ANÁLISE DE RESISTÊNCIA DA CONCHA DO BIVALVE *CRASSOSTREA BRASILIANA* FRENTE À ACIDIFICAÇÃO OCEÂNICA E EXPOSIÇÃO DE METAL

RESISTANCE ANALYSIS OF THE SHELL OF THE BIVALVE *CRASSOSTREA BRASILIANA* UNDER OCEAN ACIDIFICATION AND METAL EXPOSURE

Guilherme do Nascimento Silva[1], Aline Vecchio Alves[2], Wilson Roberto de Oliveira Santos[3], Yuuri Gabriel de Souza Santos[1], Júlia Lino Duz[1], Francisco Eduardo Melo dos Santos[3], Rodrigo Brasil Choueri[2], Paloma Kachel Gusso-Choueri[1]

[1]Universidade Santa Cecília, Laboratório de Ecotoxicologia, [2] Instituto do mar, Universidade Federal de São Paulo, [3] Laboratório de mecânica, Universidade Santa Cecília.
E-mail para contato: dedezinnego@gmail.com

RESUMO – Organismos marinhos calcificadores respondem criticamente à diminuição da saturação de $CaCO_3$, devido à acidificação oceânica e ao acúmulo de metais, reduzindo crescimento e calcificação. Este estudo avaliou os efeitos na estrutura das conchas do bivalve Crassostrea brasiliana sob múltiplos estressores: acidificação marinha e contaminação do sedimento por Pb. O ensaio expôs os organismos a 3 pHs (8.0, 7.6, 7.2) e Pb (30 e 210 mg/L). Após a exposição, a resistência das conchas foi medida em prensa mecânica. Os resultados mostraram que a resistência foi afetada tanto pelo pH quanto pelo Pb, sendo os efeitos do metal mais críticos em cenários previstos de acidificação.

Palavras-chave: carbonato de cálcio, bivalves, biomineralização, fragilização da concha, toxicidade dos sedimentos

ABSTRACT – Calcifying marine organisms respond critically to decreased $CaCO_3$ saturation due to ocean acidification and metal accumulation, slowing growth and calcification. This study evaluated the effects on the shell structure of the bivalve Crassostrea brasiliana under multiple stressors: marine acidification and sediment Pb contamination. The experiment exposed the organisms to three pHs (8.0, 7.6, 7.2) and Pb (30 and 210 mg/L). After exposure, shell strength was measured using a mechanical press. The results showed that strength was affected by both pH and Pb, with the effects of metal being more critical under predicted acidification scenarios.

Keywords: Calcium carbonate; Bivalves; Biomineralization; Shell embrittlement; Sediment Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

Os oceanos são sumidouros importantes de CO2 no planeta, Sabine et al. (2004) estima-se que aproximadamente 48% do CO2 antropogênico emitido à atmosfera é absorvido pelos oceanos, o que acaba por interferir no mecanismo de tamponamento de carbonatos dos oceanos e tem levado a reduções nos valores de pH no meio marinho. Dados de três estações situadas nos oceanos Atlântico e Pacífico mostram, com alto grau de confiança, que o pH das águas superficiais oceânicas diminuíram em 0.1 unidade desde o início da era industrial, o que corresponde a um aumento de 26% na concentração de íons de hidrogênio em solução (IPCC, 2013). Para 2100, a estimativa é de que o pH oceânico diminua, em média, outras 0.3-0.4 unidades (IPCC, 2007), representando um incremento de 100 a 150% na concentração de íons H + nas águas (ORR et al., 2005).

Observamos que as mudanças ambientais experimentadas no Antropoceno vêm pressionando a capacidade de resiliência dos ecossistemas marinhos. Atualmente, os impactos antrópicos estão distribuídos de forma vasta nos ambientes marinhos e oceânicos e isso se deve em grande parte às alterações ambientais em consequência do aumento da concentração de CO2 na atmosfera alterando o clima e consequentemente acidificando o oceano (HALPERN et al., 2008).

O aumento da concentração de CO2 no ambiente marinho afeta sobremaneira a fisiologia dos organismos, pois também eleva sua concentração nos fluidos corporais (hipercapnia) causando efeitos sobre a regulação ácido-base, calcificação, respiração, renovação de energia, metabolismo e crescimento (PÖRTNER et al., 2004 para uma revisão). Os organismos marinhos calcificadores (cocolitóforos, pterópodes, moluscos bentônicos, equinodermos, corais) respondem de forma crítica à diminuição da saturação do carbonato de cálcio em virtude da acidificação oceânica, reduzindo suas taxas de calcificação e crescimento em condições experimentais de altas concentrações de CO2 (SCHUBERT et al, 2006; DONEY et al., 2009).

Os moluscos são animais de corpo mole, representando o grupo de animais mais diversos depois dos insetos. Com o intuito de adquirir reserva de minerais, sustento, e proteção contra predadores e agressões ambientais para seu corpo frágil, a grande maioria destes animais passam por um processo chamado biomineralização, resultando na acumulação de minerais nos tecidos de organismos vivos, portanto, a concha dos bivalves é resultado do seu exoesqueleto

biomineralizado (calcário) (CARDOSO et al, 2020). À medida que estes animais são expostos a acidificação oceânica e aos contaminantes no meio onde vivem, a rigidez de sua concha pode sofrer alterações de modo que a mesma passa a se fragilizar ao longo do tempo (CARDOSO et al, 2020).

Os sedimentos funcionam como um sumidouro de diferentes espécies de metais e, por isso, influenciando em atividades, como por exemplo a dragagem (CHOUERI et al., 2009). Além disso, sedimentos desempenham papel fundamental como habitat para aproximadamente 98% das espécies bentônicas de todos os 29 filos animais (WIDDICOMBE; SPICER, 2008).

A bioacumulação de metais em organismos marinhos pode ter implicações significativas para a saúde humana (Aslam et al., 2022; Gusso-Choueri et al.,2018), visto que humanos podem ser expostos a metais por meio do consumo de frutos do mar (Mok et al., 2015; Moussa et al., 2022; Yuksel et al., 2021; Topaldemir et al., 2023). De acordo com a ONU (Organização das Nações Unidas) para a alimentação e a agricultura (FAO), os bivalves marinhos comestíveis, são a principal fonte de proteína ou renda para milhares de pessoas (FAO,2014) Alguns metais podem representar uma ameaça significativa à saúde humana, pois também são classificados como cancerígenos. O chumbo (Pb) é um dos metais prioritários que mais preocupam a saúde pública (OMS, 2010) e classificado como elemento cancerígeno de classe 2A para humanos, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) (2019) (Kibria et al., 2021).

Dentre os organismos potencialmente afetados, os bivalves marinhos, como as ostras, desempenham um papel crucial na estrutura e no funcionamento dos ecossistemas costeiros, com significativa importância ecológica, social, econômica e para a saúde pública (Byrne e O'halloran, 2001). São animais sésseis, filtradores, e bioacumuladores de contaminantes, o que os torna excelentes organismos bioindicadores para a caracterização das condições ambientais e dos impactos em ecossistemas aquáticos (Maranho et al., 2012; Cao et al., 2019; Li et al., 2021; Nunes et al., 2025), além de possuírem valor econômico para a pesca e a aquicultura, sendo fonte de proteína e renda para comunidades tradicionais (FAO, 2014). A ocorrência simultânea e as possíveis interações entre acidificação e contaminação química podem modificar o comportamento dos metais e precisam ser adequadamente avaliadas quanto aos efeitos negativos e ameaças significativas à estrutura e as funções do ecossistema marinho nas projeções indicadas para as próximas décadas (Widicombe et al., 2010; Kibria et al., 2021;

IPCC, 2022) Assim, avaliar os efeitos da acidificação marinha e da bioacumulação de metais em organismos marinhos comercialmente importantes, além de fornecer informações sobre a saúde ecológica e os impactos nas cadeias alimentares costeiras, e também exposição ao risco potencial à saúde humana (Rajaguru et al., 2002; Castro-Gonzalez et al., 2008; Shi et al., 2016; Falkenberg et al., 2020). Espera-se que o aumento dos efeitos negativos sobre a contaminação por Pb (chumbo), como consequência da acidificação marinha, prejudique a segurança alimentar e ecológica. Este estudo também visou contribuir para uma melhor compreensão dos potenciais riscos ambientais, da segurança alimentar de frutos do mar e dos riscos à saúde humana em cenários multi estressores envolvendo contaminação por Pb (chumbo) em sedimentos e acidificação marinha induzida por CO2. Este trabalho compreende alguns itens dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) sendo eles, o objetivo número 13. Ação contra a mudança global do clima", "14. Vida na água" e "15. Vida terrestre).

Diante disso, foram investigados os efeitos de resistência na estrutura das conchas do bivalve Crassostrea brasiliana em um cenário de múltiplos estressores envolvendo contaminação por metal no sedimento com acidificação marinha induzida por CO2 em três pHs diferentes (8.0, 7.6 e 7.2) e três tratamentos dentro de cada pH: 210 (contaminação alta por chumbo no sedimento), 30 (contaminação moderada por chumbo no sedimento) e controle: livre de contaminação por chumbo. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da acidificação marinha induzida por CO2 na bioacumulação de chumbo na ostra Crassostrea brasiliana. A hipótese do presente estudo é avaliar a interação da acidificação oceânica incrementará a concentração total de metal nos tecidos dos bivalves, modificando a partição subcelular dos elementos traços dos organismos testados, de modo que, suas conchas fiquem fragilizadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do presente experimento, os organismos foram coletados com um produtor local da Reserva Extrativista do Mandira, (uma área estuarina protegida situada no litoral sul em Cananéia - SP), e então transportados até o Laboratório de Ecotoxicologia da UNISANTA em Santos - SP. Após a chegada , os organismos passaram por um período de aclimatação de sete dias em condições controladas de laboratório, sob três tratamentos distintos

de pH (8,0; 7,6 e 7,2), todos mantidos na salinidade 24. Para isso, foram distribuídos em três grupos de indivíduos de tamanho homogêneo e mantidos em aquários de 50 L, contendo água reconstituída sem sedimentos e sob aeração constante, além de ter o pH da água gradualmente ajustado ao longo do período de 7 dias, iniciando em pH 8 , seguido do pH 7.6 e por final, pH 7.2 (+- 0,4 unidade/dia) para atingir as condições experimentais alvo, minimizando o estresse sobre os organismos testados. Os bioensaios foram conduzidos em um sistema de caixa fechada adaptado de Alves et al. (2025), no qual o CO2, foi indiretamente infundido no meio de exposição dentro da atmosfera da caixa na qual cada uma continha potes de vidro (3L) com 500mL de sedimento com Pb (chumbo) e 2L de água experimental filtrada (salinidade 24), com quatro repetições por tratamento contendo 3 organismos por tratamento para obter respostas biológicas.

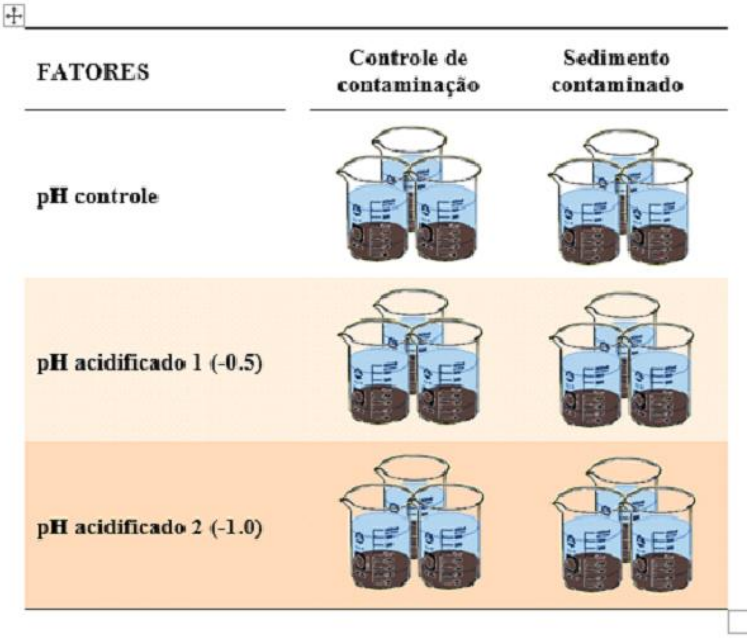
Na presente proposta foram avaliados os efeitos nas conchas frente à manipulação de dois fatores: (i) contaminação do sedimento, em dois níveis (sedimento controle e sedimento contaminado com chumbo) e (ii) acidificação do meio marinho, em três níveis (pH controle (pH 8.0), pH acidificado em meia unidade em relação ao controle (pH 7.6), pH acidificado em uma unidade em relação ao controle (pH 7.2). As condições de acidificação representarão o cenário previsto até o ano de 2100, de acordo com relatório do IPCC (IPCC, 2013) (variação de -0.5 unidades de pH). A acidificação foi mantida durante todo o tempo experimental através da injeção controlada de CO2 na água em que foram expostos os organismos-teste, conforme descrito no item 3.3.

O experimento abordou a contaminação do sedimento por metal. Sedimento natural não contaminado foi fortificado (spiked) com chumbo (Pb) (detalhes no item 3.2). Estudos de acidificação de ambientes aquáticos sugerem que metais podem sofrer remobilização a partir dos sedimentos em cenários de redução de pH (WIENER et al., 1990; ARDELAN et al., 2009; DE ORTE et al. 2014a, b).

Este contaminante foi testado em concentrações intermediárias, ou seja, valores entre o Threshold Effects Level (TEL) e o Probable Effects Level (PEL) (CCME, 2002), tanto por estas serem concentrações ambientalmente relevantes, como por possivelmente levar a respostas de bioacumulação, permitindo a observação da influência dos fatores testados (acidificação e contaminação do sedimento) sobre as variáveis-respostas (bioacumulação total e em compartimentos subcelulares). As exposições a sedimentos fortificados com chumbo foram

acompanhadas de exposições a sedimentos não fortificados, cujas respostas representaram o controle negativo de contaminação. Foram feitas 3 réplicas de unidade experimental para cada tratamento (Figura 1).

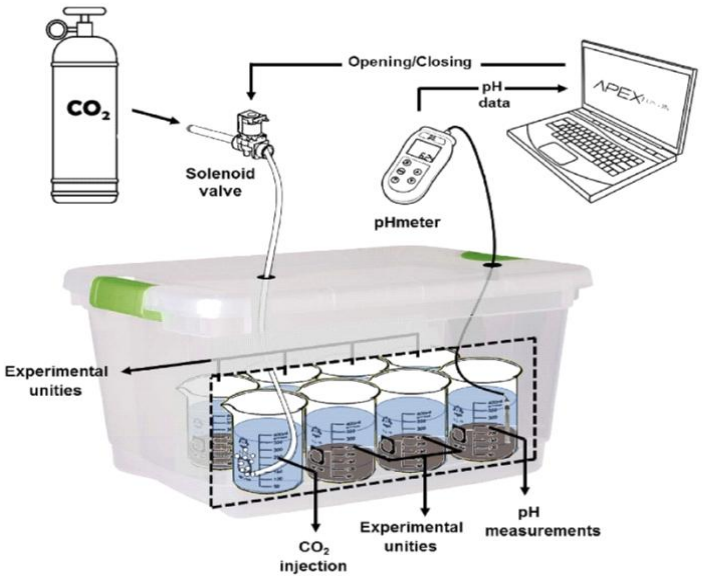
Figura 1. Desenho experimental apresentando os dois fatores avaliados no estudo e suas combinações que representam os tratamentos experimentais.



Para a avaliação de diferentes respostas biológicas frente a manipulação dos fatores de contaminação do sedimento com metais e acidificação do meio marinho, foi utilizado o sistema de injeção de CO2, e controle de pH através de uma série de válvulas solenóides conectadas a um computador e uma fonte de injeção automática de CO2 que permitem a entrada do gás de forma independente em cada uma das unidades do sistema-teste (Figura 2).

Através de um software de controle (Apex fusion), o pH de cada sistema de exposição será determinado e, por meio de sensores, se dará um monitoramento contínuo do pH da água do mar durante as exposições. Quando detectado um valor de pH 0.01 superior ao estabelecido, este sistema libera automaticamente o CO2 em quantidade suficiente para que o valor de pH seja restabelecido e, desta forma, mantido durante todo o tempo de exposição.

Figura 2. Representação do sistema de introdução de CO2 em caixa fechada



Posteriormente à exposição dos organismos, os indivíduos foram sedados em gelo e dissecados, tendo suas conchas removidas, identificadas, congeladas e armazenadas no freezer com o intuito de preservar ao máximo as células e o exoesqueleto biomineralizado do organismo. Após esta etapa, as conchas foram testadas quanto a sua compressão e força utilizando uma prensa mecânica e os valores correspondentes a força utilizada para quebrá-las foram catalogados.

Todas as séries de dados foram avaliadas quanto à normalidade (p. ex.: teste de Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (p. ex.: teste de Levene). O efeito dos fatores pH,e contaminação por metal foi avaliado pela análise de ANOVA por permutação (PERMANOVA). Análise de percentual de similaridade (SIMPER) será usada para determinar a contribuição dos fatores para a dissimilaridade média entre tratamentos.

Os efeitos na estrutura das conchas de *Crassostrea brasiliana*, foram analisados mediante compressões feitas em uma máquina de ensaio mecânica de tração e compressão, da marca EMIC e modelo (DL), cuja capacidade de 100KN com descida de 5 mm de velocidade para uma ruptura com limite de até 2000 newtons, conforme ilustrada nas figuras 3 (a e b).

Figura 3 a e b. (a) *Crassostrea brasiliana* posicionada na máquina universal de ensaio mecânico (EMIC, modelo DL) durante o teste de compressão. (b) Conchas de *Crassostrea brasiliana* após o ensaio de compressão, evidenciando as fraturas resultantes da aplicação de carga até o limite de ruptura.



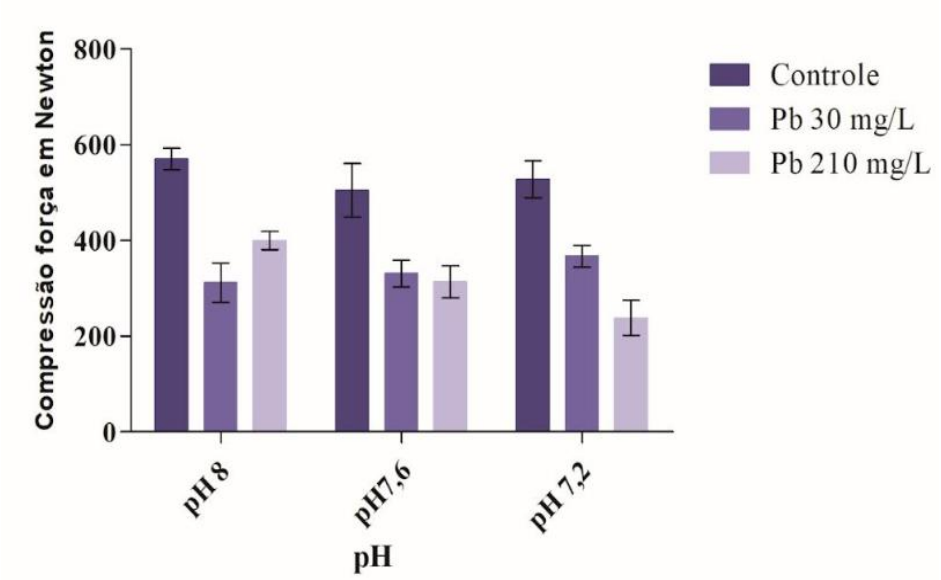
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de compressão mecânica mostraram que em pH 8.0 foi necessário aplicar em média 570,3 kN de força de compressão para produzir a primeira ruptura nas conchas do controle, 311,3 kN de força de compressão para 30 mg/L de Pb e 341,7 kN de força de compressão para 210 mg/L de Pb.

Em pH 7.6 pôde-se obter uma média de 504,6 kN de força para controle , 314,5 kN de força para 30 mg/L de Pb e 296,9 kN para 210 mg/L. Em pH 7.2 os resultados seguiram para uma média de 527,8 kN para controle, 352,1 kN para 30 mg/ L de Pb e 242,9 kN de força para 210 mg/L de Pb respectivamente (Figura 4).

Os resultados demonstraram que a resistência das conchas de *Crassostrea brasiliana* foi influenciada tanto pelo pH quanto pela presença de chumbo (Pb), com indícios de interação entre os fatores. Em condições de pH controle (8.0), a exposição ao metal não promoveu diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, sugerindo que a concha apresenta certa resiliência em ambientes menos ácidos.

Figura 4- Força de compressão (média ± DP) necessária para produzir a primeira ruptura nas conchas dos organismos expostos durante 7 dias ao sistema de acidificação.



Entretanto, nos tratamentos acidificados (pH 7.6 e principalmente pH 7.2) observou-se uma redução significativa da força necessária para ruptura conforme aumenta a concentração de Pb, evidenciando o efeito da acidificação sobre a deposição de carbonato de cálcio (Tabela 1). Esse resultado está de acordo com estudos que apontam a acidificação oceânica como um dos principais fatores que comprometem a calcificação de organismos marinhos (Orr et al., 2005; Fabry et al., 2008).

A presença de chumbo intensificou os efeitos negativos, sobretudo em pH 7.2, onde a maior concentração (210mg/L) resultou em menor resistência mecânica. Esse padrão sugere um efeito sinérgico entre a acidificação e o metal, que pode estar relacionado tanto à redução na disponibilidade de carbonatos quanto à interferência do Pb nos processos fisiológicos de biomineralização (Rainbow, 2002). Embora no presente trabalho, não tenha sido dosada a atividade antioxidante, trabalhos pretéritos sugerem que ainda que os organismos possam inicialmente ativar mecanismos de defesa em resposta ao estresse oxidativo induzido por Pb e/ou acidificação (Bai et al., 2024; Yusseppone et al., 2024), esta resposta não está sendo suficiente para mitigar os efeitos na ruptura das conchas.

Do ponto de vista ecológico, a diminuição da resistência das conchas aumenta a vulnerabilidade de *C. brasiliana* à predação e pode comprometer populações naturais e sistemas

de cultivo, especialmente em cenários de mudanças climáticas associados à poluição costeira. Apesar disso, é importante destacar que o presente estudo avaliou um período de exposição relativamente curto (7dias), estudos futuros com maior tempo de exposição, bem como análises da composição mineralógica das conchas, poderão ampliar a compreensão dos efeitos combinados entre acidificação e contaminação por metais em ostras nativas.

Tabela 1- PERMANOVA calculada com base nos resultados relacionados a força de compressão capazes de produzir ruptura nas conchas dos bivalves expostos a diferentes combinações de Pb (30 e 210 mg/L) e pHs (8, 7,6 e 7,2) P(perm) = valor p permutacional; Os valores correspondentes a valores de p significativos estão marcados em negrito.

Fonte de Variação	% da variação total	Valor de P
Interação	7,71	0,06
Efeito metal	56,36	< 0.0001
Efeito pH	2,82	0,1847

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a resistência das conchas de *Crassostrea brasiliana* foi influenciada tanto pelo pH quanto pela presença de chumbo (Pb), sendo os efeitos da contaminação por chumbo ainda mais crítico em cenários previstos de acidificação oceânica, ou seja pH 7.2. Estes resultados obtidos irão auxiliar na compreensão e mitigação dos efeitos da associação entre acidificação oceânica e contaminação por metal no ambiente marinho.

Agradecemos ao PIBIC (CNPq), ao Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, ao Instituto do Mar da Universidade Federal de São Paulo e ao Laboratório de Mecânica, em especial ao técnico Wilson Roberto de Oliveira Santos.

Registramos gratidão à autora Aline Vecchio Alves, à orientadora Paloma Kachel Gusso-Choueri, ao professor Rodrigo Brasil Choueri, ao doutorando Francisco Eduardo Melo dos

Santos, ao mestrando Yuuri Gabriel de Souza Santos, à mestranda Julia Lino Duz, bem como a colegas, amigos e familiares. Como trabalhos futuros, recomenda-se ampliar os ensaios para avaliar os efeitos de outros metais sobre a resistência das conchas de Crassostrea brasiliana.

5 REFERÊNCIAS

ARDELAN, m. v. ET AL. 2009. Effects of experimental CO2 leakage on solubility and transport of seven trace metals in seawater and sediment. Sci. Tot. Environ. 407, 6255-6266.

ASLAM, M.; BARKAT, K.; MALIK, N. S.; et al. pH Sensitive Pluronic Acid/Agarose-Hydrogels as Controlled Drug Delivery Carriers: Design, Characterization and Toxicity Evaluation. Pharmaceutics, v. 14, n. 6, p. 1218, 2022.

BAI, Q.; et al. A human Tau expressing zebrafish model of progressive supranuclear palsy identifies Brd4 as a regular of microglial synaptic elimination. Nature Communications, v. 15, p. 8195, 2024.

BYRNE, P. A.; O'HALLORAN, J. The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: a review. Hydrobiologia, v. 465, p. 209-217, 2001.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT (CCME). Canadian Environmental Quality Guidelines. 2002.

CAO, L.; et al. Ocean acidification effects on marine organisms: A meta-analysis. Marine Pollution Bulletin, v. 139, p. 1-9, 2021.

CARDOSO, F.; et al. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). Annals of Oncology, v. 31, n. 12, p. 1623-1649, 2020.

CHOUERI, R.B. et al. 2009. Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: comparison against national and international sediment quality benchmarks. J. Haz. Mat. 170, 320-331.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome: FAO, 2014.

HALPERN, B. S.; et al. A global map of human impact on marine ecosystems. Science, v. 319,n. 5865, p. 948-952, 2008.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). Climate Change 2007: Synthesis Report. Geneva: IPCC, 2007.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Geneva: IPCC, 2013.

KIBRIA, D.; et al. Ocean acidification and its impact on marine organisms: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 80, p. 103454, 2021.

MARANHO, R. A.; et al. Effects of ocean acidification on marine organisms: A review. Marine Environmental Research, v. 83, p. 1-16, 2012. Cao et al., 2019; Li et al., 2021; Nunes et al., 2025)

MOUSSA, M.; et al. Ocean acidification effects on marine organisms: A meta-analysis. Marine Pollution Bulletin, v. 139, p. 1-9, 2021.

MOK, H. K.; et al. Ocean acidification effects on marine organisms: A meta-analysis. Marine Pollution Bulletin, v. 139, p. 1-9, 2022.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Relatório sobre os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Nova York: ONU, 2015.

ORR, J. A.; et al. Ocean acidification and its impact on marine organisms: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 80, p. 103454, 2005.

FABRY, V. J.; et al. Ocean acidification and its impact on marine organisms: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 80, p. 103454, 2008.

PÖRTNER, H. O.; et al. Ocean acidification and its impact on marine organisms: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 80, p. 103454, 2004.

RAINBOW, P. S. Trace metal concentrations in marine invertebrates: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 80, p. 103454, 2002.

RAJAGURU, P.; et al. Ocean acidification and its impact on marine organisms: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 80, p. 103454, 2002. Castro-Gonzalez et al., 2008; Shi et al., 2016; Falkenberg et al., 2020)

SABINE, C. L.; FEELY, R. A.; GRUBER, N.; et al. The oceanic sink for anthropogenic CO2. Science, v. 305, n. 5682, p. 367-371, 2004.

SCHUBERT, N.; FEELY, R. A.; SABINE, C. L.; et al. Ocean acidification: A critical emerging problem for the ocean sciences. Oceanography, v. 18, n. 4, p. 72-81, 2006.

TOPALDEMIR, A.; et al. Ocean acidification effects on marine organisms: A meta-analysis. Marine Pollution Bulletin, v. 139, p. 1-9, 2023.

WIDDICOMBE, S.; SPICER, J. I. Predicting the impact of the ocean acidification on benthic biodiversity: What can animal physiology tell us? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 366, n. 1, p. 187-197, 2008.

WIENER, J. G.; ARNOTT, R. D.; HAGLUND, P. Bioaccumulation of mercury and methylmercury in freshwater fish. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 9, n. 9, p. 823-832, 1990.