

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA COMPARATIVA**

**AVALIAÇÃO INTEGRADA DA POLUIÇÃO EM DOIS ESTUÁRIOS DO
ESPÍRITO SANTO, BRASIL POR MEIO DE BIOMARCADORES E ANÁLISES
QUÍMICAS NO AMBIENTE E EM *Centropomus parallelus* Poey, 1860**

IARA DA COSTA SOUZA

**SÃO CARLOS – SP
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA COMPARATIVA**

**AVALIAÇÃO INTEGRADA DA POLUIÇÃO EM DOIS ESTUÁRIOS DO
ESPÍRITO SANTO, BRASIL POR MEIO DE BIOMARCADORES E ANÁLISES
QUÍMICAS NO AMBIENTE E EM *Centropomus parallelus* Poey, 1860**

Orientada: Iara da Costa Souza
Orientadora: Dra. Marisa Narciso Fernandes
Co-orientador: Daniel Alberto Wunderlin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

**SÃO CARLOS – SP
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S729ai

Souza, Iara da Costa.

Avaliação integrada da poluição em dois estuários do Espírito Santo, Brasil por meio de biomarcadores e análises químicas no ambiente e em *Centropomus parallelus* Poey, 1860 / Iara da Costa Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 70 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Ecologia aquática. 2. Metais. 3. Contaminação ambiental. 4. Marcadores biológicos. 5. Estuário. I. Título.

CDD: 574.5263 (20ª)

Iara da Costa Souza

**AVALIAÇÃO INTEGRADA DA POLUIÇÃO EM DOIS ESTUÁRIOS DO
ESPÍRITO SANTO, BRASIL POR MEIO DE BIOMARCADORES E ANÁLISES
QUÍMICAS NO AMBIENTE E EM *Centropomus parallelus* Poey, 1860**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 30 de março de 2011

BANCA EXAMINADORA

Presidente



Prof. Dra. Marisa Narciso Fernandes
(Orientadora)

1º Examinador



Prof. Dr. Irineu Bianchini Júnior
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira
Universidade Santa Cecília/Santos-SP

À todos os que acreditaram em mim, mesmo quando eu já não acreditava que teria forças para seguir adiante.

Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece. Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano. Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento. Assim somos nós.

Osho

AGRADECIMENTOS

À minha mãe fonte de carinho, amor e dedicação incondicional em todos os momentos.

Ao meu pai que me “impulsionou” a seguir este sonho, sempre acreditando que por meio dos estudos é que a “mala sem alça e com rodinha quebrada” seria “livre”.

Ao meu irmão que mesmo racionalmente foi essencial nos momentos em que foi preciso ver além dos meus olhos.

À Prof. Dra. Marisa Narciso Fernandes que acreditou em um projeto novo, sendo paciente neste aprendizado comigo.

Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

À bolsa de mestrado do Cnpq.

À FACITEC pelo financiamento deste projeto.

À Prefeitura de Aracruz pelo apoio logístico.

Aos pescadores e sua infinita sabedoria essencial para não “atolar no mague”.

À Prof. Dra. Silvia Tamie Matsumoto que foi o começo de tudo, meu pilar científico e um exemplo de determinação e carinho.

À Prof. Dra. Camilla Rozindo Milanez, coordenadora deste projeto, que me ajudou a remar literalmente e com seu sorriso, alegrou até os momentos mais difíceis.

Al Dr. Daniel Wunderlin, que adoptó una brasileira, me enseñando los caminos difíciles y apasionantes de la química.

À Prof. Dra Magdalena Monferrán, Rocio y toda equipe del ISIDSA que pasaran horas ayudándome y tomando mate, mismo que no fueran los mejores.

A Sabrina que con su infinito cariño y con su marido, Jorje, me aceptaran en su casa, haciendo de mis lagrimas nocturnas, sonrisas y de las noches, momentos de paz y amor. Fueran mucho más que mis amigos, son mi familia Argentina. Los quiero mucho!

Ao André, Felipe e Pedro que cuidaram do meu bebê, um pastor alemão chamado Stark, ganhando além de muito pelo todo meu carinho e admiração, e até uma nova moradora para a república.

Ao Felipe e Henrique, grandes amigos, sempre dispostos a me escutar e me ajudar. Que o diga Henrique que compartilhou um choque anafilático comigo depois das infinitas picadas dos “monstros” do mangue.

A Thamires, Celma e Walmir, minha família de alma, e a Jéssica que foi muito mais que uma amiga, cuidando de mim, nunca me deixou sozinha, fazendo deste “coração de pedra” o coração mais acalentador que eu já conheci.

A tia Nice, tio Gilberto, David e Gabriel pelo apoio, carinho e ajuda com a “mala” nas infinitas viagens.

À tia Eliza, tio Antônio, Adriano pelo “SPA” revigorante nos últimos meses com certeza fundamental nestes momentos tão difíceis. Além é claro da Larissa, minha personal stylist pelo apoio, exemplo de racionalidade, profissionalismo e infindável carinho.

À Natieli que não foi só uma aluna que me ajudou neste projeto, foi uma amiga e um exemplo de dedicação e profissionalismo, caminhando sempre junto comigo.

À equipe do laboratório que me ajudou todas as vezes que eu “gritei” a mais de 3000km de distância. Que o diga Natália e Marcelo!

A todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente neste projeto, que me levaram nos braços e me deram forças quando caminhar sozinha já não era possível, mas que não tiveram seus nomes mencionados, saibam que sem o apoio de vocês jamais seria possível concretizar este sonho. Obrigada!

RESUMO

Regiões estuarinas e costeiras são frequentemente impactadas por vários tipos de influências antropogênicas derivadas de indústrias, atividades portuárias, agricultura e esgoto. Dois estuários brasileiros (Piraque-açu – ES e Santa Maria – ES) foram avaliados com o objetivo de correlacionar biomarcadores genéticos, bioquímicos, morfológicos e fisiológicos determinados no peixe *Centropomus parallelus* com parâmetros de qualidade da água, metais na água, água intersticial e sedimentos. Parâmetros físico-químicos integrados foram medidos na Baía de Vitória e em Santa Cruz durante as estações de inverno e verão. Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Pb, Hg foram observadas em amostras de água, água intersticial, sedimentos e no músculo do peixe. Biomarcadores incluem a frequência de alterações nucleares e micronúcleo, atividade da NKA, alterações histopatológicas e número de células cloreto. Os biomarcadores apresentaram alterações em sua maioria a nível reversível, detonando nível leve a moderado de contaminação. As características do estuário, como matéria orgânica e oxigênio dissolvido se correlacionaram com a concentração de metais presentes em *C. parallelus*, influenciando na biodisponibilidade dos mesmos. O uso combinado de biomarcadores com parâmetros de qualidade da água mostra a importância de avaliar o grau de contaminação e suas consequências sobre a biota aquática.

Palavras - Chaves: Metais, *C. parallelus*, contaminação, biomarcador, estuário.

ABSTRACT

Estuarine and coastal regions are often impacted by various anthropogenic influences derived from industries, port activities, agriculture and sewage. Two Brazilian estuaries (Piraque-açu - ES and Santa Maria - ES) were evaluated in order to correlate genetic, biochemical, morphological and physiological biomarkers determined in the fish *Centropomus parallelus* with water quality parameters, metals in superficial and interstitial water and sediments. Integrated physical and chemical parameters were measured in Victoria Bay and Santa Cruz during the winter and summer. Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Ag, Cd, Pb, Hg were observed in samples of water, interstitial water, sediment and fish muscle. Biomarkers include the frequency of micronuclei and nuclear alterations, NKA activity, histopathological changes and cellular chloride. The biomarkers showed changes mostly at reversible, triggering mild to moderate level of contamination. The characteristics of the estuary, as organic matter and dissolved oxygen are correlated with the concentration of metals present in *C. parallelus*, influencing the bioavailability of the same. The combined use of biomarkers to measures of water quality shows the importance of assessing the degree of contamination and its consequences for aquatic biota.

Keywords: Metals, *C. parallelus*, pollution, biomarker, estuary.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Metais.....	3
1.2 Monitoramento Ambiental	4
1.3 Biomarcador	6
1.3.1 Biomarcadores Bioquímicos.....	10
1.3.2 Biomarcadores Genéticos	10
1.3.3 Biomarcadores Fisiológicos e Morfológicos.....	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Área de Estudo	15
3.2 Material biológico	16
3.2.1. <i>Centropomus paralellus</i> . Características da espécie.	16
3.2.2. Coleta de peixes e amostras biológicas.....	19
3.3 Análises Físicas e Químicas	20
3.3.1 Metais.....	23
3.3.2 Concentração metais em músculo de <i>C. paralellus</i>	25
3.4 Análises Biológicas	26
3.4.1. Biomarcador Genético – <i>Micronúcleo e Anomalis nucleares</i>	26
3.4.2. Biomarcador Morfológico – <i>Histopatologia do tecido Branquial</i>	26
3.4.3. Biomarcador Fisiológico	27
3.5 Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Variáveis Físicas e Químicas da água e sedimento	29
4.2. Variáveis biológicas	29
4.2.2. Concentração metais em músculo de <i>C. paralellus</i>	29

4.2.2. <i>Biomarcadores Genéticos</i>	29
4.2.3. Biomarcadores Morfológicos -Histopatologia do tecido Branquial	36
4.2.3. Biomarcadores fisiológicos.....	36
4.3 Integração das variáveis físicas e químicas de água e sedimento e variáveis biológicas..	44
5. DISCUSSÃO	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
7. REFERÊNCIAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização dos sistemas costeiros monitorados – Baía de Vitória (S 20° 14' 31,5" e W 40° 19' 84,7") e Santa Cruz (S 19° 56' 26,2" e W 40° 12' 87"). O asterisco indica o local de coleta das amostras bióticas e abióticas nos dois períodos de coleta.....	17
Figura 2. Exemplar de robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>).	20
Figura 3. Microondas Anton Paar 3000 Multiwave.....	23
Figura 4. Frequência de micronúcleos em eritrócitos de <i>C. parallelus</i>	34
Figura 5. Eritrócitos de <i>C. parallelus</i> . A seta indica um micronúcleo. Barra = 20µm.....	34
Figura 6. Frequência de anomalias nucleares em eritrócitos de <i>C. parallelus</i>	35
Figura 7. Eritrócitos de <i>C. parallelus</i> . As setas indicam anomalias nucleares. Barra = 20µm.....	35
Figura 8. Índice de Alterações Histopatológicas (IAH) no tecido branquial de <i>C. parallelus</i>	37
Figura 9. Brânquia de <i>C. Parallelus</i> mostrando características normais do filamento (F) e lamelas (L). Coloração: Azul de Toudina. Barra = 20µm.....	38
Figura 10. Filamento branquial mostrando hipertrofia (seta) no epitélio lamelar de <i>C. parallelus</i> . Filamento (F) e lamelas (L). Coloração: Azul de Toudina. Barra = 20µm.....	39
Figura 11. Brânquia com hiperplasia (seta) no epitélio lamelar de <i>C. parallelus</i> . Coloração: Azul de Toudina. Barra = 20µm. Filamento (F) e lamelas (L).....	40
Figura 12. Brânquia com descolamento epitelial (seta) de <i>C. parallelus</i> . Filamento (F) e lamelas (L). Coloração: Azul de Toudina. Barra = 20µm.....	41
Figura 13. Brânquia com congestão lamelar (seta) de <i>C. parallelus</i> . Filamento (F) e lamelas (L). Coloração: Azul de Toudina. Barra = 20µm.....	42
Figura 14. Atividade Na ⁺ /K ⁺ - ATPase (µMPi/mgPt/h) no tecido branquial de <i>C. parallelus</i>	43
Figura 15. Imunohistoquímica contra Na ⁺ /K ⁺ - ATPase para identificação de células nas brânquias de <i>C. parallelus</i> . As setas indicam células-cloreto no filamento.. Barra = 20 µm.....	43
Figura 16. Número de células-cloreto (CC/mm ²) do filamento do tecido branquial de <i>C. parallelus</i>	44
Figura 17. Representação gráfica da associação dos fatores em Santa Cruz período de inverno.....	48
Figura 18. Representação gráfica da associação dos fatores em Santa Cruz período de verão.....	49

Figura 19. Representação gráfica da associação dos fatores em Baía de Vitória período de inverno.....	49
Figura 20. Representação gráfica da associação dos fatores em Baía de Vitória período de verão.....	50
Figura 21. Representação gráfica da associação dos fatores 1 e 2 com cada um dos locais de coleta para todas as estações.....	51
Figura 22. Representação gráfica da associação dos fatores 1 e 3 com cada um dos locais de coleta para todas as estações.....	52
Figura 23. Representação gráfica da associação dos fatores 2 e 3 com cada um dos locais de coleta para todas as estações.....	53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros físico e químicos avaliados na água superficial nos estuários de Santa Cruz e Baía de Vitória no inverno e verão.....30
- Tabela 2.** Concentração de metais medidos em água superficial (mg/L), intersticial (mg/L) e sedimento (ug/g de massa seca) nos estuários Santa Cruz e Baía de Vitória, no inverno e verão. Valores expressos em médias \pm desvio padrão: sedimentos correspondem a fração $<63\mu\text{m}$. LDI (abaixo limite de identificação). LDQ (abaixo limite de quantificação): Fe, Zn, As, Se e Hg 0,15 ug/L; Al, Cr e Ni 0,03 ug/L; Mn, Cu, Ag, Cd e Pb 0,015 ug/L.....31
- Tabela 3.** Concentração de metais medidos em músculo *C. parallelus* (ug/g de massa seca) nos estuários Santa Cruz e Baía de Vitória, no inverno e verão. Valores expressos em médias \pm desvio padrão. LDI (abaixo limite de identificação). LDQ (abaixo limite de quantificação): Fe, Zn, As, Se e Hg 0,15 ug/L; Al, Cr e Ni 0,03 ug/L; Mn, Cu, Ag, Cd e Pb 0,015 ug/L.....32
- Tabela 4.** Valores médios \pm desvio padrão dos biomarcadores nos estuários de Santa Cruz de Baía de Vitória na coleta de Verão e Inverno. Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).....33
- Tabela 5.** Resultado extraído para cada componente principal (*Autovalores*).....45
- Tabela 6.** Factor Loading – Análise Fatorial das variáveis químicas e biológicas. AS: água superficial. AI: Água intersticial. SE: Sedimento. PE: Peixe.....46
- Tabela 7.** Factor Scores extraídos para cada um dos locais de coleta. PC = Componente principal.....47

1 INTRODUÇÃO

Manguezais são ecossistemas costeiros, de transição entre os ecossistemas terrestres e marinho, característicos de regiões tropicais e subtropicais. Os manguezais são constituídos por espécies vegetais lenhosas típicas, além de micro e macroalgas, adaptadas à flutuação de salinidade que fornecem abrigo e alimentação para uma infinidade de organismos aquáticos, alguns deles de grande importância econômica (SHAEFFER-NOVELLI, 1995). Além do fornecimento de nutrientes, o papel que desempenham como berçário produtor de várias espécies de pescado que quando adultos são capturados em mar aberto, os manguezais auxiliam na sustentação de populações ribeirinhas nos trópicos e subtropicais.

Associada à vegetação dos manguezais existe uma fauna altamente diversificada, constituída de animais residentes, principalmente crustáceos, moluscos e visitantes, que frequentam o ecossistema para alimentação, proteção e reprodução, tendo como componentes principais peixes, aves, mamíferos. Toda essa diversificada fauna desempenha papel fundamental na reciclagem de nutrientes nas florestas do mangue, dando o primeiro passo na decomposição da matéria vegetal morta depositada no solo.

O ecossistema manguezal, por ser um ambiente normalmente protegido contra ondas e correntes fortes, inundado por água salobra, permite a deposição de argilas, silte e outros detritos, se constituindo, portanto, em uma ótima superfície para o transporte de metais, cuja precipitação é favorecida pelo pH alto e pela disponibilidade de sulfetos, devido às condições de redução na camada sub-superficial do sedimento. Adicionalmente, os mecanismos de transporte de água e sedimentos, pelas ondas em

direção ao estuário, pela movimentação da maré e pelo padrão de circulação estuarino, atuam de forma a prevenir o escape de sedimentos do ecossistema (HARBISON, 1986).

Os sedimentos dos manguezais são, tipicamente, argilas e lamas argilo-arenosas (VANUCCI, 1999). De um modo geral, são ricos em matéria orgânica, são pouco consistentes, têm alto conteúdo de sal e apresentam coloração cinza-escuro, com exceção dos embasamentos de recifes de coral e locais dominados por areias (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). Uma parte da matéria orgânica produzida pelos manguezais é acumulada nos solos, devido às elevadas taxas de sedimentação e à baixa degradabilidade da matéria orgânica nas condições praticamente anóxicas dos solos (BOTTCHEER et al., 2000).

Segundo Varjabedian (1995), os impactos ambientais registrados em áreas de manguezal são causados por derramamento de óleo, modificações nos fluxos de água (represamento, dragagens e canalizações), aterros sanitários, sedimentação de materiais provenientes da mineração, poluição por lançamentos de esgotos, resíduos industriais e ausência de vegetação.

A poluição, seja de origem industrial, portuária, hospitalar ou doméstica, tem impactos a longo prazo, podendo inclusive provocar o desaparecimento das florestas de mangue, pois criam condições quase sempre impróprias ao seu desenvolvimento (VANRJBEDIAN, 1995). O lançamento de efluentes domésticos e/ou industriais, com ou sem tratamento prévio, em ambientes aquáticos afeta a qualidade da água do sistema receptor, provocando redução de oxigênio dissolvido, aumento da turbidez, alterações do pH, entre outros efeitos, tendo reflexo sobre a manutenção das condições ideais para a sobrevivência dos organismos e sobre a saúde humana (Carreira et al., 2001).

O aumento de interesse nos manguezais se explica até mesmo pela percepção do acelerado processo de destruição sofrido por esses ecossistemas. Hoje, na maioria dos países tropicais e subtropicais, há uma crescente preocupação com a conservação e utilização sustentável deste recurso natural, embora várias destas nações permitam formas de exploração não sustentável dos manguezais para obtenção de lucros a curto prazo.

1.1 Metais

Os metais pesados são poluentes conservativos, isto é, poluentes que dificilmente sofrem degradação por ataque bacteriano. Esses contaminantes podem ter origem por meio de processos naturais tais como atividades vulcânicas e depósitos naturais, ou antropogênicos, efluentes domésticos e industriais, emissões atmosféricas e processos industriais (SALOMONS and FÖRSTNER, 1984). No entanto, alguns metais como, por exemplo, Fe, Cu e Zn, possuem importância na fisiologia de organismos vivos atuando como constituintes de pigmentos respiratórios, formação de metaloproteínas, ativadores de complexos enzimáticos, etc (PHILLIPS, 1977 e 1991). Ao contrário, existem outros que não são requeridos em nenhuma atividade metabólica e por isso são tóxicos para as células mesmo em pequenas concentrações, como por exemplo, Hg, Pb, Cd, Cr e Ni (Clarck, 1997 e Bowen, 1979).

Os metais que adentram o corpo d'água sofrem transformações químicas (ex. mudanças de potencial redox, reações com outros compostos, reações microbianas) e físicas (ex.: sorção e adsorção). Quando a corrente de água diminui de velocidade, o material em suspensão é gradualmente depositado (FÖRSTNER, 1981), sendo os sedimentos o destino final dessas substâncias (CHAPMAN et al., 1996). Fatores de

acumulação em relação à água maiores que 1000 são geralmente encontrados para a maioria dos metais (PHILLIPS, 1991).

Os metais que são incorporados à fase sólida (sedimentos), tornam-se menos biodisponíveis, visto que a fase aquosa (na coluna d'água) é a mais passível de ser sequestrada por alguns organismos. No entanto, o sedimento é um compartimento ativo que não somente acumula material oriundo da coluna d'água como também reprocessa esse material, podendo torná-lo novamente disponível para a coluna de água em solução (BEVILACQUA, 1996). Animais bentônicos podem sofrer uma maior influência de metais que estão mais associados aos sedimentos (JESUS, 2004).

Os metais alcançam o manguezal, principalmente, por meio das marés em duas formas trocáveis: incorporados na matéria em suspensão ou dissolvidos (HARBISON, 1986; LACERDA, 1994 apud ONOFRE et al., 2007), além do aporte crônico por meio de lançamento de efluentes domésticos e/ou industriais. Como são poluentes conservativos representam uma ameaça para os manguezais, podendo atravessar todo o ciclo ecológico envolvido no ecossistema, por um longo espaço de tempo. Devido ao fato desses metais poderem ser adsorvidos ao sedimento ou acumulados nos organismos bentônicos em níveis tóxicos (ALLEN et al., 1993; SILVÉRIO, 2003), a sua biodisponibilidade e a subsequente toxicidade têm se tornado um dos mais frequentes tópicos de estudos associados aos substratos lamosos dessas zonas.

1.2 Monitoramento Ambiental

O monitoramento é uma observação freqüente para definir efeitos de um ou mais elementos químicos ou biológicos de acordo com um cronograma previamente combinado com o tempo e espaço, usando métodos semelhantes e padronizados (de acordo com a definição das Nações Unidas Meio Ambiente - Pnuma). É importante que

os programas de monitoramento ambiental tenham objetivos bem definidos para os quais seus dados serão utilizados (PEAKALL; WALKER, 1994). Existem cinco métodos de monitoramento ambiental que podem ser realizados para avaliar os riscos de contaminantes para os organismos e classificar a qualidade ambiental de ecossistemas:

1. Monitoramento químico (MQ): medição dos níveis de contaminantes conhecidos nos em matrizes ambientais como água e sedimento.compartimentos abióticos do ambiente;
2. Monitoramento de bioacumulação (MB): medição dos níveis de contaminantes em tecido da fauna que compõe a biota;
3. Monitoramento de efeito biológico (MEB): avaliação do efeito e determinação de alterações que podem ser parcialmente ou totalmente reversíveis como por exemplo análises de biomarcadores ;
4. Vigilância da saúde (HM): avaliação do efeito através da análise da ocorrência de doenças irreversíveis ou danos nos organismos (R. Van der Oost et al, 2003);
5. Monitoramento dos ecossistemas (ME): avaliação da estrutura ecológica por meio de um inventário, com os índices ecológicos descritores para determinada comunidade.

A utilização regular e sistemática de organismos vivos para avaliar as alterações na qualidade ambiental ou de água, como no MB, MEB, HM e ME, é chamado de monitoramento biológico ou biomonitoramento (DE ZWART, 1995). Um programa de monitoramento integrado consiste em análises químicas e biológicas em uma variedade de compartimentos ambientais. Van Van Gastel e Brummelen (1996) propuseram uma

avaliação de risco ambiental (ARA) integrada de produtos químicos, que consiste na avaliação de quatro diferentes níveis de organização:

- I) Sub-organismo (biomarcadores): Ao nível bioquímico e dos processos fisiológicos, os desvios da situação normal ("saúde") pode ser medido utilizando técnicas de bioquímica.
- II) Organismos (bioensaios): sobrevivência, crescimento e reprodução de indivíduos são escolhidos como parâmetros dos testes de ecotoxicidade clássico laboratório.
- III) Populações (bioindicadores): Neste nível, os efeitos são manifestados como mudanças na estrutura genética, estrutura etária ou a abundância de uma população.
- IV) Ecossistemas (indicadores ecológicos): Neste nível, mudanças na abundância de espécies, composição e diversidade podem ser um indicativo dos efeitos da poluição nas comunidades.

Uma boa compreensão das relações entre respostas biomarcador e sobrevivência, crescimento ou reprodução é geralmente considerada como um requisito para a utilização de biomarcadores em ARA (VAN GASTEL e VAN BRUMMELEN, 1994). Cada vez é mais reconhecido que o biomonitoramento (além da MQ) é necessário para uma avaliação de risco ambiental (ARA) de confiança.

1.3 Biomarcador

Várias definições têm sido dadas para o termo "Biomarcador", que geralmente é usado em sentido amplo para incluir quase tudo que reflete uma interação entre um sistema biológico e um potencial perigo, que pode ser físico, químico ou biológico (WHO, 1993). Um biomarcador é definido como uma alteração de uma resposta

biológica (desde a molecular através respostas celulares e fisiológicas comportamentais alterações) que pode estar relacionado à exposição a um tóxico ou efeitos de substâncias químicas ambientais (PEAKALL, 1994).

Os biomarcadores podem servir a vários propósitos: a função de controle para verificar a eficácia de redução de risco a um determinado contaminante ao qual o organismo está exposto, a função de sinal ou alarme para detectar mudanças súbitas no ambiente, a função de tendência que permita a previsão da evolução futura e a função de instrumento para o reconhecimento e clarificação dos processos subjacentes (R. Van der Oost et al, 2003). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (1993), os biomarcadores podem ser subdivididos em três classes:

I) Biomarcadores de exposição: abrange a detecção e medição de uma substância exógena, o seu metabólito ou o produto de uma interação entre um agente xenobiótico e alguma molécula ou célula-alvo que é medido em um determinado nível de organização biológica. Na avaliação da exposição, a distinção é feita entre a dose externa, definida como a quantidade de um agente químico que o organismo está em contato com o meio ambiente como determinado pelo MQ, e a dose interna, que é a quantidade total de um agente químico absorvido pelo organismo ao longo de um período de tempo determinado pelo monitoramento biológico. Marcadores de bioacumulação e biomarcadores de exposição irão refletir a distribuição das substâncias químicas ou seus metabólitos, respectivamente, por todo o organismo. Teoricamente, essa distribuição pode ser rastreada através de vários níveis biológicos (por exemplo, células, tecidos, etc) até o seu destino final (OMS, 1993). Quando lançado no meio ambiente estas substâncias podem estar sujeitas a processos de transporte e transformação. A distribuição de contaminantes em diferentes níveis

tróficos na teia alimentar pode fornecer um meio de determinar a estrutura das comunidades aquáticas (RUSSELL et al., 1999). Segundo as definições dadas por Van Gestel e Van Brummelen (1994), no entanto, os encargos do corpo não são considerados bioindicadores e biomarcadores desde eles não fornecem informações sobre os desvios em relação a "saúde".

II) Biomarcadores de efeito: incluem respostas bioquímicas mensuráveis, alterações fisiológicas ou dentro dos tecidos e/ou fluidos corporais de um organismo que possa ser reconhecido como associados a uma saúde já estabelecida ou possíveis deficiências. Podem ser usados para qualquer documentação de alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde devido à exposição externa e da absorção de um produto químico.

III) Biomarcadores de suscetibilidade: indica a habilidade adquirida ou inerente de um organismo para responder aos desafios de exposição a uma substância específica, incluindo fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo para essa exposição. Ajudam a elucidar as variações no grau de resposta à exposição à substâncias tóxicas observadas entre diferentes indivíduos.

Bons biomarcadores são índices sensíveis tanto de biodisponibilidade de poluentes quanto do início de respostas biológicas. Em geral, respostas de biomarcadores são consideradas intermediárias entre as fontes de poluentes e os efeitos de nível superior (SUTER, 1990). Quando essas respostas compensatórias são ativadas, o potencial de sobrevivência do organismo começa a diminuir porque a capacidade do organismo para montar respostas compensatórias ambientais para novos desafios pode ter sido comprometida (DEPLEDGE; FOSSI, 1994). A razão mais atraente para o uso de biomarcadores é que eles podem dar informações sobre os efeitos biológicos de

poluentes, em vez de uma mera quantificação dos níveis ambientais. Biomarcadores podem contribuir para esclarecer os mecanismos potenciais de efeitos de contaminantes. Pela seleção de respostas de múltiplos biomarcadores, informações importantes serão obtidas acerca de exposição do organismo a tóxicos e estresse. A presença de poluentes normalmente provoca uma cascata de fatores biológicos respostas, cada uma das quais pode, em tese, servir como um biomarcador (McCARTHY et al., 1991). Acima de certo limite (em dose do tóxico ou tempo de exposição), o sinal de biomarcadores de poluentes responsivos desvia da faixa normal em uma situação átona, finalmente levando à manifestação de uma situação de efeito múltiplo em níveis hierárquicos superiores de organização biológica (McCARTHY et al., 1991). Neste caso, seria imprópria a aplicação ou interpretação das respostas do biomarcador, porque poderia levar a conclusão falsa quanto ao estresse ao poluente ou da qualidade ambiental. Algumas respostas estabelecidas para uma espécie não são necessariamente válidas para outras espécies. Além disso, os dados ecotoxicológicos obtidos em estudos de laboratório avaliam os efeitos potenciais de uma substância, sendo difícil de extrapolar para o campo, uma vez que no ambiente há uma mistura de substâncias além de fatores físicos e químicos que alteram constantemente as características de disponibilidade de cada contaminante (Ectoc, 1993). Uma vez que ambas, superestimação e subestimação, são avaliadas em laboratório, os biomarcadores devem sempre ser validados com a investigação no campo. Biomarcadores aplicados em laboratório e no campo podem fornecer uma ligação importante entre toxicidade laboratorial e avaliação de campo. Para amostras de campo, dados de biomarcadores podem fornecer um importante índice da carga total externa que é biologicamente disponível em exposição no "mundo real".

1.3.1 Biomarcadores Bioquímicos

As respostas bioquímicas podem refletir o potencial de contaminantes sobre a alteração dos processos fisiológicos nos organismos expostos (McCARTHY; SHUGART, 1990). Em geral, os fenômenos são mais universais em um nível celular do que em níveis mais altos da organização biológica, assim respostas bioquímicas podem ser similares em uma grande variedade de organismos.

A toxicidade de um composto pode ser alterada pelo seu metabolismo, que pode ser benéfico (desintoxicação) ou nocivo (bioativação) para um organismo. Os efeitos tóxicos podem se manifestar quando o composto original ou os seus metabolitos se ligam a macromoléculas celulares, que podem levar ao rompimento da membrana e danos celulares. Os biomarcadores de efeito mais sensíveis são, geralmente, alterações nos níveis de enzimas. As enzimas podem ser induzida ou inibida após a exposição a xenobióticos (BUCHELI; FENT, 1995). A indução da enzima é um aumento na quantidade ou na atividade destas enzimas ou de ambos. A inibição é o oposto de indução; neste caso, a atividade enzimática é bloqueada, possivelmente devido a uma formação forte ligação ou complexas entre a enzima e os inibidores.

1.3.2 Biomarcadores Genéticos

A exposição do organismo a substâncias químicas genotóxicas podem induzir a uma cascata de eventos (SHUGART et al., 1992): formação de alterações estruturais no DNA, danos no DNA e posterior expressão do gene mutante e as doenças (câncer) decorrentes de danos genéticos. A detecção e quantificação de vários eventos nesta sequência podem ser empregadas como biomarcadores de exposição ou de efeitos. A ecotoxicologia genética pode ser definida como o estudo das alterações induzidas pelo poluente no material genético da biota na natureza e tem dois aspectos: inicialmente, a

genotoxicidade de poluentes, tais como alterações estruturais do DNA, e conseqüentemente, expressão de danos ao DNA de produtos do gene mutante, resultando em efeitos, em longo prazo, hereditárias, tais como mudanças na frequência dos genes dentro das populações expostas, eventos mutacionais, etc (SHUGART, 1996). Uma abordagem mais geral envolve a detecção de quebras no DNA que são produzidos, diretamente pelo produto químico tóxico (ou seus metabólitos) ou pelo tratamento de danos estruturais (SHUGART et al., 1992). A consequência de perturbações estruturais para a molécula de DNA, como adutos e alterações secundárias, pode resultar em lesões que se tornam permanentes. As células afetadas frequentemente apresentam função alterada. Ensaio citogénéticos, como padrão de análise de cromossomos, troca de cromátides-irmãs (SCE), e anormalidades nucleares em eritrócitos (ENA), são indicadores sensíveis inespecíficos de danos mutagênicos, que têm se mostrado promissora nos resultados em experimentos de laboratório. O teste do micronúcleo é menos sensível que os ensaios anteriores, mas revelam conseqüências de ambas as anomalias cromossômicas do fuso e quebra, e tem sido aplicado aos peixes selvagens. As detecções de alterações estruturais de DNA e eventos subsequentes têm sido demonstradas e documentadas como uma alternativa viável ferramenta científica na MB “*in situ*” da genotoxicidade de produtos químicos.

Atualmente, uma das metodologias utilizadas para avaliar danos causados por contaminantes nos organismos é o teste do micronúcleo (MN), inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos (SCHIMID, 1976). Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal)

requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito. (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003). O micronúcleo e as anormalidades nucleares são frequentemente observados em eritrócitos de peixes. Carrasco et al. (1990), descreveu tais núcleos anormais como sendo lobados, segmentados ou em forma de rim. Outros pesquisadores também têm relatado anormalidades nucleares, mas simplesmente as classificam como "danos genotóxicos" (BOMBAIL et al, 2001;. AYYLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000; PACHECCO e SANTOS, 1998).

1.3.3 Biomarcadores Fisiológicos e Morfológicos

Ao contrário da maioria dos parâmetros bioquímicos, os parâmetros fisiológicos e morfológicos são respostas acima das interações químicas, sendo geralmente indicativos de danos reversíveis e/ou irreversíveis (HINTON et al., 1992). A medida real de efeitos adversos ou das consequências de efeitos fisiológicos pode ser realizada por meio de exame histopatológico, através da investigação de lesões, alterações ou formação de tumores (neoplasias).

A viabilidade da utilização de parâmetros histopatológicos como biomarcador de poluição aquática foi avaliada por Hinton et al. (1992), Hinton, (1994). É geralmente aceito que os biomarcadores histopatológicos são úteis como indicadores do estado geral de saúde e espelho dos efeitos da exposição a uma variedade de poluentes antropogênicos (HINTON et al., 1992; VETHAAK e RHEINALLT, 1992; AKAISHI et. al., 2004; OLIVEIRA-RIBEIRO et. al., 2002a, 2002b, 2005). Mudanças agudas são vistas quando os níveis de contaminantes são suficientemente elevados, enquanto a exposição crônica é necessária para determinar aspectos subletais de mudança. Muitas alterações podem persistir mesmo após a exposição a uma substância tóxica. As respostas são relativamente fáceis de serem reconhecidas, desde que se tenha uma

referência adequada e controle de dados disponíveis e fornecem informações suficientes em mãos para montar abordagens de biomarcador celular ou histopatológicos e aplicá-los em estudos de campo integrado (HINTON, 1994).

As características histopatológicas de órgãos alvos específicos podem expressar as condições dos ambientes e representar o tempo que os organismos estão expostos a tais condições (SCHMALZ et al., 2002) funcionando assim, como uma resposta a estressores subletais através de um método rápido para avaliação do comprometimento de tecidos e órgãos de organismos expostos a agentes químicos estressores (Johnson et al., 1993).

Recentemente, muito esforço tem sido dedicado para identificar sinais de alerta precoce referente às respostas biológicas adversas às diferentes atividades antrópicas de forma a refletir o grau de contaminação do meio ambiente. As alterações de salinidade, a elevada insolação e, geralmente, baixos níveis de oxigênio podem influenciar na biodisponibilidade dos contaminantes e sua toxicidade em diferentes períodos do ano. Além das análises químicas de água e sedimento, a utilização integrada de biomarcadores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, celulares e genéticos podem fornecer dados mais precisos sobre os efeitos tóxicos dos contaminantes na biota aquática e possibilitar a aplicação precoce de medidas para a preservação do ambiente e dos organismos que nele vivem (LACERDA, 2009). A utilização de peixes como ferramenta para a avaliação da qualidade ambiental, tem sido cada vez mais frequente por sua relevância ecológica, abundância, fácil coleta e importância econômica (COIMBRA, 2003; PHILLIPS, 1991).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a contaminação por metais em dois estuários do litoral do Espírito Santo e seus efeitos sobre o peixe *C. Parallelus*. A integração dos resultados dos biomarcadores e metais visa estabelecer uma interpretação sinóptica da exposição e dos efeitos desses contaminantes em diferentes níveis de organização biológica.

Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar espécimens jovens de *C. Parallelus* utilizando biomarcadores genéticos : fisiológicos e morfológicos como indicadores de exposição a poluentes nos estuários dos rios Piraque-açu e Santa Maria, ES.

- Avaliar a concentração de metais em *C. parallelus* a fim de identificar relações entre os níveis de contaminação e as respostas adquiridas pela utilização dos biomarcadores;

- Avaliar diferenças sazonais em relação à concentração de metais e às respostas dos biomarcadores nos distintos locais de estudo;

- Avaliar a utilização de estudos com biomarcadores em peixes como indicadores de biodisponibilidade e efeito de contaminantes em programas de diagnóstico ambiental.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

Os manguezais do Estado do Espírito Santo ocupam uma área aproximada de 70 km², sendo as florestas mais extensas encontradas no entorno da Baía de Vitória e nos estuários dos rios Piraque-açu e Piraque-mirim. No passado, quase toda extensão da Baía de Vitória era ocupada pelo manguezal, contudo, ao longo destas décadas, a influência antrópica tem levado a uma considerável diminuição da área de manguezal do entorno da ilha de Vitória (VALE & FERREIRA, 1998). Diversas redes de esgoto e galerias pluviais contribuem para o aumento nos níveis de poluição.

O sistema estuarino da Baía de Vitória – ES (20° 19'S e 40° 20'W) é bastante complexo, recebendo diversas contribuições dulcícolas dos rios Santa Maria da Vitória, rio Bubu, rio Aribiri, rio Marinho e rio Itanguá, que compõe a chamada Baía de Vitória, e contribuições marinhas da Baía do Espírito Santo, onde em sua margem esquerda está a Praia de Camburi. Ao longo destas décadas, o sistema estuarino tem sofrido uma forte degradação ambiental, por ocupação populacional de seu entorno, e consequentemente aumento dos despejos industriais, comerciais e domésticos, que têm certamente aumentado o teor de metais na biota e nos sedimentos (JESUS, 2004).

O município de Aracruz localizado na porção norte do litoral Espírito Santense, a 83 km da capital Vitória, possui uma área territorial de 1.427 km², dividido politicamente em cinco distritos, destaca-se o de Santa Cruz, que possui importância turística, ambiental e cultural com presença de comunidades indígenas.

Em Santa Cruz, as águas do Rio Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim encontra-se com as águas do mar, formando um complexo estuarino, margeado por uma extensa área de

manguezal e com uma rica biodiversidade (19° 58'S e 40° 07'W). O Rio Piraquê-Açu (braço norte) é a principal fonte de abastecimento de água para a região e dele dependem cerca de 140.000 pessoas (BARROSO, 2004), possuindo uma área de drenagem de 379 Km². Já o rio Piraquê-Mirim (braço sul) possui uma pequena bacia de drenagem (69 Km²) e tem características físico-químicas relativamente estáveis, gerando padrões pouco estratificados (BARROSO, 2004). No entanto, o estuário é bem preservado em comparação ao da Baía de Vitória, o que permite utilizá-lo como referência na avaliação do impacto antrópico (JESUS, 2004).

A Georeferência de áreas monitoradas (Figura 1) foi obtida durante a amostragem em campo usando um GPS de mão 368 (Garmin Vista, EUA), utilizando pelo menos cinco satélites com uma precisão de 50-10 m. A Figura 1 apresenta a área de estudo no litoral do Espírito Santo.

3.2 Material biológico

Neste estudo foram utilizados indivíduos jovens de robalo peva, *Centropomus paralellus*, espécie nativa de grande importância na área de estudo.

3.2.1. *Centropomus paralellus*. Características da espécie.

O Robalo peva ou peba (*Centropomus parallelus*, Poey 1960) é um peixe ósseo da família Centropomidae, que segundo Greenwood (1976 apud RIVAS, 1986, p.579) está dividida em duas subfamílias, *Latinae* composta dos gêneros *Lates* e *Prammoperce* e *Centropominae* composta apenas pelo gênero *Centropomus*. As espécies do gênero *Centropomus* são estenotérmicas e estão restritas às regiões tropicais e subtropicais das Américas (RIVAS, 1962) sendo encontradas na região costeira, geralmente em águas

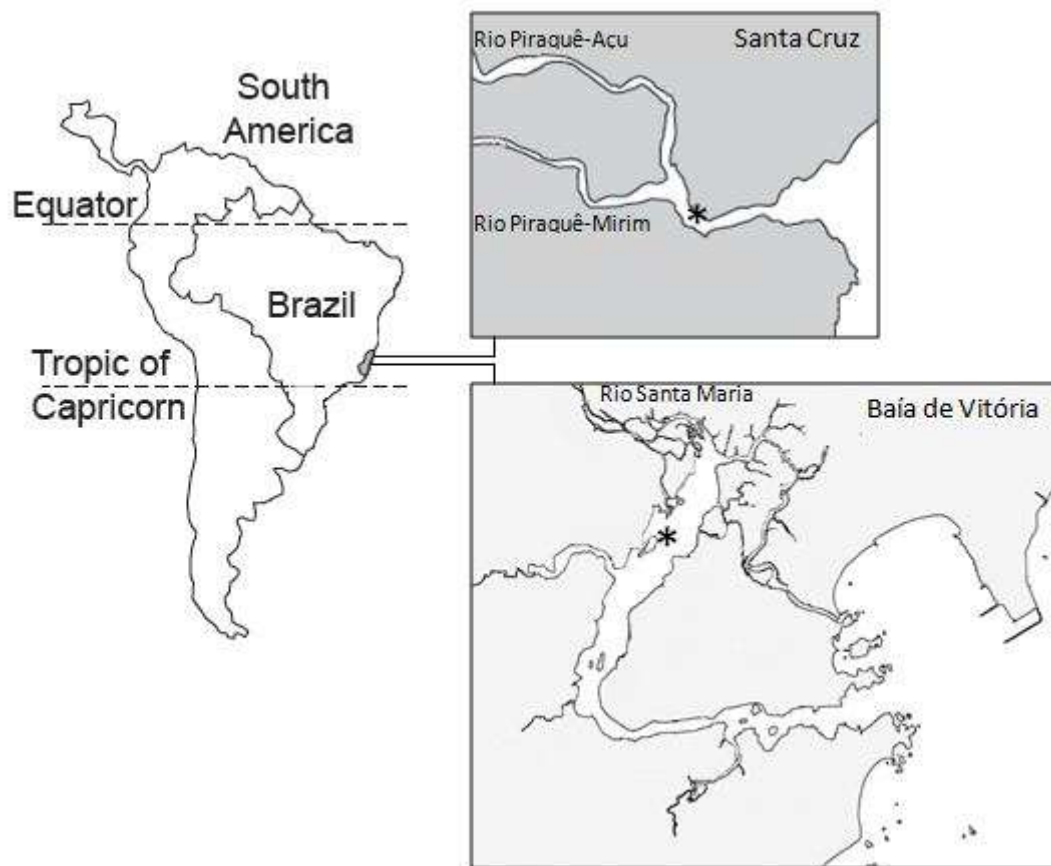


Figura 1 Localização dos sistemas costeiros monitorados – Baía de Vitória (S 20° 14' 31,5" e W 40° 19' 84,7") e Santa Cruz (S 19° 56' 26,2" e W 40° 12' 87"). O asterisco indica o local de coleta das amostras bióticas e abióticas nos dois períodos de coleta.

quentes (em torno de 24 °C) (Rivas 1986; Shafland e Foote, 1983). Caracterizam-se também por serem eurialinos, estando presentes no mar e em águas continentais, geralmente nas águas salobras de ambientes estuarinos, onde são encontrados em maior número (CHÁVES, 1961; PÉREZ-PINZON, 1991).

Marshall (1958) e Gilmore et al. (1983), observaram que a distribuição das espécies da família coincide aproximadamente com a distribuição dos ecossistemas de mangue, seu principal habitat. Os peixes desta família também podem ser encontrados

nas praias, bocas de rios, recifes costeiros, pântanos salgados, córregos de gramíneas e lagos.

A distribuição do robalo peba (*Centropomus parallelus*) vai desde o sul da Flórida (EUA) até Florianópolis, sul do Brasil (Figura 2). A espécie é encontrada com frequência em estuários, rios e águas tropicais costeiras do oeste do Atlântico (GILMORE et al., 1983; RIVAS, 1986; MARTIN,1991; KING, 1995). Segundo Cháves (1963) a espécie não alcança comprimentos maiores que 600 milímetros e os machos sempre chegam à maturação sexual em tamanhos menores do que as fêmeas. O robalo peba caracteriza-se por um corpo alongado, comprimido, com o dorso convexo acentuado e suave concavidade abaixo dos olhos, grande boca, dentes pequenos aciculares nas maxilas, vômer e palatinos. A espécie tem regime carnívoro, sendo crustáceos pelos indivíduos juvenis e peixes pelos indivíduos adultos os elementos mais importantes na sua alimentação (CHÁVES, 1963; CARTER et al,1973; AUSTIN, 1971; McMICHAEL et al., 1989; TEIXEIRA, 1997; CARVAJAL, 1975). Segundo Muller (2000), a transição de alimentação de crustáceos para peixes ocorre nos comprimentos a partir de 45 mm. Em estudos de marcação e recaptura foi constatado que o robalo não realiza grandes ciclos migratórios, que é um peixe com crescimento relativo rápido e que desovam um grande número de ovos nas águas salobras durante o fim da primavera e começo do verão (VOLPE, 1959). Os juvenis de robalo demonstram preferência pela água doce e sobrevivem em águas com menores níveis de oxigênio do que os adultos, sendo encontrados à montante dos rios em todas as épocas do ano (AGER et al., 1976; PETERSON; GILMORE, 1991). Seu habitat primário ou berçário tem sido descrito como córregos rasos e quentes ou canais de drenagem, com baixa corrente e fundos não vegetados ou beirando o manguezal (McMICHAEL et al., 1989; FORE e SCHMIDT, 1973). À medida que se desenvolvem, movem-se dos habitats de águas rasas para os

estuários, manguezais e águas mais profundas (TUCKER; CAMPBELL, 1988). Robalos adultos parecem ser menos sensíveis às baixas temperaturas do que os estágios larvais ou juvenis (SHAFLAND; FOOTE, 1983). Segundo Vazzoler (1995), a proporção sexual varia ao longo do ciclo de vida em função de eventos que atuam de modos distintos sobre os indivíduos de cada sexo. Os robalos são organismos hermafroditas protândricos (TAYLOR et al. 2000), assim espera-se encontrar uma proporção maior de indivíduos machos nas primeiras etapas de vida, nos tamanhos menores, e com o crescimento e desenvolvimento dos organismos a proporção de fêmeas aumenta nas classes de tamanhos maiores. De acordo com Rodrigues (2005), a proporção sexual é favorável aos machos nos comprimentos até 24 cm e favorável às fêmeas a partir de 30 cm, sendo que o comprimento total de primeira maturação sexual do robalo peba é de 280 mm.

3.2.2. Coleta de peixes e amostras biológicas.

Dez exemplares jovens de *C. Parallelus* (Poey, 1860) (Figura 2) com comprimento médio de 15 ± 5 cm e peso médio de $150 \text{ g} \pm 30 \text{ g}$ foram coletados, com auxílio de anzol, na Baía de Vitória e em Santa Cruz em períodos distintos (inverno de 2009 e verão de 2010) (Figura 1).

Após a coleta dos animais, o sangue foi retirado por punção caudal para análise de anomalias nucleares e posteriormente os animais foram mortos por secção medular. As brânquias foram removidas para o estudo de alterações histopatológicas, atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (NKA) e quantificação das células cloreto. As amostras de músculo branco foram dissecadas e congeladas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para a análise de concentração de metais.



Figura 2. Exemplar de robalo peva (*Centropomus parallelus*).

3.3 Análises Físicas e Químicas

As amostras de água e sedimento foram coletadas durante todo o experimento simultâneo com a coleta de amostras de peixes. Todos os recipientes utilizados para análise foram deixados em solução de ácido sulfúrico e nítrico 01:02 v / v HNO₃ (63%), H₂SO₄ (98%) (Merck Química Argentina), durante a noite e depois lavadas com água ultra-pura. A água ultrapura foi obtida através de um sistema de purificação de água que consiste em um conjunto de filtração através de carvão ativado, osmose reversa e troca iônica, com UV de desinfecção e de membrana (0,45 mm) de filtração (611 Arium sistema UV, Sartorius, Alemanha).

Amostras de água para análise de metais foram coletados em garrafas de plástico, aproximadamente 30 cm abaixo da superfície da água do rio. As amostras de sedimento (aproximadamente intervalo de 0-10 cm de profundidade) foram coletadas

de cada local, usando uma colher de plástico. Amostras de sedimento foram rapidamente transferidos para recipientes de plástico de 1Kg (sem espaço) para análises de metais. Tanto as amostras de água como as de sedimento foram transportadas sob refrigeração para o laboratório, onde amostras de água foram acidificadas com HNO₃. As amostras (água e sedimentos) foram armazenadas a 4 ° C até sua análise.

Nas áreas de coleta, parâmetros como: oxigênio dissolvido (OD), salinidade, condutividade, pH e temperatura foram determinados por meio de sonda multiparâmetros YSI 85 previamente calibrada em laboratório. Foi retirado uma amostra de 1L (três réplicas) de água superficial para análise de metais. Estas amostras foram acidificadas, filtradas a vácuo utilizando uma membrana de nitrocelulose com 0,45 µm filtro e armazenadas em frascos de polietileno mantidos a 4°C até o momento da análise.

Foram coletadas amostras de sedimento (1 kg, 3 réplicas) em recipientes plásticos previamente limpos, para análise metais, matéria orgânica e extração de água intersticial. Para análise de metais, as amostras de sedimento foram secas em uma estufa de aço inoxidável, a 37,5 °C, até que se mantivesse um peso constante. O material seco foi triturado e peneirado em 4 malhas (2mm, 1mm, 120µm, 65µm), uma vez que muitos estudos têm demonstrado que as concentrações mais elevadas de metais ocorrem nas frações mais finas do sedimento. As frações mais finas compreendem os principais carreadores dos componentes naturais e antropogênicos a partir da coluna d'água. Nas frações silte e areia fina, as concentrações de metais decrescem, porque elas são predominantemente formadas por compostos de quartzo com baixos teores de metais (Jesus, 2004). Para a determinação da concentração de metais pesados e de elementos-traço foi utilizada somente a fração que passou pela malha mais fina a qual foi digerida

com ácido nítrico e clorídrico em microondas (Anton Paar 3000 Multiwave) (Figura 3). Controles foram preparados utilizando o mesmo protocolo sem sedimento (apenas reagentes).

Para determinação da matéria orgânica, inicialmente, pesou-se em triplicata 0,5 g de solo (seco) passado na peneira de malha 0,5 mm; em seguida, transferiu-se o solo para um frasco erlenmeyer de 500 mL. Adicionaram-se exatamente 5 mL de $K_2Cr_2O_7$ 1N e, rapidamente, 10 mL de H_2SO_4 concentrado; de imediato, agitou-se o frasco, para proporcionar a mistura do solo com os reagentes, por um período aproximado de 1 min; em seguida, a mistura foi deixada em repouso pelo tempo aproximado de 60 min. Então, adicionaram-se 100 mL de água destilada e 1,0 mL de indicador ferroína, seguido de titulação com Fe_2SO_4 0,5N até a passagem da cor verde para bordô (neste ponto, o excesso de dicromato é totalmente consumido pela reação). Paralelamente, o mesmo procedimento foi feito para a prova em branco, com exceção da introdução do solo. É importante salientar que não foi incluído, na determinação do CO, o fator de correção de 1,3 para corrigir a parcela não-oxidada do carbono orgânico do solo. Seguindo as sugestões de Nelson & Sommers (1982), o CO não foi convertido para matéria orgânica pelo fator de correção de 1,72. Os resultados do CO obtidos nas amostras de solo foram analisados em termos de matéria orgânica. O cálculo para a determinação do CO seguiu o método descrito por Walkey-Black (1934).

Para a extração de água intersticial, as amostras de sedimento foram centrifugadas a 3000 rpm por 40 minutos a 4°C. A fração líquida foi acondicionada em frascos de polietileno e acidificada com 1 mL de ácido nítrico PA adicionalmente purificado por destilação em aparelho próprio para destilação de ácidos (Sub-boiling

distillation, Berghof, Alemanha), sendo mantida refrigerada a 4°C até o momento da análise.



Figura 3. Microondas Anton Paar 3000 Multiwave.

3.3.1 Metais

Estas análises foram realizadas no Instituto Superior de Investigação, Desenvolvimento e Serviços em Alimentos e Ambiente (ISIDSA) sob coordenação do Prof. Dr. Daniel Wunderlin.

3.3.1.1 Materiais de Referência Certificados

Para o controle de qualidade dos procedimentos analíticos foram utilizados materiais de referência certificados marinhos que foram preparados pelo National Institute of Standards & Technology – NIST SRM 1548a – “Typical Diet” e pelo EnviroMAT - BE-1 140-025-011 – “Sewage Sludge”. Esses materiais foram analisados juntamente com as amostras em ambos os métodos, a fim de se avaliar a exatidão e precisão das análises.

3.3.1.2 Análise por Espectrômetro de massa com fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS)

No presente estudo, as análises de Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Hg e Pb nas amostras de água superficial, sedimento e água intersticial, foram realizadas utilizando espectrômetro de massa com fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS) (Agilent Technologies 7700 Series) de acordo com o método 200.8 descrito pela USEPA.

As amostras filtradas foram medidas em triplicada, por ICP-MS. Foram preparados fortificados para verificar as recuperações percentuais de diferentes elementos. Assim, uma amostra de 5 mL de água foi fortificada com quantidades variável de cada um dos elementos com soluções padrões. O restante do procedimento foi o mesmo utilizado para as amostras não adicionadas.

Fortificados e amostras certificadas foram analisadas para avaliar a porcentagem de recuperação de 90 a 110% percentuais. Diluições adequadas foram realizadas antes de medir os diferentes elementos. A repetibilidade das medições de absorção atômica era geralmente $\geq 97\%$ comparando os valores obtidos a partir de triplicatas (três medições em cada amostra triplicado ou amostra fortificada). A estabilidade do equipamento foi verificada através da medição da curva de calibração antes e após as medições das amostras. Soluções em branco, contendo apenas reagentes, foram usados para deduzir o conteúdo de metais resultantes de reagentes e instrumentos de laboratório.

Os estudos de recuperação também foram realizados para o sedimento através da adição soluções individuais (1 mg ou 10 mg de metais), que foram homogeneizadas antes da secagem. Amostras modificadas foram novamente tratadas e os sedimentos analisados para avaliar o percentual de recuperação, obtendo recuperações de 90 a 110% percentuais.

A curva de calibração foi preparada através de diluições das soluções estoques. Essa curva foi preparada a cada análise. A curva de calibração utilizada na análise e o branco analítico sofreram o mesmo processo de digestão das amostras e materiais de referência certificados.

3.3.2 Concentração metais em músculo de *C. parallelus*

As amostras de tecido de músculo de peixes foram homogeneizadas e secas em uma estufa de aço inoxidável, a 37,5 °C, até que se mantivesse um peso constante, e posteriormente digerido em microondas (Figura 3) com ácido nítrico e ácido clorídrico concentrado para a análise da concentração de metais. A concentração de metais (Al,

Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Hg e Pb) foram analisadas por ICP-MS pelo método 200.8 descrito pela USEPA, seguindo a mesma metodologia descrita para amostras de sedimento de água.

3.4 Análises Biológicas

3.4.1. Biomarcador Genético – *Micronúcleo e Anomalias nucleares*

Imediatamente após a colheita de sangue foi realizada extensão sanguínea e as lâminas foram fixadas com metanol, hidrolisadas com uma solução ácida 1N HCl por 11 minutos, à 60 °C e, posteriormente, coradas com Reativo de Schiff no escuro. As alterações nucleares e/ou células com micronúcleo foram registradas por meio de microscopia de luz. A presença de anomalias nucleares foi realizada seguindo o método descrito por Matsumoto *et al*, 2006.

3.4.2. Biomarcador Morfológico -*Histopatologia do tecido Branquial*

Amostras de brânquias foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em 0,1 M tampão fosfato pH 7,3 por 24 h e armazenadas em glutaraldeído 0,5% no mesmo tampão. As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol até etanol puro e incluídas em historesina (Leica). Posteriormente foram feitos cortes histológicos com 3 µm de espessura em micrótomo automático (Leica, RM-2155). As secções histológicas foram coradas com azul de toluidina.

As análises histopatológicas foram efetuadas de acordo com Cerqueira e Fernandes (2002). Em cada amostra foram analisados 10 campos aleatórios em filamentos distintos em microscópio de luz Olympus BX51, com aumento de 40x. As frequências de alterações histopatológicas no tecido branquial foram registradas e, a partir destas, foi calculado o Índice de Alteração Histopatológico (IAH). Cada alteração

histopatológica foi classificada em 3 estágios: estágio I, lesões não muito severas e que não afetam o funcionamento do órgão, reversíveis e pontuais; estágio II, lesões moderadamente severas e que podem afetar o funcionamento do órgão, podem ser irreversíveis, porém, no geral são pontuais; e estágio III, lesões muito severas e normalmente irreversíveis onde o funcionamento do órgão fica muito prejudicado. O IAH foi o resultado da somatória dos pesos dos diferentes estágios (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002).

3.4.3. Biomarcador Fisiológico

3.4.3.1. Atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (NKA)

Os filamentos branquiais foram separados, pesados e homogeneizados em tampão SEI (Sacarose-EDTAimidazol, pH 7,4). Em seguida, foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm (4 °C). O sobrenadante foi coletado para a determinação de proteína total utilizando o método Bradford (Kruger, 1994) e a albumina sérica bovina como padrão protéico. As concentrações foram determinadas em 595 nm em uma leitora de microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, INC.) utilizando-se uma curva padrão e os resultados foram expressos em g/L^{-1} .

A atividade específica da enzima NKA foi determinada em frações de homogenados centrifugado pelo método descrito por Quabius *et al.* (1997). A leitura foi feita em 595 nm em leitora de microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, INC.) e a atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{M Pi/mg proteínas/h}$.

3.4.3.2. Determinação da frequência de células-cloreto

Para determinar a frequência de células-cloreto nas brânquias foi utilizado o método de imunohistoquímica específica para a enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. As amostras

de brânquias foram fixadas em Bouin durante 24 horas, desidratadas em séries graduais de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram montados em lâminas histológicas e a parafina foi removida por meio de banhos consecutivos de xilol. Após hidratação, a imunohistoquímica da célula cloreto da brânquia foi realizada de acordo com metodologia descrita por Dang *et al.*, 2000. Os cortes branquiais serão submetidos à uma reação imunohistoquímica indireta para localização da Na⁺/K⁺-ATPase. Para tanto foi utilizado como primeiro anticorpo: alfa 5 (anti-Na⁺-K⁺-ATPase Ig) e como segundo anticorpo o GAM (goat antimouse IgG), ambos conjugados com peroxidase. Como corante foi usado DAB (diaminobenzidina). A quantificação e localização das células cloreto foi feita utilizando-se um microscópio Olympus BX, acoplado a um sistema de análise de imagem, e o software Motic.

3.5 Análise Estatística

Os dados também foram avaliados empregando-se o método de Análise de Componentes Principais (PCA) como procedimento de extração a fim de explorar a distribuição das variáveis. O conjunto de dados originais considerou parâmetros químicos e biológicos. A Análise de Fatores (AF) foi realizada a partir de uma matriz de correlação, na qual as variáveis foram auto-escaladas empregando o procedimento *varimax normalized*.

Todas as análises foram realizadas utilizando a opção MULTIVARIATE EXPLORATORY TECHNIQUES seguido pela Análise de Fatores do software STATISTICA® (Stat Soft, Inc. 2001; versão 6). Foram extraídos os fatores principais utilizando-se o critério de Kaiser, no qual são considerados os autovalores (*eigenvalues*) acima de 1. O nível de corte para selecionar as variáveis incluídas nestes fatores

(loadings) foi de 0,35; conforme proposto por Tabachinic & Fidell (1996).

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos dos parâmetros químicos, físicos e biológicos estão apresentados separadamente e, em seguida é apresentada uma avaliação integrada dos resultados.

4.1. Variáveis Físicas e Químicas da água e sedimento

O teor de oxigênio dissolvido (OD) e a salinidade foram significativamente maiores na estação referência em Santa Cruz quando comparada com a Baía de Vitória e não houve diferença significativa entre as coletas de verão e inverno para as estações monitoradas (Tabela 1). A porcentagem de matéria orgânica foi significativamente maior na Baía de Vitória, quando comparada à estação referência em Santa Cruz e também não houve diferença significativa entre as coletas de verão e inverno. Os resultados das análises de metais na água superficial, água intersticial e sedimento durante o inverno e verão nos dois estuários monitorados são mostrados na Tabela 2.

4.2. Variáveis biológicas

4.2.2. Concentração metais em músculo de *C. parallelus*

Os resultados referentes às concentrações de metais em músculo de *C. parallelus* no verão e inverno nos dois estuários estão mostrados na Tabela 3.

4.2.2. Biomarcadores Genéticos

4.2.2.1. Determinação da frequência de micronúcleo

A frequência de micronúcleo quantificada nos eritrócitos de *C. parallelus* está apresentada na Figura 4 e 5. Não foi observada diferença significativa entre os locais de estudo nos dois períodos de amostragem (Tabela 4).

Tabela 1 Parâmetros físico e químicos avaliados na água superficial nos estuários de Santa Cruz e Baía de Vitória no inverno e verão.

	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Salinidade	Condutividade (mS)	Matéria Orgânica	pH	Temperatura (°C)
<i>Inverno</i>						
Santa Cruz	4,82	24,8	39,65	16,34	7,49	26,00
Baía de Vitória	1,25	16,8	28,10	23,45	6,83	25,40
<i>Verão</i>						
Santa Cruz	4,72	27,00	43,20	16,63	7,20	25,50
Baía de Vitória	1,24	17,00	28,20	24,65	6,50	25,20

4.2.2.2. Determinação da frequência de anomalias nucleares

As anomalias nucleares, que configura danos genotóxicos, quantificadas nos eritrócitos de *C. parallelus* estão apresentadas na Figura 6 e 7. Para a coleta de verão, quando comparado com amostras de Santa Cruz, Baía de Vitória apresenta valores significativamente maiores. Considerando a diferença sazonal, foi possível observar valores significativamente maiores no verão da Baía de Vitória quando comparados com os dados de inverno. As análises dos dados de Santa Cruz não mostraram diferença significativa entre as coletas de verão e inverno (Tabela 4).

Tabela 2. Concentração de metais medidos em água superficial (mg/L), intersticial (mg/L) e sedimento (ug/g de massa seca) nos estuários Santa Cruz e Baía de Vitória, no inverno e verão. Valores expressos em médias ± desvio padrão: sedimentos correspondem a fração <63µm. LDI (abaixo limite de identificação). LDQ (abaixo limite de quantificação): Fe, Zn, As, Se e Hg 0,15 ug/L; Al, Cr e Ni 0,03 ug/L; Mn, Cu, Ag, Cd e Pb 0,015 ug/L.

	Al	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Se	Ag	Cd	Hg	Pb
Água Superficial (mg/L)													
<i>Inverno</i>													
Santa Cruz	38,0 ± 4,3	<LDI	10,3 ± 1,0	149,6 ± 0,8	<LDI	<LDI	<LDI	<LDI	<LDI	47,6 ± 4,5	<LDI	<LDI	19,8 ± 0,8
Baía de vitória	138,9 ± 3,7	<LDQ	57,8 ± 4,9	354,9 ± 8,0	34,9 ± 1,5	16,6 ± 0,6	27,9 ± 28,6	<LDI	<LDI	13,1 ± 3,4	<LDI	<LDI	11,0 ± 0,8
<i>Verão</i>													
Santa Cruz	106,5 ± 33,9	<LDI	20,4 ± 0,3	132,3 ± 156,0	<LDI	<LDI	<LDI	<LDI	<LDI	58,1 ± 18,1	<LDQ	<LDI	12,8 ± 2,2
Baía de vitória	92,6 ± 8,0	50,3 ± 0,9	69,0 ± 0,6	320,4 ± 2,8	66,7 ± 1,8	22,7 ± 1,3	358,4 6,9	<LDI	<LDQ	<LDI	<LDI	<LDI	7,5 ± 1,0
Água Intersticial (mg/L)													
<i>Inverno</i>													
Santa Cruz	3446,0 ± 733,4	<LDQ	1210,9 ± 260,4	14084,7 ± 4010,1	12,9 ± 20,6	7,9 ± 12,6	<LDI	<LDI	7,0 ± 17,0	<LDI	<LDI	<LDI	<LDI
Baía de vitória	7560,4 ± 3516,5	8,7 ± 8,0	147,4 ± 136,3	13579,7 ± 3687,4	<LDI	3,0 ± 3,4	<LDI	<LDI	8,7 ± 21,2	6,1 ± 9,4	<LDI	2,2 ± 3,5	<LDI
<i>Verão</i>													
Santa Cruz	2351,8 ± 539,6	<LDQ	2308,0 ± 835,5	13190,8 ± 2665,5	<LDI	<LDI	<LDI	<LDI	6,4 ± 15,6	<LDI	<LDI	<LDI	<LDI
Baía de vitória	5268,4 ± 717,1	2,7 ± 4,2	218,2 ± 115,5	10814,2 ± 1130,5	4,5 ± 7,0	5,5 ± 6,9	<LDI	<LDI	8,8 ± 21,5	<LDI	<LDI	<LDI	<LDI
Sedimento (ug/g de massa seca)													
<i>Inverno</i>													
Santa Cruz	29986,1 ± 1854,0	28,1 ± 1,5	90,3 ± 11,4	20697,6 ± 2184,9	8,7 ± 1,2	3,7 ± 0,2	<LDI	8,8 ± 1,8	<LDQ	<LDI	<LDI	<LDI	29986,1 ± 1854,0
Baía de vitória	22642,8 ± 970,8	42,6 ± 28,1	57,4 ± 7,5	24360,4 ± 4336,1	11,0 ± 6,7	4,3 ± 0,8	<LDI	5,9 ± 1,4	<LDQ	<LDI	<LDI	<LDI	22642,8 ± 970,8
<i>Verão</i>													
Santa Cruz	29970,6 ± 1146,9	28,4 ± 1,4	78,4 ± 11,0	20759,3 ± 1509,5	7,5 ± 0,4	7,8 ± 13,4	<LDI	8,3 ± 1,0	<LDQ	<LDI	<LDI	<LDI	29970,6 ± 1146,9
Baía de vitória	22297,2 ± 1622,2	24,8 ± 3,4	53,1 ± 8,4	27413,7 ± 3114,7	6,9 ± 0,8	4,3 ± 0,4	<LDI	6,2 ± 0,6	<LDQ	<LDI	<LDI	<LDI	22297,2 ± 1622,2

Tabela 3. Concentração de metais medidos em músculo *C. parallelus* (ug/g de massa seca) nos estuários Santa Cruz e Baía de Vitória, no inverno e verão. Valores expressos em médias ± desvio padrão. LDI (abaixo limite de identificação). LDQ (abaixo limite de quantificação): Fe, Zn, As, Se e Hg 0,15 ug/L; Al, Cr e Ni 0,03 ug/L; Mn, Cu, Ag, Cd e Pb 0,015 ug/L.

	Al	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Se	Ag	Cd	Hg	Pb
<i>C. Parallelus</i> (ug/g de massa seca no músculo)													
<i>Inverno</i>													
Santa Cruz	3,9 ± 0,8	0,1 ± 0,0	0,8 ± 0,0	8,3 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	12,4 ± 0,9	0,7 ± 0,5	0,2 ± 0,0	<LDQ	<LDQ	0,2 ± 0,0	3,9 ± 0,8
Baía de vitória	4,0 ± 0,7	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,0	6,8 ± 1,0	<LDQ	0,7 ± 0,1	14,4 ± 0,4	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	<LDQ	<LDI	0,3 ± 0,0	4,0 ± 0,7
<i>Verão</i>													
Santa Cruz	2,8 ± 0,4	0,1 ± 0,0	0,9 ± 0,0	7,8 ± 0,6	<LDQ	0,7 ± 0,0	14,1 ± 0,8	0,8 ± 0,5	0,3 ± 0,1	<LDQ	<LDI	0,2 ± 0,1	2,8 ± 0,4
Baía de vitória	1,4 ± 0,5	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	5,0 ± 0,3	<LDQ	0,6 ± 0,1	12,0 ± 0,9	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,2	<LDQ	<LDI	0,2 ± 0,0	1,4 ± 0,5

Tabela 4. Valores médios \pm desvio padrão dos biomarcadores nos estuários de Santa Cruz de Baía de Vitória na coleta de Verão e Inverno. Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

	Genotoxicidade (Frequência %)	Mutagenicidade (Frequência %)	Índice de alterações histopatológicas	Células Cloreto (Frequência/mm^{2e r} no filamento)	Atividade da Na⁺/K⁺- ATPase (μMPI/mgPt/h)
<i>Inverno</i>					
Santa Cruz	4,04 (2,29) a	0,08 (0,12) a	2,22 (2,54) a	1164,70 (477,42) a	0,45 (0,23) a
Baía de Vitória	1,70 (0,91) a	0,03 (0,04) a	7,20 (6,06) b	1018,11 (280,37) a	0,59 (0,39) ab
<i>Verão</i>					
Santa Cruz	3,01 (1,56) b	0,01 (0,01) a	11,90 (7,07) c	951,30 (367,68) a	0,63 (0,25) ab
Baía de Vitória	6,14 (2,81) c	0,03 (0,03) a	8,29 (5,52) b	1469,23 (195,12) a	0,97 (0,50) b

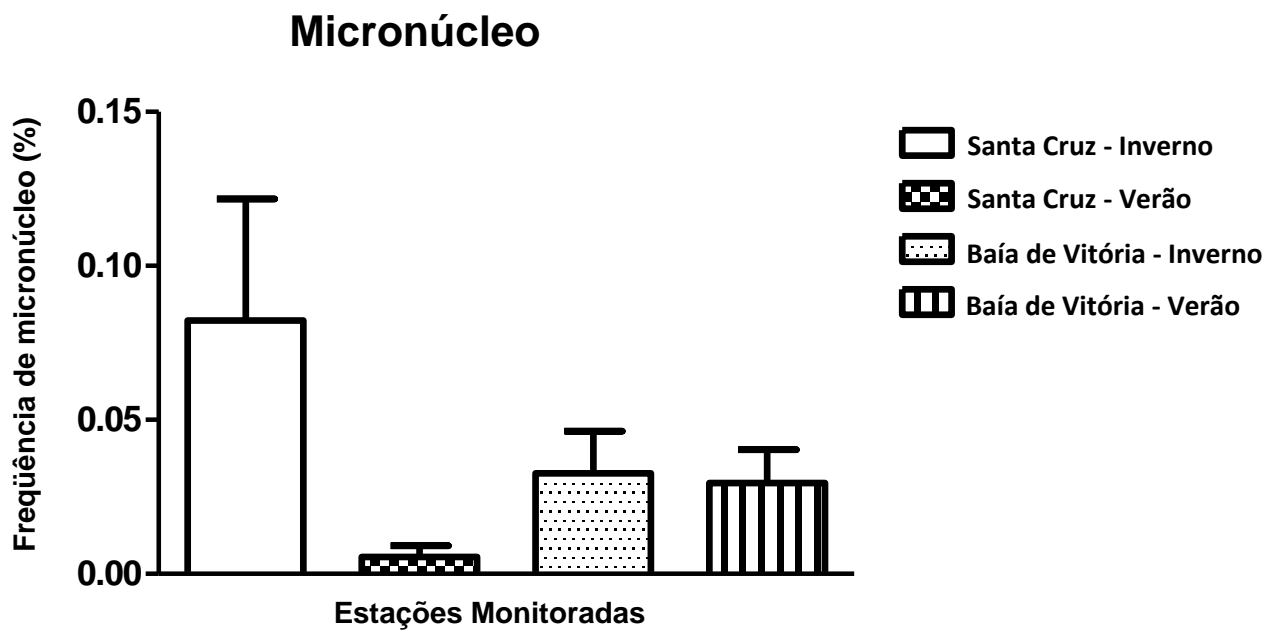


Figura 4. Frequência de micronúcleos em eritrócitos de *C. parallelus*.

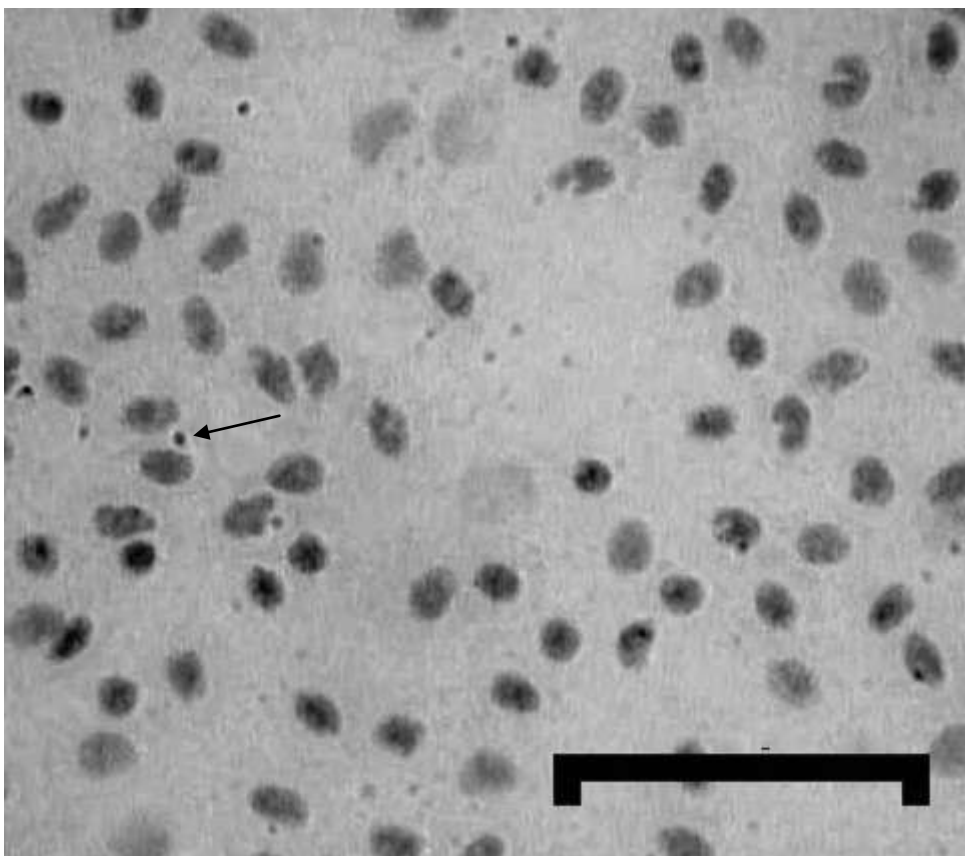


Figura 5. Eritrócitos de *C. parallelus*. A seta indica um micronúcleo. Barra = 20 μ m

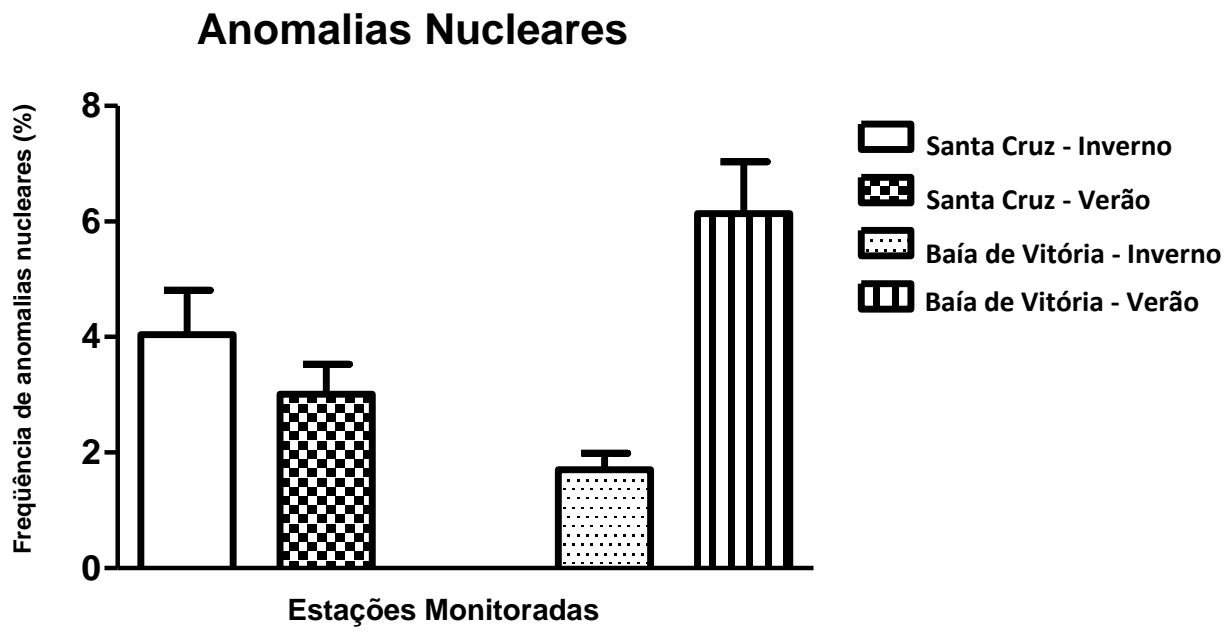


Figura 6. Frequência de anomalias nucleares em eritrócitos de *C. parallelus*.

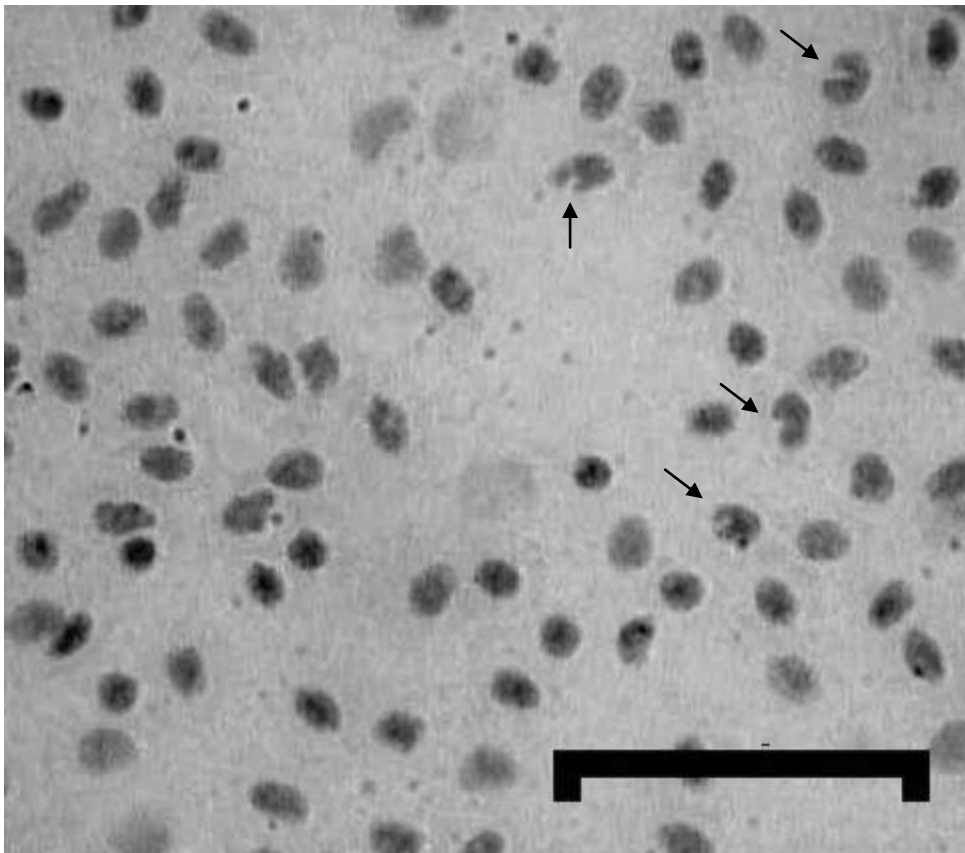


Figura 7. Eritrócitos de *C. parallelus*. As setas indicam anomalias nucleares. Barra = 20µm

4.2.3. Biomarcadores Morfológicos -Histopatologia do tecido Branquial

As alterações mais frequentes encontradas no tecido branquial foram hipertrofia, hiperplasia e descolamento do epitélio lamelar e congestão sanguínea (Figuras 9 a 13).

O Índice de Alteração Histopatológica (IAH) do tecido branquial de *C. parallelus* está apresentado na Figura 8. O IAH foi significativamente menor em Santa Cruz (2,22), na coleta de Inverno quando comparada a amostragem de verão (11,90) neste mesmo estuário. Não houve diferença significativa na Baía de Vitória entre as coletas realizadas no inverno (7,20) e verão (8,29) (Tabela 4).

4.2.3. Biomarcadores fisiológicos

4.2.3.1. Atividade Na⁺/K⁺-ATPase (NKA)

A atividade Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) do tecido branquial de *C. parallelus* está apresentada na Figura 14. É possível observar um aumento significativo na atividade da NKA na Baía de Vitória na coleta de verão, quando comparado com o estuário de Santa Cruz na coleta de Inverno (Tabela 4).

4.2.3.2. Determinação da frequência de células-cloreto

A determinação da frequência de células-cloreto no tecido branquial de *C. parallelus* está apresentado na Figura 15 e 16. Não foi observada diferença significativa para os diferentes locais de estudo nos dois períodos de amostragem (Tabela 4).

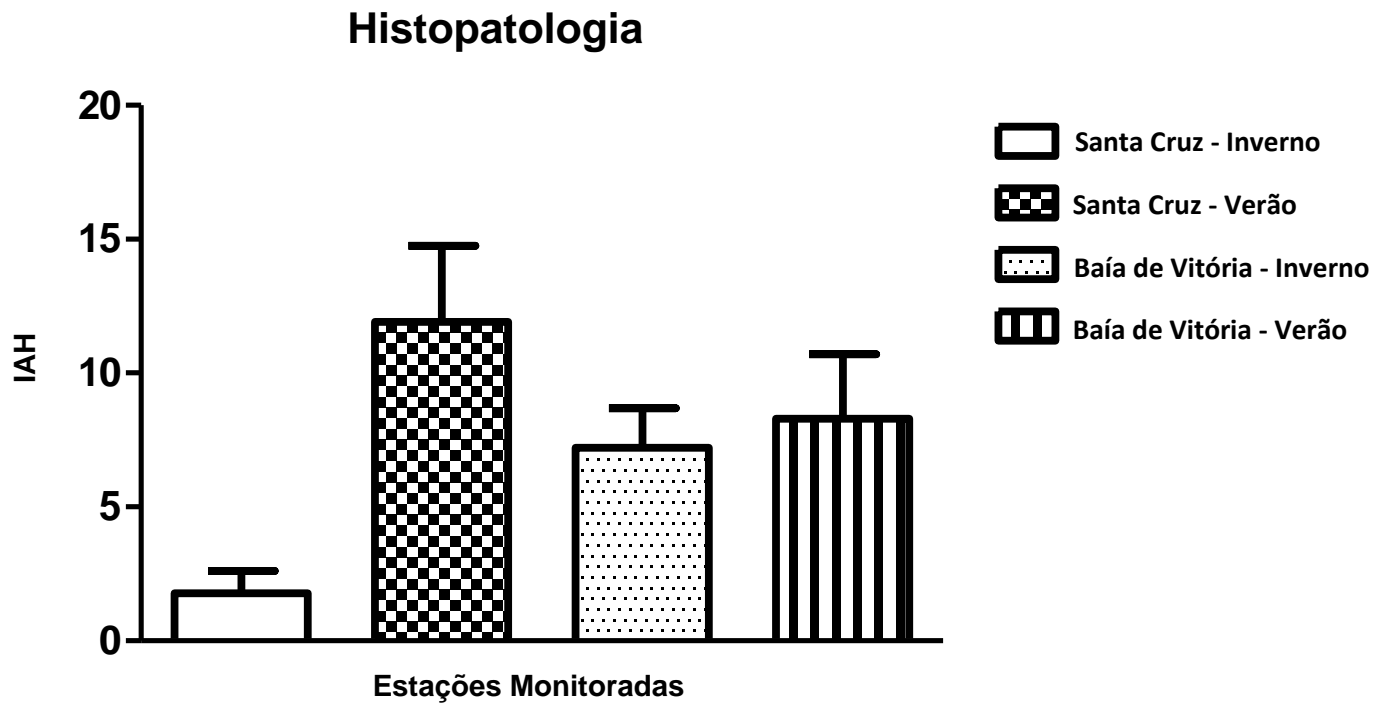


Figura 8. Índice de Alterações Hitopatológicas (IAH) no tecido branquial de *C. parallelus*.

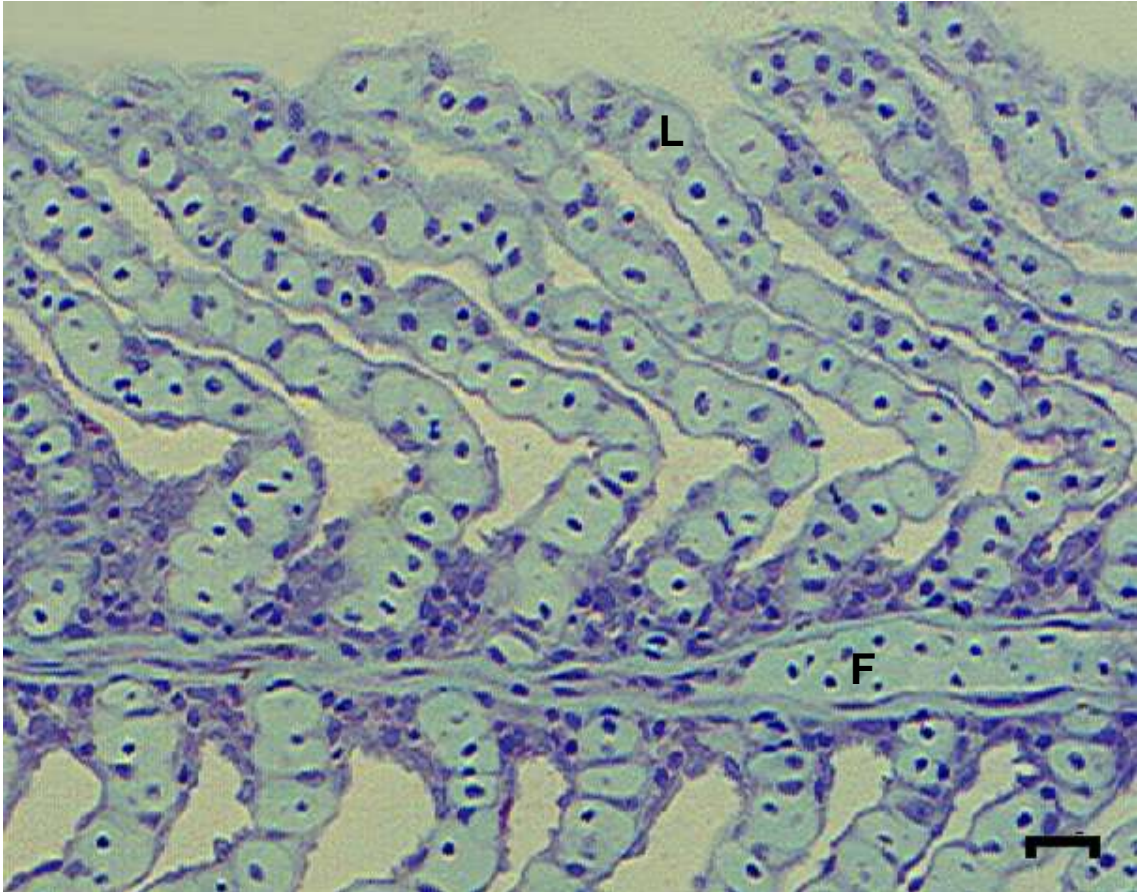


Figura 9. Brânquia de *C. Parallelus* mostrando características normais do filamento (F) e lamelas (L).
Coloração: Azul de Touidina. Barra = 20 μ m

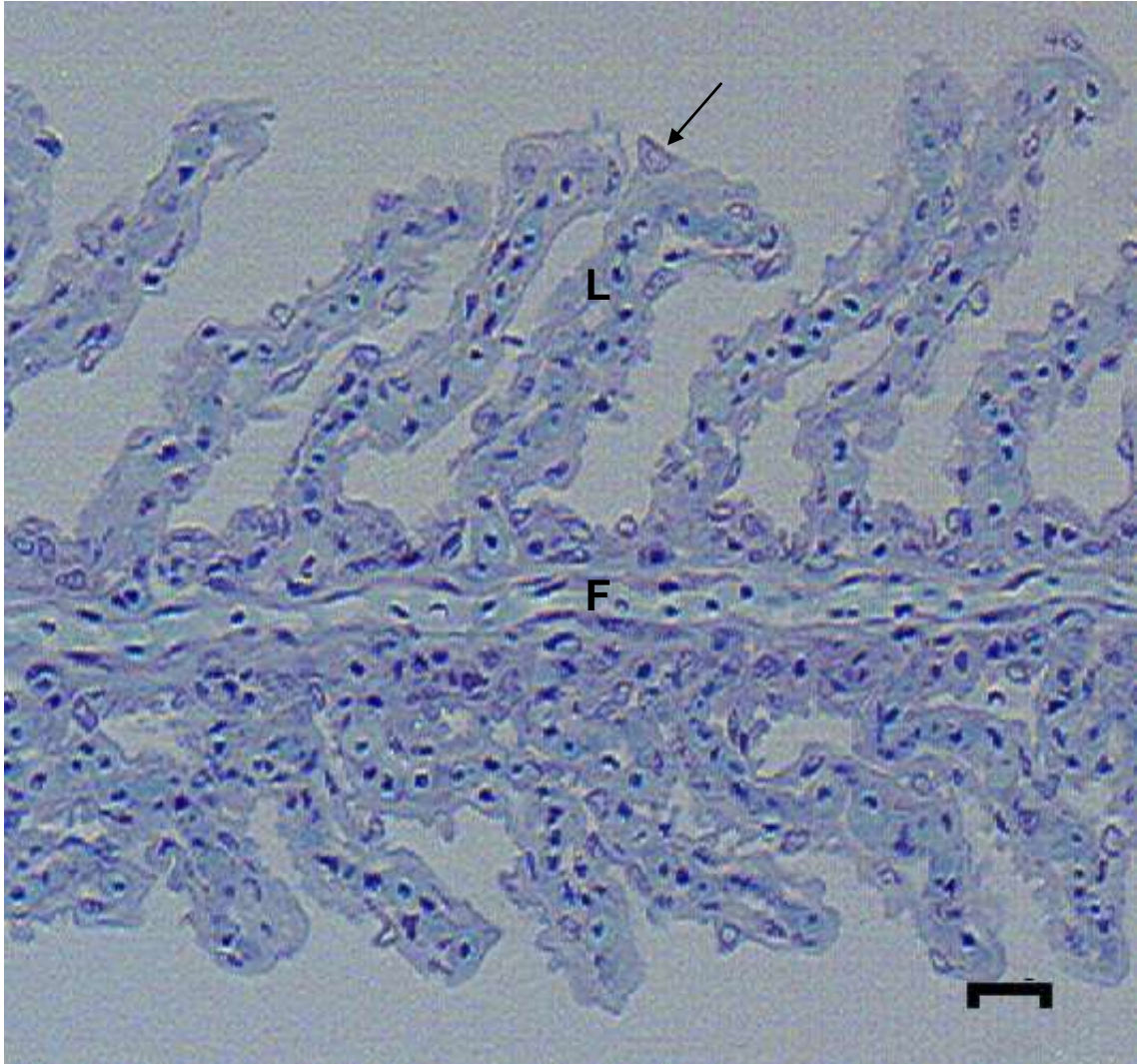


Figura 10. Filamento branquial mostrando hipertrofia (seta) no epitélio lamelar de *C. parallelus*. Filamento (F) e lamelas (L). Coloração: Azul de Touidina. Barra = 20 μ m

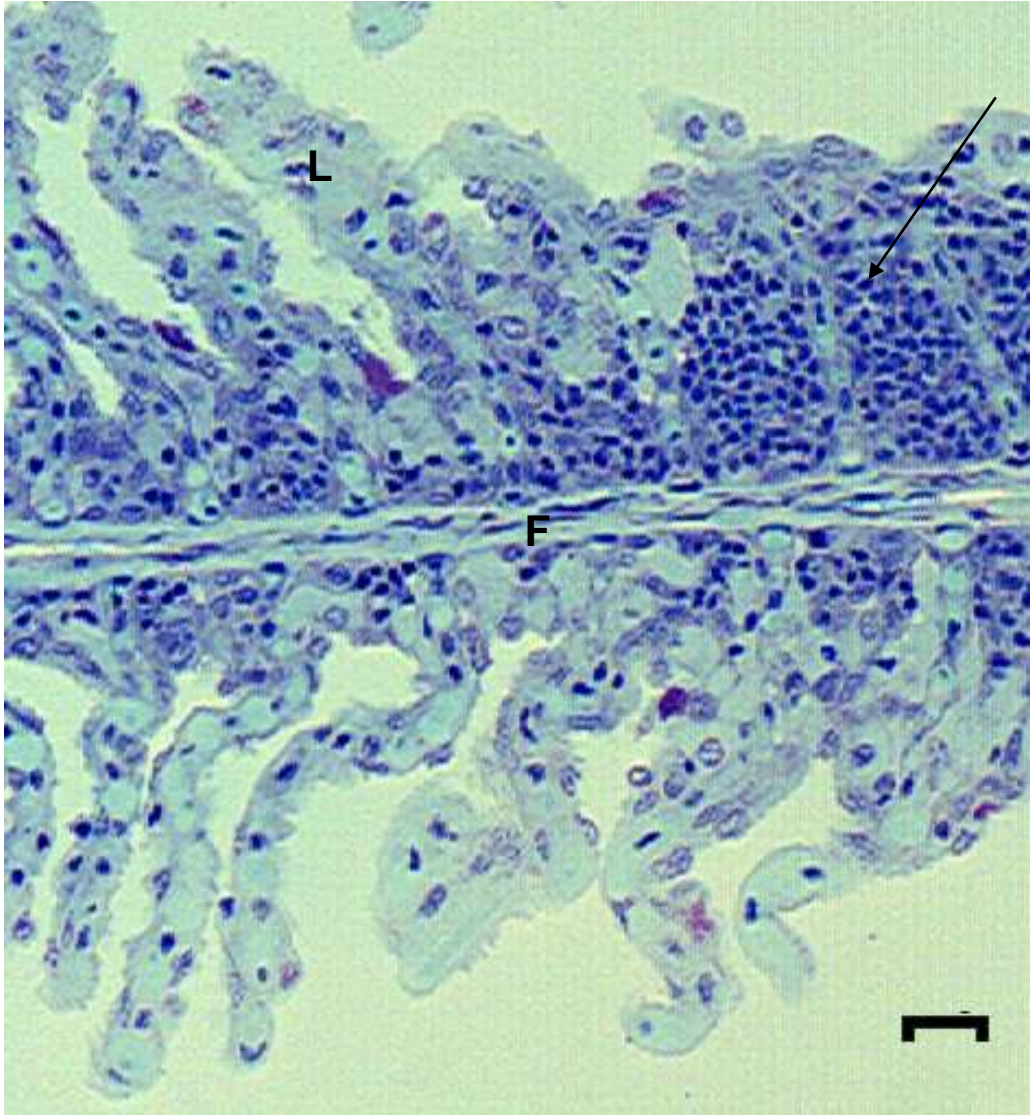


Figura 11. Brânquia com hiperplasia (seta) no epitélio lamelar de *C. parallelus*. Coloração: Azul de Tolidina. Barra = 20 μ m. Filamento (F) e lamelas (L).

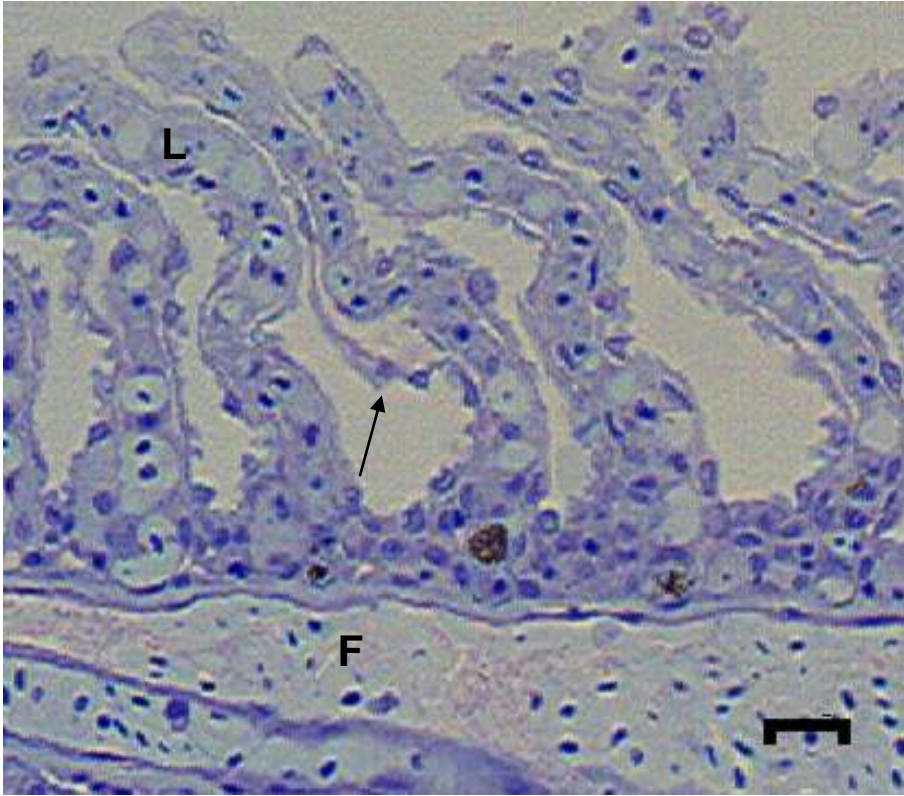


Figura 12. Brânquia com descolamento epitelial (seta) de *C. parallelus*. Filamento (F) e lamelas (L).
Coloração: Azul de Touidina. Barra = 20 μ m.

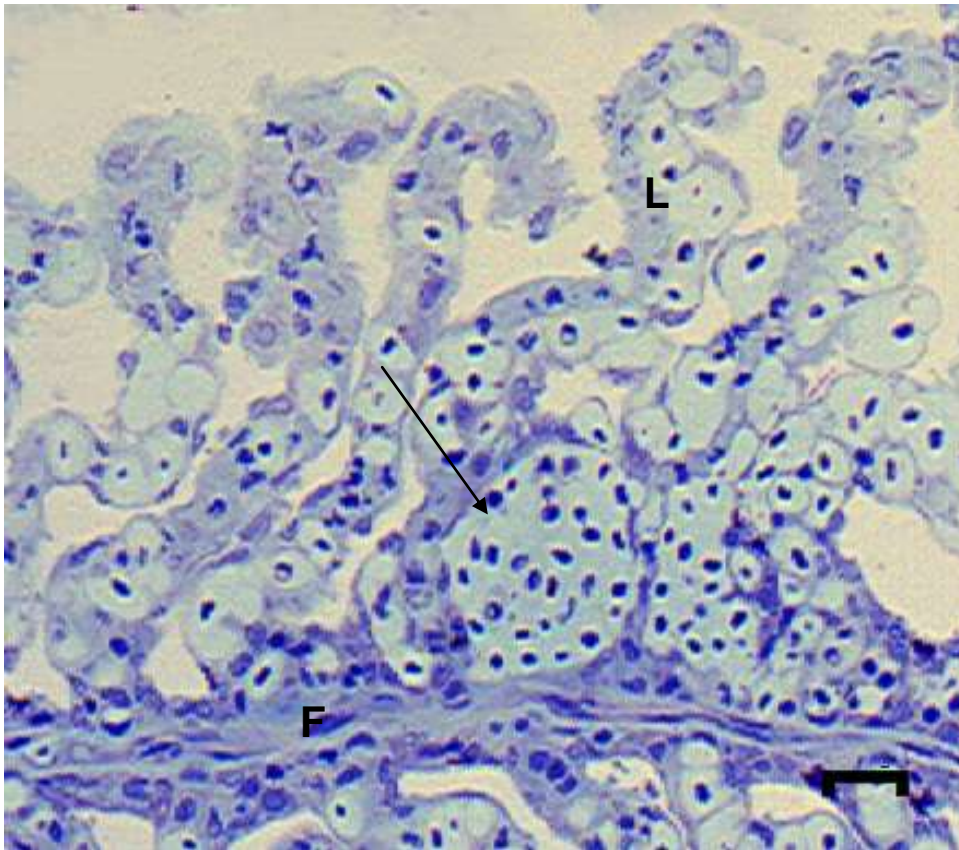


Figura 13. Brânquia com congestão lamelar (seta) de *C. parallelus*. Filamento (F) e lamelas (L). Coloração: Azul de Toudina. Barra = 20µm

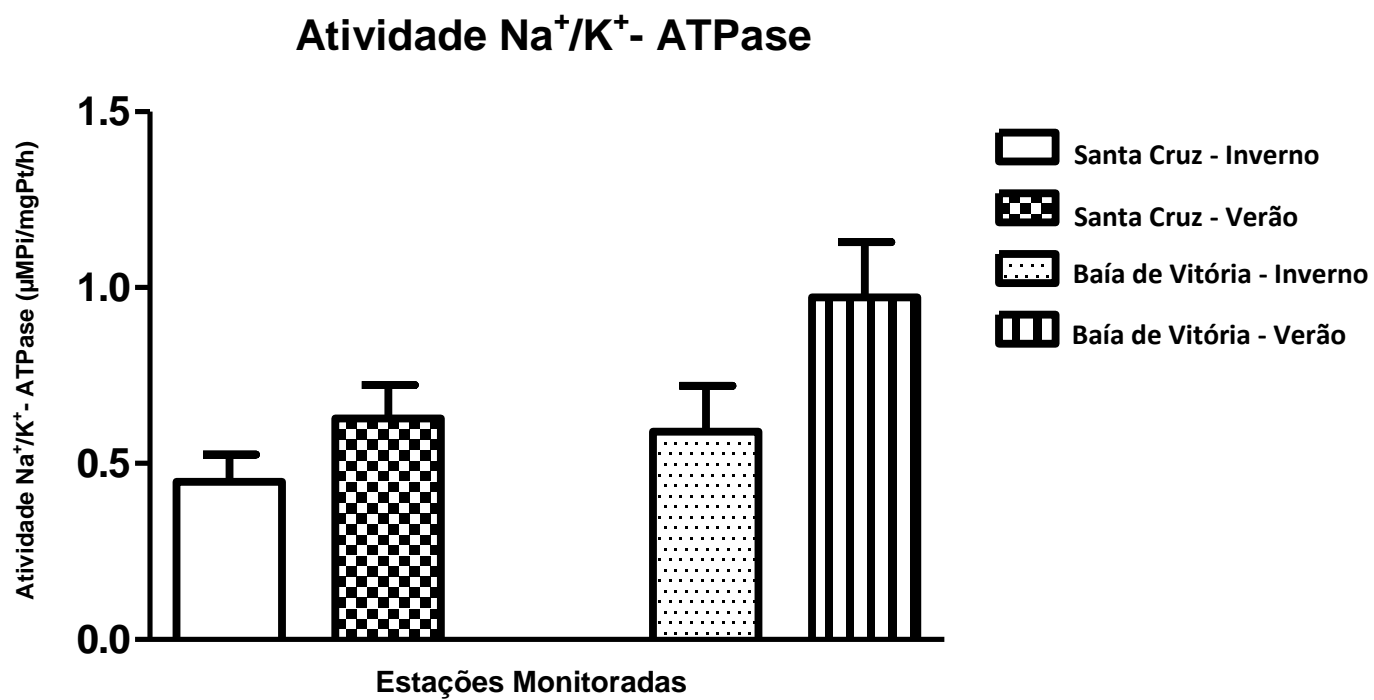


Figura 14. Atividade Na⁺/K⁺- ATPase (μMPI/mgPt/h) no tecido branquial de *C. parallelus*.

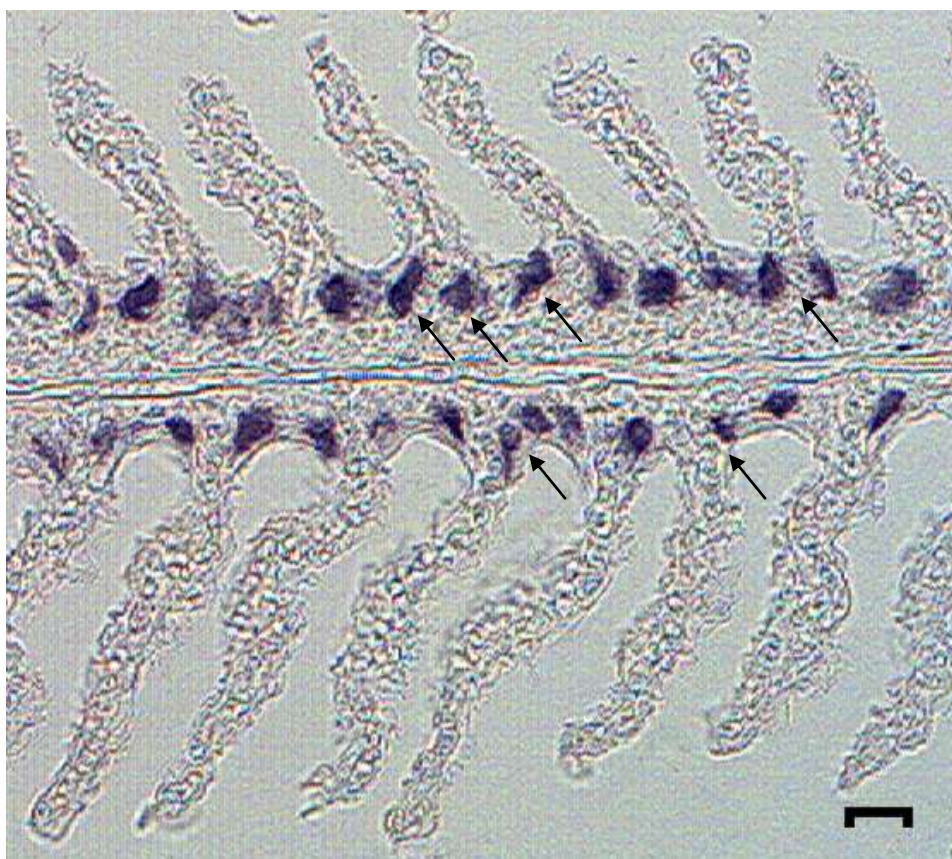


Figura 15. Imunohistoquímica contra Na⁺/K⁺- ATPase para identificação de células nas brânquias de *C. parallelus*. As setas indicam células-cloreto no filamento.. Barra = 20 μm.

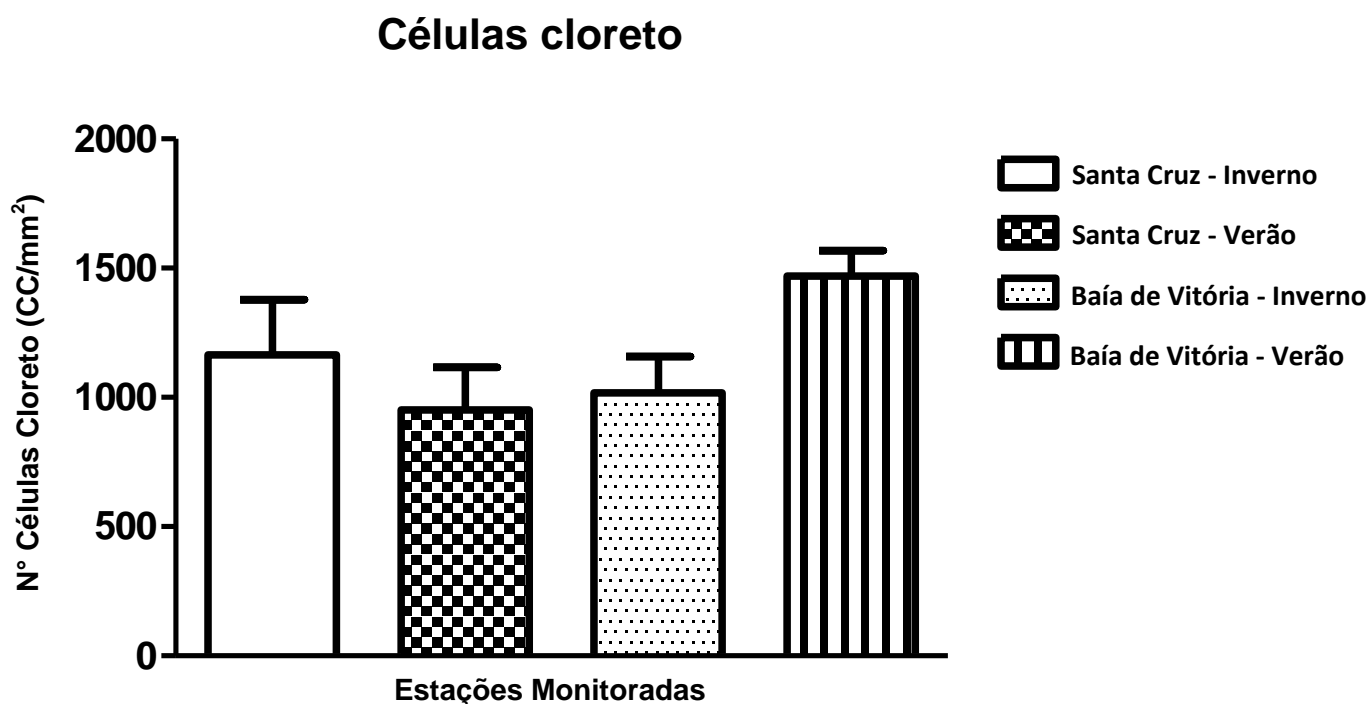


Figura 16. Número de células-cloreto (CC/mm²) do filamento do tecido branquial de *C. parallelus*.

4.3 Integração das variáveis físicas e químicas de água e sedimento e variáveis biológicas

O conjunto de dados original considerou 46 parâmetros físicos e químicos e 5 parâmetros biológicos. A Análise de Componentes Principais dos dados de concentração de metais na água, água intersticial, sedimento, músculo de *C. parallelus* e as respostas dos distintos biomarcadores obtidas na campanha de inverno e verão foram representados por 3 fatores principais os quais representaram 100 % da variância total do conjunto inicial de dados (Tabela 5). Cada fator foi descrito na Tabela 6 de acordo com o grupo de variáveis associadas.

O Fator 1 é predominante e representa 52,13 % da variância total dos dados e associa de forma significativa as concentrações de Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn e Se na água superficial, as concentrações de Al, Cr, Se, Ag e Pb na água intersticial e as

concentrações de Cr, Ni, Cu, Zn, Ag e Hg no sedimento com o teor de matéria orgânica e alterações imunohistoquímicas e NKA (Tabelas 5 e 6). O Fator 1 é representativo para o ponto Santa Maria – inverno e verão –, de acordo com os *scores* positivos apresentados nas Figuras 17 a 20 e na Tabela 7.

O Fator 2 demonstra a associação das concentrações de As e Pb na água superficial, Fe, Ni, Cu e As na água intersticial, Mg no sedimento, concentrações de Cr, Mn, Fe, Ni, Cu e Hg nos tecidos de peixes à frequência de mutagenicidade. O Fator 2 é representativo para o ponto Santa Cruz (inverno) com *score* positivo. No entanto, alterações bioquímicas (NKA) e histopatologia apresentaram valores negativos (loading) associados às concentrações de Al na água superficial, Mn e Zn no sedimento, Zn, Se e Pb nos tecidos de peixes (Tabelas 5 e 6). Essa associação negativa foi representativa para os pontos Santa Maria (inverno e verão) e Santa Cruz (verão) (Figuras 17 a 20 e Tabela 7).

O Fator 3 associou (loading negativo) as alterações biológicas genotoxicidade, imunohistoquímica e NKA às concentrações de Cr, Ni e Zn na água superficial e à concentração de Fe no sedimento (Tabelas 5 e 6). Esse Fator é representativo para o ponto Santa Maria, Verão (Figuras 17 a 20 e Tabela 7).

Tabela 2 Resultado extraído para cada componente principal (*Autovalores*).

Fator	Extração: Componentes principais Autovalores			
	Autovalores	% Total variância	Autovalores acumulados	% acumulada
1	27,10948	52,13362	27,10948	52,1336
2	13,68990	26,32673	40,79938	78,4603
3	11,20062	21,53965	52,00000	100,0000

Tabela 3 Factor Loading – Análise Fatorial das variáveis químicas e biológicas. AS: água superficial. AI: Água intersticial. SE: Sedimento. PE: Peixe.

Variável	F1	F 2	F3
Al-AS	0,48	-0,75	0,45
Cr-AS	0,54	-0,13	-0,83
Mn-AS	0,93	-0,32	-0,19
Fe-AS	0,99	-0,12	0,09
Ni-AS	0,54	-0,12	-0,83
Cu-AS	0,95	-0,18	-0,24
Zn-AS	0,60	-0,13	-0,79
As-AS	-0,42	0,91	-0,01
Se-AS	0,54	-0,12	-0,83
Ag-AS	-0,97	0,03	0,23
Cd-AS	-0,72	-0,70	0,04
Pb-AS	-0,66	0,69	0,29
Al-AI	0,93	0,04	0,37
Cr-AI	0,81	-0,12	0,58
Mn-AI	-0,96	-0,27	0,01
Fe-AI	-0,49	0,37	0,79
Ni-AI	-0,42	0,91	-0,01
Cu-AI	0,08	0,95	-0,30
As-AI	-0,42	0,91	-0,01
Se-AI	0,60	-0,09	0,80
Ag-AI	0,60	-0,09	0,80
Pb-AI	0,60	-0,09	0,80
Al-SE	-0,98	0,19	0,08
Cr-SE	0,43	-0,07	0,90
Mn-SE	-0,88	0,45	0,13
Fe-SE	0,91	-0,19	-0,38
Ni-SE	0,36	0,23	0,90
Cu-SE	0,99	0,11	0,07
Zn-SE	0,42	-0,91	0,01
As-SE	-0,95	0,32	-0,05
Ag-SE	0,94	-0,18	-0,27
Hg-SE	0,97	-0,13	-0,19
Al-PE	-0,62	0,01	0,79
Cr-PE	-0,25	0,82	0,52
Mn-PE	0,20	0,98	-0,01
Fe-PE	0,06	0,70	0,71
Ni-PE	-0,42	0,91	-0,01
Cu-PE	-0,36	0,73	0,58
Zn-PE	-0,11	-0,95	-0,30
As-PE	-1,00	0,08	0,03
Se-PE	-0,16	-0,99	0,02
Pb-PE	-0,25	-0,97	-0,05

Hg-PE	-0,42	0,90	0,13
Matéria Orgânica	0,97	-0,21	-0,14
Salinidade	-1,00	0,01	0,02
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	-0,98	0,20	0,04
Genotoxicidade FR%	0,12	0,18	-0,98
Mutagenicidade FR%	-0,05	1,00	0,02
Imunohistoquímica	0,50	0,27	-0,83
Na+/K+-ATPase (NKA)	0,53	-0,46	-0,71
Histopatologia	-0,06	-0,99	-0,08

Tabela 4 Factor Scores extraídos para cada um dos locais de coleta. PC = Componente principal.

	PC1	PC2	PC3
<i>Inverno</i>			
Santa Cruz	-0,63	1,36	-0,01
Santa Maria	0,90	-0,13	1,19
<i>Verão</i>			
Santa Cruz	-1,07	-1,05	0,07
Santa Maria	0,80	-0,19	-1,25

SANTA CRUZ - INVERNO

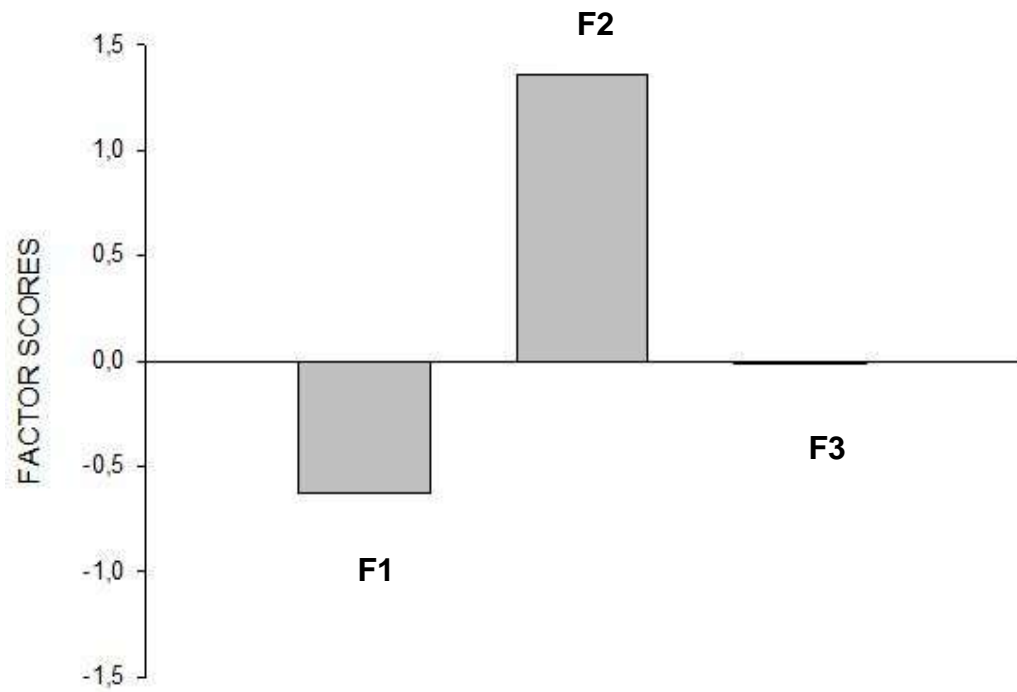


Figura 17. Representação gráfica da associação dos fatores em Santa Cruz período de inverno.

SANTA CRUZ - VERÃO

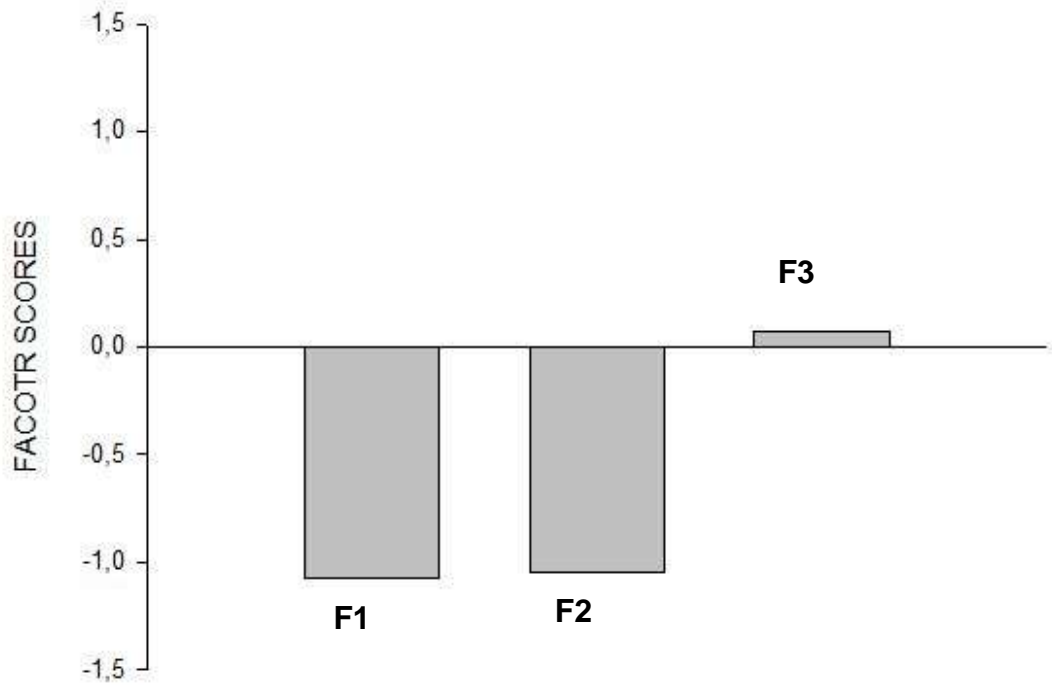


Figura 18. Representação gráfica da associação dos fatores em Santa Cruz período de verão.

SANTA MARIA - INVERNO

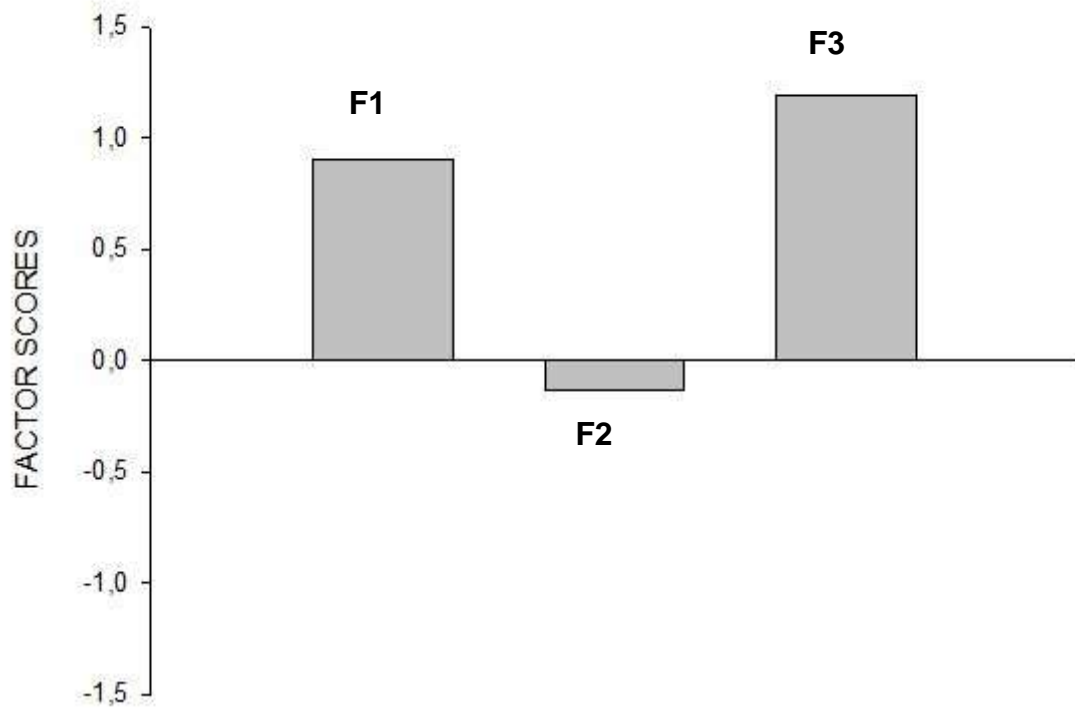


Figura 19. Representação gráfica da associação dos fatores em Baía de Vitória período de inverno. \

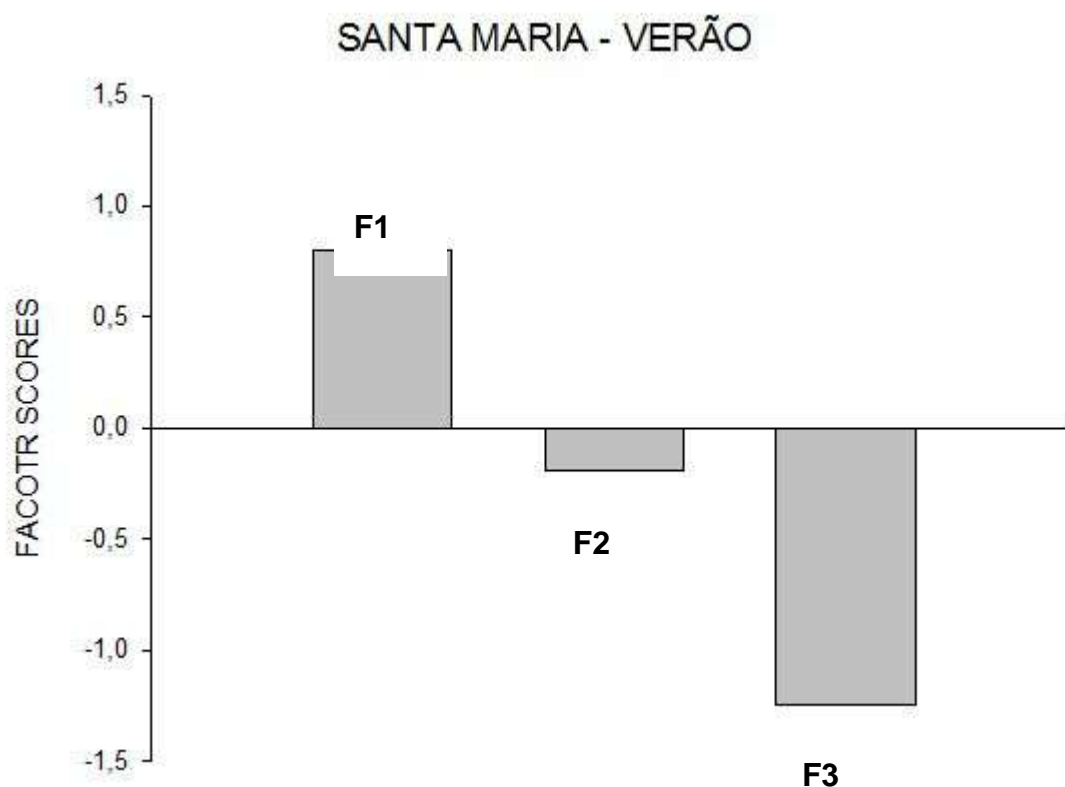


Figura 20. Representação gráfica da associação dos fatores em Baía de Vitória período de verão.

Quando os Fator *Scores* 1 e 2 foram plotados numa figura bidimensional (Figura 21), foi observada a forte associação das amostras de Santa Maria no inverno e verão, ambos predominantemente negativos para o Fator 1. Já para as amostras coletadas em Santa Cruz demonstraram-se menos relacionados às coletadas próximas ao estuário Santa Maria, Baía de Vitória, ambos predominantemente positivos para o Fator 1.

Para a Figura 22, foram utilizados os Factor *Scores* 1 e 3, sendo observado uma associação das amostras de Santa Cruz no inverno e verão. Já as amostras coletadas próximas ao estuário de Santa Maria, Baía de Vitória, demonstraram-se menos relacionados entre si.

Já na Figura 23, foram utilizados os *Factor Scores* 2 e 3, sendo observado completa distinção tanto entre os locais de coleta quanto com relação ao período analisado.

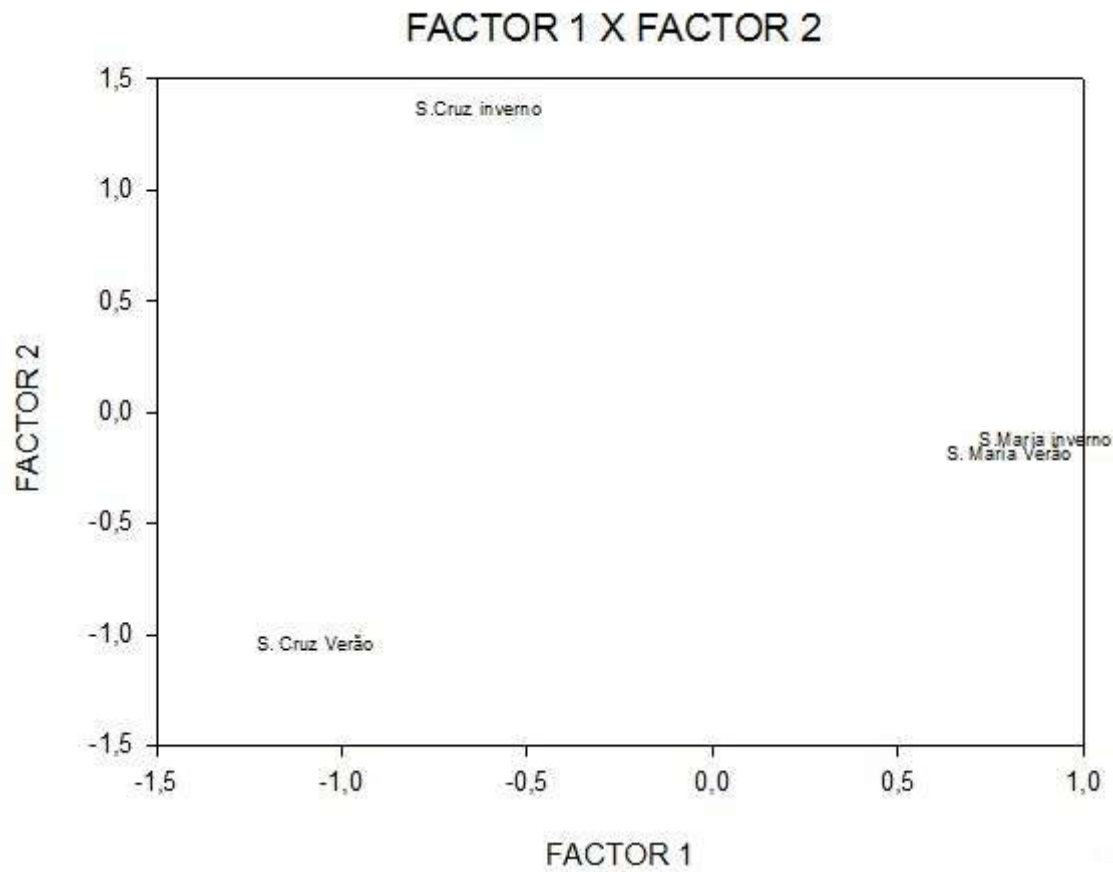


Figura 21. Representação gráfica da associação dos fatores 1 e 2 com cada um dos locais de coleta para todas as estações.

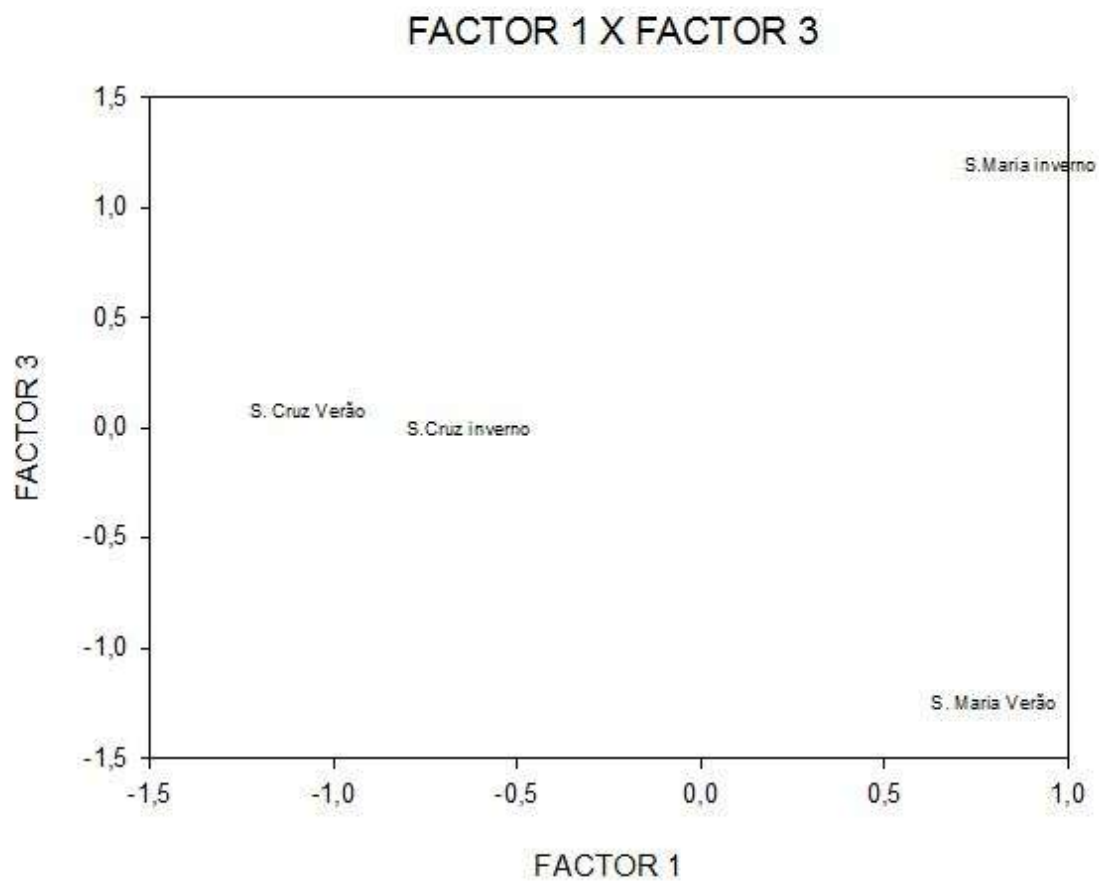


Figura 22. Representação gráfica da associação dos fatores 1 e 3 com cada um dos locais de coleta para todas as estações.

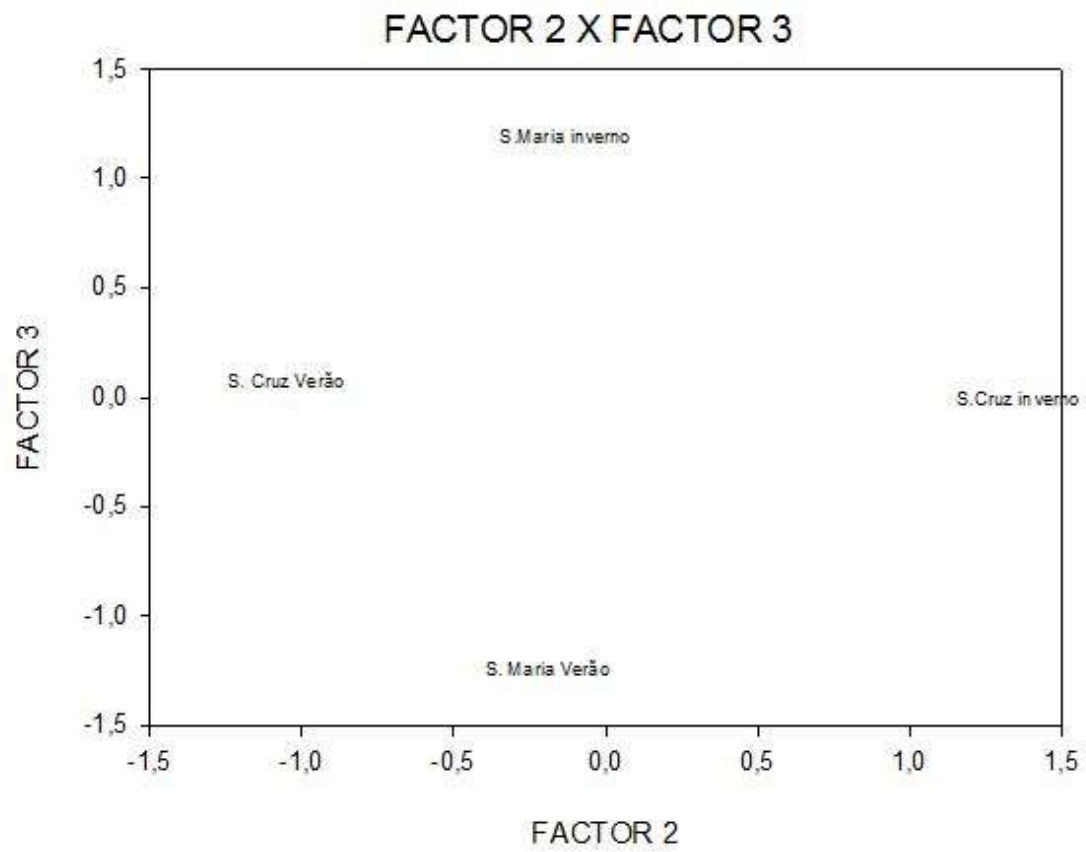


Figura 23. Representação gráfica da associação dos fatores 2 e 3 com cada um dos locais de coleta para todas as estações.

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico e o monitoramento da saúde ambiental é complexa, especialmente quando múltiplas fontes de contaminação estão presentes e as interações entre elas são desconhecidas. Para tanto, a qualidade do ambiente pode ser avaliada pelo peso de cada análise. As análises químicas fornecem informações quanto à natureza e o grau da atual contaminação, mas não podem indicar fatores como a ocorrência de efeitos biológicos. Por outro lado, os biomarcadores mostram a existência de alteração no organismo e podem fornecer dados que expliquem as análises químicas, quando ambos estão combinados (PEREIRA et al, 2006). Assim, a abordagem aplicada no presente estudo integra métodos de combinação química e indicadores biológicos de exposição, efeito ou ambos.

Os resultados referentes aos parâmetros físico-químicos das amostras de água superficial dos pontos analisados foram coerentes com o tipo de ambiente estudado. Os valores de condutividade e salinidade encontrados estão relacionados à forte influência fluvial sob a qual estes locais estão submetidos (ONOFRE *et al.* 2007). O maior valor encontrado de salinidade foi no estuário de Santa Cruz. Este dado pode estar associado à maior proximidade da maré, em detrimento à Baía de Vitória, que apresentou o menor valor de salinidade e está mais próximo à desembocadura dos cursos fluviais.

Os valores encontrados para o *pH*, indicaram um caráter neutro a levemente básico, sendo o valor mais alto encontrado em Santa Cruz. Tais condições demonstram a influência das águas marinhas que chegam até os manguezais (ONOFRE *et al.* 2007). A influência do aporte de água doce na Baía de Vitória foi significativa, sendo este o local que apresentou o menor valor para a análise de *pH*.

Os valores de concentração de O₂ dissolvido foram abaixo do limite de qualidade para água salobra tipo 2 determinado pela RESOLUÇÃO CONAMA n°. 357, de 17 de março de 2005, que estabelece o limite mínimo de 5 mg/L de oxigênio dissolvido. O lançamento de efluentes domésticos leva à diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido, uma vez que o aumento de matéria orgânica favorece a proliferação de microorganismos (ARAÚJO, 2000).

No meio ambiente, as substâncias químicas podem ser degradadas por processos químicos, como hidrólise e fotoxidação e bioquímicos. A estabilidade de um químico está relacionada a sua própria estrutura e fatores ambientais, como temperatura, nível de radiação solar, *pH* e concentração de matéria orgânica. No sedimento e no solo, metais e outras substâncias inorgânicas podem estar adsorvidas à superfície de óxidos ou à matéria orgânica, como os ácidos húmicos e fúvicos, tendo sua mobilidade e disponibilidade reduzidos. O teor de oxigênio na água e nas camadas determina a natureza e a velocidade das transformações químicas e bioquímicas: estes teores diferem nos sedimentos, sendo que no fundo do estuário as condições são anaeróbias, enquanto nos cursos d'água de fluxo intenso os níveis de oxigênio são relativamente elevados. A degradação destas substâncias, podem elevar ou diminuir a disponibilidade de espécies tóxicas (CHASIN, 2003).

O menor teor de oxigênio dissolvido, associado a maior concentração de matéria orgânica na Baía de Vitória provavelmente diminui a biodisponibilidade dos metais neste ambiente. Já em Santa Cruz, apesar do sedimento apresentar menores concentrações dos químicos analisados, estes encontram-se mais biodisponíveis quando correlacionado com a matéria orgânica e oxigênio dissolvido. Embora não tenha sido determinada diferença significativa na concentração de metais no músculo de *C.*

parallelus, os organismos no estuário de Santa Cruz provavelmente estão expostos a uma quantidade maior de metais biodisponíveis, em comparação com os organismos da Baía de Vitória sugerindo que a matéria orgânica e oxigênio dissolvido são fundamentais para a acumulação dos metais analisados. Os organismos da Baía de Vitória apresentaram dados de concentração de metais próximos ao de Santa Cruz demonstrando que há um equilíbrio entre a presença e biodisponibilidade dos metais analisados. Entretanto, a Baía de Vitória merece atenção especial porque, mediante ressuspensão do sedimento, os organismos poderiam estar expostos a altas concentrações de contaminantes.

Todos os organismos vivos estão em interação com o meio ambiente, sendo que seu genoma fica exposto às interferências que este meio sofre. A exposição destes organismos a agentes ambientais podem induzir a modificações e lesões no DNA, prejudiciais a todas as células, uma vez que podem interferir em diversos processos vitais (COSTA; MENK, 2000). Os tóxicos ambientais têm a capacidade de induzir efeitos adversos em organismos expostos, inclusive mutações no DNA. A genética toxicológica, área pertencente a genética, tem por objetivo maior estudar os processos que regem esta interação tóxico-organismo e é importante ressaltar que, quando a fonte geradora promove efeitos sobre a estrutura físico-química do DNA, fica caracterizado o processo conhecido como mutagênese. Portanto, a genotoxicologia busca analisar a capacidade que muitos agentes têm em promover danos em células somáticas (que são aquelas transmitidas através da hereditariedade) englobando também seu mecanismo de ação. A genotoxicologia está associada à detecção de alterações genéticas induzidas por componentes do meio ambiente, potencialmente tóxicos, direta ou indiretamente. De acordo com Borges-Osorio e Robinson (2001), as alterações do determinismo genético

podem acontecer a nível celular, além de ocasionar modificações que podem ser gênicas ou cromossômicas (MEZZARI, 2005). A detecção de danos a saúde e ao meio ambiente avaliada pelos efeitos genotóxicos em potencial são considerados pré-requisitos para o desenvolvimento de diversas doenças como, por exemplo, o câncer (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

O efeito mutagênico, analisado utilizando o teste de micronúcleo, não demonstraram diferenças significativas entre os estuários monitorados. Entretanto, o efeito genotóxico caracterizado pelas anomalias nucleares, tornou evidente que a Baía de Vitória, no verão, promoveu maior dano ao DNA resultando em maior índice e frequência de danos em comparação com Santa Cruz nas duas estações monitoradas e Baía de Vitória no inverno. Entretanto, é importante lembrar que as anomalias nucleares são reversíveis e não se traduz como efeitos mutagênicos.

As brânquias, responsáveis pela respiração, manutenção do equilíbrio iônico, osmótico e ácido-base em peixes, são os primeiros órgãos alvos devido à grande superfície de contato com o meio aquático e curta distância água-sangue (MAZON et al., 2002, FERNANDES e MAZON, 2003). Lesões histopatológicas têm sido frequentemente descritas como importantes ferramentas em estudos de biomonitoramento devido à facilidade de interpretação tanto em situações de exposição aguda quanto crônica (WESTER et al., 1991; COUILLARD et al., 1999; WESTER et al., 2002; GÜL et al., 2004; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). Assim, neste estudo, os índices de alteração histopatológica, determinados de acordo com as indicações de Cerqueira e Fernandes (2002), foram considerados danos reversíveis e indicaram que as brânquias de *C. parallelus* estavam funcionalmente normais nos dois estuários considerando que não houve diferenças significativas nos valores de IAH, apesar de que

nos animais coletados em Santa Cruz no verão o IAH igual a 11,90 indicou danos leves a moderado. A ocorrência de lesões branquiais em animais expostos ambientalmente a contaminantes tem sido relatada em organismos aquáticos por outros autores como Gül et al. (2004), Lyons et al. (2004), Noreña-Barroso et al. (2004) e Oliveira Ribeiro et al. (2005).

As mudanças físico-químicas da água alteram o tecido branquial, ou seja, células pavimentosas e cloreto interferindo em sua função (Wendellar Bonga, 1997). O aumento do número de células cloreto em resposta ao agente estressor pode resultar em um aumento do número de unidades da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ e da bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$, aumentando assim o transporte de íons (DANG, 2000). A atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ é essencial para a manutenção da homeostase iônica e osmótica e para a osmorregulação (Evans et al, 2005). A frequência de CC no epitélio e o aumento na atividade de NKA (Tabela 4) estão associados a respostas fisiológicas nos processos osmorregulatórios e têm sido considerados como mecanismos que auxiliam a manutenção e/ou o restabelecimento da homeostasia iônica do indivíduo na presença de um agente estressor (Wendelaar Bonga, 1997). Os valores de CC e da atividade da NKA nos organismos coletados em Santa Cruz (inverno e verão) e Baía de Vitória (inverno) evidenciaram que os animais possivelmente estavam mantendo a homeostasia iônica. Entretanto, a maior atividade da NKA nas brânquias dos organismos coletados na Baía de Vitória, no verão, sugere que houve estimulação de mecanismos compensatórios para a manutenção do equilíbrio iônico, como já descrito por outros autores em animais frente a agentes estressores (WENDELAAR BONGA, 1997).

Considerando a complexidade dos resultados obtidos, a Análise Fatorial reagrupou todas as variáveis em três novos fatores, facilitando a interpretação integrada

dos dados de concentração de metais e biomarcadores, e promovendo uma descrição mais concisa do conjunto original de dados, os quais serão discutidos a seguir.

A avaliação integrada realizada no presente estudo confirma a hipótese de que a qualidade ambiental distinta da Baía de Vitória em relação estuário de Santa Cruz pode gerar diferentes respostas biológicas avaliadas pelo uso de biomarcadores e confirmadas pelas concentrações de metais em *C. parallelus*, indicando não só a biodisponibilidade de contaminantes, mas também os efeitos gerados por essa exposição.

A correlação entre os níveis de Fe e Mn nos peixes, de acordo com Pereira et al. (2007), podem ser resultado do aporte de água continental. As águas do Rio Santa Maria da Vitória deságuam na Baía de Vitória, próximo ao local onde os peixes com maiores teores de Fe e Mn foram coletados. O manganês comumente é utilizado para estimar a influência continental sobre o ambiente marinho, é um componente das rochas e dos solos e podem ser facilmente transportados pelos cursos de água, adsorvido na partículas em suspensão. Considerando que muitos dos municípios situados na área estudada não apresentam um sistema de esgoto canalizado e/ou tratado e, portanto, estes são lançados nos rios. Estes resultados de águas continentais poderiam estar influenciando o aporte de contaminantes de atividades do próprio estuário quanto às respostas biológicas em peixes nesses locais.

Considerando-se os resultados dos biomarcadores e de bioacumulação para cada ponto de coleta nas diferentes estações do ano, pode-se observar a existência de fontes pontuais de contaminação em todas as áreas de estudo e respostas biológicas distintas, de acordo com cada estação do ano.

A análise multivariada mostrou alta correlação entre mutagenicidade e histopatologia e concentrações de metais encontradas no músculo de *C. parallelus*, sugerindo a influência de múltiplas fontes de contaminação.

As diferenças nos padrões de contaminação e de resposta que ocorreu entre o inverno e o verão pode ser explicado não só pela presença de múltiplas fontes de contaminação mas também pelo padrão de ocupação da cidade que sofre com o aumento de turistas no verão e conseqüente aumento de efluentes domésticos.

A análise multivariada proporcionou uma melhor compreensão dos dados, permitindo uma visão integrada do ambiente (salinidade, oxigênio dissolvido e matéria orgânica), a partir das análises químicas e biológicas. Essa integração foi importante para o reconhecimento da influência de cada variável mensurada nas respostas dos biomarcadores e para o discernimento das áreas onde a contaminação e respostas biológicas foram similares, separando as estações por grupos que foram coerentes com a situação real da região, onde múltiplas fontes de contaminação podem causar impacto isolado.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As respostas de biomarcadores bioquímicos, celulares e histopatológicos indicaram a presença de efeito ainda a nível reversível, principalmente na Baía de Vitória no verão o que pode ser considerado como o primeiro sinal dos efeitos da poluição na região.

Devido a sua sensibilidade e da nossa capacidade de entender o modo de ação de contaminantes, os biomarcadores são altamente recomendados em outros estudos ambientais realizados sobre a costa brasileira.

Por fim, baseado nos resultados expostos, recomenda-se a inclusão de estudos com biomarcadores em programas de diagnóstico e monitoramento ambiental para avaliação da qualidade de regiões costeiras para fins de pesca, aquicultura e proteção da biota, bem como a consideração desses métodos para regulamentação de concentrações seguras de xenobióticos introduzidos no ambiente aquático.

7. REFERÊNCIAS

- AGER, L.; HAMMOND, D. E.; E WARE, F.. Artificial spawning of snook. Florida Game and Fresh Water Fish Commission. **Proceedings of the Thirtieth annual conference southeastern association of fish and wildlife agencies**. Jackson, Mississippi: 9 p. 1976.
- AKAISHI, F.M., SILVA DE ASSIS, H.C., JAKOBI, S.C.G., STJEAN, S., COUTERNAY, S.C., LIMA, E., WAGNER, A.L.R., SCOFIELD, A., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 46, p. 244–253, 2004.
- ALLEN, H.E.; FU, G. & DENG, B. 1993. Analysis of acid – volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. **Environ. Toxicol. Chem.**, 12: 1441 – 1453.
- ARAÚJO, L.F.P., SILVA, F.J.A., ALMEIDA, M.M.M. 2000. Caracterização e avaliação sanitária das águas do Rio Maranguapinho. *In*: IX SILUBESA-Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES. Porto Seguro p 21-26.
- AUSTIN H.; E AUSTIN S. The feeding habitats of some juvenile marine fishes from the mangroves in western Puerto Rico. **Caribbean Journal of Science**. v. 11, n.3, p.171-178, 1971.
- AYYON F AND GARCIA-VAZQUEZ G (2000) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Paecilia latipinna*: An assessment of the fish micronucleus test. **Mutat Res** 467:177-186.
- BARROSO, G. F. 2004. Development of an evaluation framework for sustainable bivalve aquaculture: a strategic plan approach in Espírito Santo, Brazil: Unpublished PhD Thesis (Geography), University of Victoria, Canada, 229 pp.
- BEVILACQUA, J. E. 1996. Estudo sobre a estabilidade de amostras de sedimento do rio Tietê, SP. (Tese de doutorado). IQ, USP, São Paulo, 171 p.
- BOMBAIL V, GORDON E AND BATTY J (2001) Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere** 44:283-392.
- BORGES-OSÓRIO, M. R., ROBINSON, W. M. *Genética Humana*. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- BÖTTCHER, M.; HESPENHEIDE, B. & LLOBET-BROSSA, E. The biogeochemistry, stable isotope geochemistry, and microbial community structure of a temperate intertidal mudflat: an integrated study. **Cont. Shelf Res.**, 20:1749-1769, 2000.
- BOWEN, J.J.M. 1979. **Environmental chemistry of the elements**. London. Academic Press. 333p.

- BRADFORD, M.N. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72 248-254.
- BUCHELI, T. B., FENT, K. (1995), Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Crit. Rev. Environm. Sci. Technol.**, 25, 201-268.
- CARRASCO KR, TILBURY KL AND MAYERS MS (1990) Assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Can J Fish Aquat Sci** 47:2123-2136.
- CARREIRA, R.; WAGENER, A.L.R.; FILEMAN, T. & READMAN, J. 2001. Distribuição de coprostanol (5 β (H)-COLESTAN-3 β -OL) em sedimentos superficiais da Baía de Guanabara: indicador da poluição recente por esgotos domésticos. **Química Nova** 24:37-42.
- CARTER, M. R.; BURNS, L. A.; CAVINDER, T. R.; DUGGER, K. R.; FORE, P. L.; HICKS, D. B.; REVELLS, H. L.; SCHMIDT, T. W.; FARLEY, R. Ecosystems analysis of the big cypress swamp and estuaries. **United States Environmental Protection Agency**. South Florida Ecological Study. Florida: 20 p.,1973.
- CARVAJAL, J. R. Contribucion al conocimiento de la biología de los robalos *Centropomus undecimalis* y *C. Poeyi* en la laguna de terminos, Campeche, México. Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela: **Boletín del Instituto Oceanografica**, v.14, n.1, p. 51-70, 1975.
- CERQUEIRA, C.C.C., & FERNANDES, M.N. 2002 Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 52: 83-91
- CHAPMAN, P. M.; M. D. PAINE; A.D. ARTHUR; L.A. TAYLOR. 1996. A Triad study of sediment quality associated with a major, relatively untreated marine sewage discharge. **Marine pollution Bulletin**, v.32, n.1, p.47-64.
- CHÁVES, H. Estudio de una nueva especie de robalo del Golfo de México y redescipción de *Centropomus undecimalis* (BLOCH). **Contribución de la Estación de Biología Marina del Instituto Tecnológico de Veracruz. México: Ciencia**, v.21, n.1, p. 75-83. 1961.
- CHÁVES, H. Contribucion al conocimiento de la biología de los robalos, chucumite y constantino (*Centropomus spp.*) del estado de Veracruz. **Contribución de la Estación de Biología Marina del Instituto Tecnológico de Veracruz. México: Ciencia**, v.22, n.3, p. 141-161. 1963.
- CLARCK, R.B. **Marine Pollution**. Clarendon Press. Oxford. 1997
- COIMBRA, A. G. 2003. Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de Coroa Grande e das Enseadas das Garças, Baía de Sepetiba, RJ. 2003. 72 f. Dissertação Mestrado em Geociências - Universidade Federal Fluminense. Niterói.

- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. 2005. Resolução Conama nº 357. www.mma.conama.gov.br/conama (acesso em 08/11/2010).
- COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**. v.3, n.12, p.24-26, 2000.
- COUILLARD, C. M., WILLIAMS, P. J., COURTENAY, S. C., RAWN, G. P. Histopathological evaluation of Atlantic Tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. **Aquatic Toxicology**. v. 44, p. 263-278. 1999
- DANG, Z. R. A. C., LOCK, G. FLIK AND S. E. WENDELAAR BONGA. Na⁺/K⁺ - ATPase Immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. **J. of Exp. Biol.** 203: 379-387, 2000.
- DE ZWART, D., 1995. Monitoring water quality in the future, Volume 3: Biomonitoring. National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), Bilthoven, The Netherlands.
- DEPLEDGE, M.H., FOSSI, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). **Ecotoxicology** 3, 161_/172.
- ECETOC, 1993. Environmental hazard assessment of substances. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals: Technical Report No. 51. Brussels, Belgium.
- EVANS, D. H., PIERMARINI, P. M., CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid – base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiol. Ver.** 85: 97 - 177, 2005.
- CHASIN, A.A.M. & AZEVEDO, F.A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: Azevedo, F.A. & Chasin, A.A.M. (Org.). As bases toxicológicas da ecotoxicologia. 2003. p. 127-65.
- FENECH, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. nº 455. p.81-95.
- FERNANDES, M. N., MAZON, A. F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A. L., Kapoor, B. G. (Eds.). **Fish Adaptation**., 418 p., 2003.
- FORE, P. L.; E SCHMIDT, T. W. Biology of juvenil and adult snook, *Centropomus undecimalis*, in the Ten Thousand Islands. Ecosystems analysis of the Big Cypress Swamp and estuaries. U.S. Environmental Protection AGENCY Region IV, Atlanta, Georgia Publication Number EPA 904/9-74-002. 18 p. 1973.
- FORSTNER, U. G.; WITTMANN, G. T. W. 1981. Metal Pollution in the Aquatic Environmental, Springer-Verlag: Berlin.
- GILMORE, R.G., DONOHOE, J., COOKE, D.W., 1983. Observations on the distribution and biology of east-central Florida populations of the common snook, *Centropomus undecimalis* Bloch. **Florida Sci.** 46 (3), 313–336.

- GRENWOOD, P. H. 1976 A review of the family Centropomidae (Pisces, Perciformes). Bulletin British Museum of Natural History Zoology. 29 (1): p. 1-81. (1976 apud RIVAS, 1986, p.579)
- GÜL, S., BELGE-KURUTAS, E., YILDIZ, E., SAHAN, A., DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake. **Turkey Environment International**. v. 30, n. 5, p. 605-609. 2004.
- HARBINSON, P. 1986. Mangrove muds-a sink and a source for trace metals. Marine Pollution Bulletin, 17 (6), p. 246-250, Great Britain.
- HINTON, D.E., 1994. Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fishes. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. Lewis Publishers CRC press, pp. 207_/240.
- HINTON, D.E., BAUMANN, P.C., GARDNER, G.C., HAWKINS, W.E., HENDRICKS, J.D., MURCHELANO, R.A., OKIHIRO, M.S., 1992. Histopathologic biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 155_/210.
- JESUS, HONÉRIO COUTINHO DE . Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 3, June 2004 .
- JOHNSON, L.L., CASILLAS, E., SOL, S., COLLIER, T., STEIN, J., VARANASI, U. Contaminant effects on reproductive success in selected benthic fish. **Mar. Environ. Res.**, 35, 165–170, 1993.
- KING, M. Fisheries biology assessment and management. Fishing News Books. Osney Mead, Oxford, England. 321p. 1995.
- KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantification. In: Methods in Molecular Biology. V- 32. Basic Protein and Peptide Protocols. University of Hertfordshire, Hatfield, UK, Humana Press, New Jersey, 1994
- LACERDA, LD.; SANTOS, JA.; LOPES, DV.. Fate of copper in intensive shrimp farms: bioaccumulation and deposition in pond sediments. **Braz. J. Biol.**, São Carlos, v. 69, n. 3, Aug. 2009 .
- LYONS, B. P., STENTIFORD, G. D., GREEN, M., BIGNELL, J., BATEMAN, K., FEIST, S. W., GOODSIR, F., REYNOLDS, W. J., THAIN, J. E. DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in european flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries. **Mutation Research**. v. 552, p. 177-186. 2004.
- MARSHALL, A. R. A survey of the snook fishery of Florida with Studies of the Biology of the principal species *Centropomus undecimalis* (Bloch). State Board of Conservation, Technical series. The Marine Laboratory. University of Miami. Florida. n. 22, 37 p., 1958.

- MARTIN, J. H.; E KING T. T. Occurrence of fat snook (*Centropomus parallelus*) in Texas: evidence for a range extension. **Contributions in Marine Science**. v. 32, p. 123-126, 1991.
- MATSUMOTO, S. T. ; FONSECA, I. ; MARIN-MORALES, ; MANTOVANI, M. S. ; MALAGUTTI, M. I. ; DIAS, A. L. . Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and molecular biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.
- MAZON, A. F., MONTEIRO, E. A. S., PINHEIRO, G. H. D., FERNANDES, M. N. Hematological and physiological changes induced by short – term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Braz. J. Biol.** 62: 1 – 7, 2002.
- MCCARTHY, J.F., SHUGART, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3_/16.
- MCCARTHY, J.F., HALBROOK, R.S., SHUGART, L.R., 1991. Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarkerbased biomonitoring capability. Publication no. 3072, ORNL/TM- 11783. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National laboratory, Tennessee, USA.
- MCMICHAEL, R. H., JR.; PETERS, K. M.; PARSONS, G. R.. Early life history of the snook, *Centropomus undecimalis* in Tampa Bay, Florida. *Northeast Gulf Science*. v. 10, n. 2, p.113–125, 1989.
- MEZZARI, G. M.; ANTONELLI, P. Análise de atividade mutagênica. Criciúma, SC: UNESC, 2005. 20 f.
- MULLER, R. G. The 2000 stock assessment update of common snook, *Centropomus undecimalis*. Fish and Wildlife Conservation Commission. Florida Marine Research Institute. St. Petersburg, Florida, 22 p. 2000.
- NELSON, D.W. & SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H. & KEENEY, D.R., eds. *Methods of soil analysis: Chemical and microbiological properties*. Part 2. Madison, Soil Science Society of America, 1982. p.539-579.
- NOREÑA-BARROSO, E., SIMÁ-ÁLVAREZ, R., GOLD – BOUCHOT, G. E ZAPATA-PÉREZ, O. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the the Estuary of Chetumal, Mexico. **Marine Pollution Bulletin**. v. 48, p. 263- 269. 2004.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., BELGER, L., PELLETIER, É., ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). USA: *Environ. Res.*, 90, 217 – 225, 2002b.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., SCHATZMANN, M., SILVA DE ASSIS, H.C., SILVA, P.H., PELLETIER, E., AKAISHI, F.M.. Evaluation of tributyltin subchronic effects in 37 tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 51, 161–167, 2002a.

- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., VOLLAIRE, Y., SANCHEZ-CHARDI, A., ROCHE, H.. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat. Toxicol.**, 74, 53–69, 2005.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (1993). The health of young people: A challenge and a promise. Geneva: WHO.
- ONOFRE, C.R.E, CELINO, J.J., NANO, R.M.W., QUEIROZ, A.F.S. 2007. Biodisponibilidade de metais traços nos sedimentos de manguezais da porção norte da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra** 7:65-82.
- PACHECCO, M E SANTOS MA Induction of liver EIROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. **Ecotoxicol Environ Saf** 40:71-76, 1998.
- PEAKALL, D.W., 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicol. Ecotoxicol.** News 1, 55_/60.
- PEAKALL, D.W., WALKER, C.H., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Ecotoxicology* 3, 173_/179.
- PEREIRA, C. D. S. ; ABESSA, DENIS MOLEDO DE SOUZA ; ZARONI, LETICIA PIRES ; GASPARRO, MARCIA REGINA ; BAINY, A. C. D. ; BICEGO, M. C. ; TANIGUCHI, S. ; FURLEY, T. H. ; SOUZA, EDUINETTY CECI PEREIRA MOREIRA DE . Integrated assessment of multi-level biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião - Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, USA, v. 26, p. 462-469, 2007.
- PÉREZ-PINZÓN, M. A.; LUTZ, P. L. Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook (*Centropomus undecimalis*). Florida: **Bulletin of Marine Science**. v.48, n.1, p. 58-66, 1991.
- PETERSON, M. S.; GILMORE, R. G. JR. Eco-physiology of juvenile snook *Centropomus undecimalis* (Bloc): life-history implications. **Bulletin of Marine Science**. v. 48, n.1, p. 46–57, 1991.
- PHILLIPS, D.J.H. 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments – a review. **Environ. Pollut.**, 13, 281-317.
- PHILLIPS, D. J. (1991). selected trace elements and the use of biomonitors in subtropical and tropical marine ecosystems. **Environ. Contam. Toxicol.**, 120, 105-129.
- QUABIUS, E.S.; BALM, P.H.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 108, p. 472-482, 1997.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13, p. 57-149. 2003.

- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. Canoas-RS. Editora da ULBRA. 2003. 356p.
- RIVAS, L. R. The Florida fishes of the genus *Centropomus*, commonly known as snook. Quarterly Journal of the Florida Academy of Science. Ichthyological Laboratory and Museum, Department of Zoology, University of Miami. Contribution n. 42. Florida: **Florida Academy of Sciences**, v. 25, n.1, p. 53-64, 1962.
- RIVAS, L. R. Sistematic Review of the Perciform fishes of the genus *Centropomus*. American Society of Ichthyologist and Herpetologist. Copeia, v.3, p. 579-611, 1986.
- RODRIGUES, P.P. 2005 Aspectos reprodutivos do robalo peva, *Centropomus parallelus*, na foz do Rio Doce, Linhares-ES. Vitória. 51p. (Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Oceanografia da Universidade Federal do Espírito Santo).
- RUSSELL, R.W., GOBAS, F.A.P.C., HAFFNER, G.D., 1999. Role of chemical and ecological factors in trophic transfer of organic chemicals in aquatic food webs. **Environ. Toxicol. Chem.** 18, 1250_/1257.
- SALOMONS, W.; FÖRSTNER, U. (1984) Metals in the Hydrocycle, Ed. Springer-Verlag, Berlin.
- SCHMID, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetics analysis. *In: Principles and Methods for Their Detection* (ed. Hollaender,A.). Plenum Press, New York, Vol.4, p.31-53.
- SCHMALZ, W.F., HERNANDEZ, A.D., WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. USA: **Mar. Environ. Res.**, 54, 539–542, 2002.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. 1995. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo: Caribbean Ecological Research, p 64.
- SHAFLAND, P. L.; E K. J. FOOTE. A lower lethal temperature for fingerling snook, *Centropomus undecimalis*. Florida Game and Fresh Water Fish Commission. Florida. **Northeast Gulf Science**. v.6. n.2, p.175–178. 1983.
- SHUGART, L.R., 1996. Molecoular markers to toxic agents. *In: Newman, M.C., Jagoe, C.H.* (Eds.), *Ecotoxicology: a Hierarchial Treatment*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 133_/161.
- SHUGART, L.R., BICKHAM, J., JACKIM, G., MCMAHON, G., RIDLEY, W., STEIN, J., STEINERT, S., 1992. DNA alterations. *In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L.* (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 155_/210.
- SILVERIO, P.F. 2003. Bases Técnico-científicas para derivação de valores - guias de qualidade de sedimentos para metais: experimentos de campo e laboratório. Tese de Doutorado- Escola de engenharia São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- SUTER, G.W., II, 1990. Use of biomarkers in ecological risk assessment. *In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R.* (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 419_/428.

- TABACHINICK, B. G. & FIDELL, L. S. *Using multivariate statistics*. New York: HarperCollins, 1996.
- TAYLOR, R. G.; WHITTINGTON J. A.; GRIER H. J.; E CRABTREE R. E. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in the common snook, *Centropomus undecimalis*, from South Florida waters. **Fishery Bulletin**. v. 98, n.3, p. 612–624, 2000.
- TEIXEIRA, R. L. Distribution and feeding habits of the young common snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae), in the shallow waters of a tropical Brazilian estuary. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, n. 6, p. 35-46, 1997.
- TUCKER, J. W. JR.; CAMPBELL, S. W. Spawning season of common snook along the east central Florida coast. *Quarterly Journal of the Florida Academy. Biological Sciences. Florida Scientist*, v. 51. n.1, p.1-6, 1988.
- USEPA (200.8). Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma - mass spectrometry. United States Environmental Protection Agency.
- VALE, C.C. & FERREIRA, R.D. 1998. Os manguezais do litoral do Estado do Espírito Santo. Pp. 88-94. In: *Anais do Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira*. São Paulo, ACIESP, v. I.
- VAN GESTEL, C.A.M., VAN BRUMMELEN, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217_/225.
- VARJABEDIAN, E. Impactos sobre os manguezais, In: Yara Schaeffer-Novelli (Org.). *Manguezal: Ecossistema entre a terra e o mar*, São Paulo: **Caribbean Ecological Research**, 1995, cap. 11, p. 49-52.
- VANNUCCI, M. Os manguezais e nós, São Paulo: Edusp, 233 p. 1999.
- VAZZOLER, A. E. A. M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Eduem, Nupelia. 1995.
- VETHAAK AD, RHEINALLT T. (1992). Fish diseases as a monitor for marine pollution: The case of the North Sea. *Rev. Fish Biology an Fisheries*. 2: 1–32.
- VETHAAK, A.D., AP RHEINALLT, T., 1992. Fish disease as a monitor for marine pollution: the case of the North Sea. *Rev. Fish Biol. Fish.* 2,1_/32.
- VOLPE, A. V. Aspects of the biology of the common snook, *Centropomus undecimalis* (BLOCH) of southwest Florida. In: MITTS, Ernest, State Board of Conservation. Technical series. The Marine Laboratory. Florida: University of Miami, n. 31, 37 p., 1959.
- WALKLEY, A. AND I.A. BLACK. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Sci.** 1934. 37:29-38.
- WENDELAAR BONGA, S. E., FLIK, G., BALM, P. H. M., VAN DER MEIJ, J. C. A. the ultrastructure of chloride cells in the gills of the Teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to fresh water. **Cell Tissue Res.**, 259: 575 – 585, 1997.

- WESTER, P. W., CANTON, J. H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 100C, p. 115-117. 1991.
- WESTER, P. W., VAN DER VEN, L. T. M., VETHAAK, A. D., GRINWIS, G. C. M., VOS, J. G., Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 11, p. 289-295. 2002.
- WHO INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. **Environmental Health Criteria 155**, World Health Organization, Geneva.