, 2005.

ZAVARIZ, C.; GLINA, D. M. R. Effects of Occupational Exposure to Mercury in Workers at a Light Bulb Factory in Santo Amaro, São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Públ*, **9** , 17-129, 1993.