

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
BIOMONITORAMENTO

Teste do micronúcleo no peixe marinho *Bathygobius saporator*
(Valenciennes, 1837) como um biomarcador de genotoxicidade em ambiente
costeiro e utilização de teste ecotoxicológico e genotóxico para avaliar
efluente doméstico em *B. saporator*

Toni Pablo Souto Galindo

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ecologia e
Biomonitoramento da Universidade
Federal da Bahia como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
título de mestre em Ecologia e
Biomonitoramento.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mendes da Silva

Salvador – Ba

Maio de 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
BIOMONITORAMENTO

Teste do micronúcleo no peixe marinho *Bathygobius saporator*
(Valenciennes, 1837) como um biomarcador de genotoxicidade em ambiente
costeiro e utilização de teste ecotoxicológico e genotóxico para avaliar
efluente doméstico em *B. saporator*

Toni Pablo Souto Galindo

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mendes da Silva

Salvador – Ba
Maio de 2008

Ficha Catalográfica

Biblioteca Central Reitor Macêdo Costa - UFBA

G158 Galindo, Toni Pablo Souto.

Teste do micronúcleo no peixe marinho *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) como um biomarcador de genotoxicidade em ambiente costeiro e utilização de teste ecotoxicológico e genotóxico para avaliar efluente doméstico em *B. soporator* / Toni Pablo Souto Galindo. - 2008. 79 f. : il.

Inclui anexo.

Orientador : Prof. Dr. Eduardo Mendes da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, 2008.

1. Toxicidade - Testes. 2. Metais. 3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 4. *Bathygobius soporator*. I. Silva, Eduardo Mendes da. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Biologia. III. Título.

CDD - 577
CDU - 504

Comissão Julgadora:

Dr(a). Clarice Torres de Lemos

Prof(a). Dr(a). Marta Margarete Cestari

Prof. Dr. Eduardo Mendes da Silva
Orientador

*Aos meus amigos
e à minha família.*

Agradecimentos

Agradeço à Prf(a). Dra. Lilia Moreira por ter acreditado em minha idéia, iniciado este projeto e orientação da monografia, aos colegas do Laboratório de Genética e Citogênética.

Agradeço à Álvaro Meireles pela ajuda com o transporte dos aquários.

Agradeço à Ubiratam “Bira” pela ajuda com os aquários, transporte, trabalho de campo e toda a ajuda no desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao Prof. Dr. Miguel Acyoli e Camila Fróis pelo empréstimo de equipamento e disponibilidade do espaço do laboratório.

Agradeço aos meus grandes amigos do mestrado Ariane Lima, Elaine Cambuí e Rodrigo Vasconcelos que me apoiaram e ajudaram nas correções. Especialmente a Rodrigo que teve sua L200 atolada na praia, depois batida no fundo de um Palio na volta da coleta de água e por ter tomado banho de chuva durante toda a coleta. Valeu cara e desculpa.

Agradeço aos colegas do mestrado da turma de 2006 pelo engrandecimento na área de ecologia e outras áreas não menos importantes, e aos professores do programa da Pós-Graduação em Ecologia e Biomonitoramento.

Agradeço à Igor Rosário pela ajuda no laboratório e campo como estagiário e monitor.

Agradeço a Luciano da portaria e a Jussara. Aos funcionários Ritinha e Sr. Antônio, à diretora Dra. Marlene e coordenadora do colegiado Herminia por estes 10 anos no Instituto de Biologia, professora Solange Pereira do laboratório Biomarina e os demais professores do IBIO.

Agradeço aos colegas do laboratório (Marenba), que ajudaram no transporte e montagem do experimento de laboratório.

Agradeço aos funcionários do NEA, especialmente Karina Garcia pela atenção.

Agradeço ao departamento de Botânica por ter permitido a utilização da sala de microscopia.

Agradeço à meu irmão Tito que ajudou no trabalho de campo.

Agradeço aos meus pais, familiares e eternos amigos.

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Mendes por todo apoio e aprendizado neste período da minha vida.

Agradeço à Dácio Rolemberg pela ajuda com a Heparina.

Agradeço à EMBASA por ter cedido o efluente e as análises físico-químicas, especialmente a Nilo.

Agradeço à Cíntia por ter me ajudado na fase final do trabalho com os efluentes.

Agradeço aos “HOTSCOPS” pela companhia agradável e aos anônimos que ajudaram a desatolar o carro de Rodrigo na praia e a carregar 300 L de água do mar para o carro, sem eles ainda estaríamos lá. Obrigado!

Agradeço à Igor, Tito e Bira por terem me ajudado nas coletas e correrem risco junto comigo nas praias de Salvador.

Agradeço especialmente a minha mãe que me suporta em sua casa a quatro anos, levando peixes, fazendo muita bagunça. Obrigado por tudo mãe, sua comida é deliciosa, e seu pão-de-queijo não tem igual. Te amo!!!

Lista de Abreviaturas

ACP: Análise de componentes principais
As: Arsênico
BTS: Baía de Todos os Santos
Cd: Cádmio
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cond.: Condutividade
Cr: Cromo
C.R.A: Centro de Recursos Ambientais
Cu: Cobre
DNA: Acido desoxirribonucléico
EROD: Etóxirresorufina-O-desetilase
Hg: Mercúrio
HPA: Hidrocarbonetos policíclos aromáticos
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LDM: Limite de detecção do método
Pb: Chumbo
pH: Potencial de hidrogênio iônico
Primer: Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research
MC: Momento de coleta
Mn: Manganês
MNs: Micronúcleos
ND: Não detectado
OD: Oxigênio dissolvido
PCB: Bifenis policlorinados
PET: Politereftalato de etila
RLAM: Refinaria Landulpho Alves
RNA: Ácido ribonucléico
Salin: Salinidade
T°: Temperatura
UPS: Unidade prática de salinidade
USEPA: Agência de Proteção Ambiental Americana
Zn: Zinco
Sat O₂: Saturação de oxigênio

Índice de Figuras

- Figura 1 - Área de estudo do litoral de Salvador (Bahia, Brasil), mostrando os pontos amostrais e principais riachos 46
- Figura 2 - Frequência de micronúcleos 1000/cels em eritrócitos de *B. saporator* em praias de Salvador, maio de 2007 47
- Figura 3 - Análise dos componentes principais de metais mostrando os dois primeiros eixos 48
- Figura 4 - Área de estudo do litoral de Salvador (Bahia, Brasil), mostrando os pontos amostrais e principais riachos 70
- Figura 5 - Frequência média de micronúcleos em eritrócitos de *B. saporator* coletados em poças-de-maré em Salvador-Ba, 2007 71

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Área de estudo do litoral de Salvador (Bahia, Brasil), mostrando os pontos amostrais e principais riachos	49
Tabela 2 - Metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimento do litoral de Salvador, Bahia, 2007	50
Tabela 3 - Análise dos componentes principais de metais em sedimento com quatro eixos, autovalores, porcentagem da variação e variação cumulativa por eixo	51
Tabela 4 - Escores dos quatro eixos extraídos pela análise de componentes principais	52
Tabela 5 - Mortalidade em adultos de <i>B. soporator</i> coletados em dois pontos do litoral de Salvador-Ba, expostos a diferentes diluições de efluente doméstico	71
Tabela 6 - Variação do pH, oxigênio dissolvido e condutividade de diferentes diluições de efluente doméstico na exposição de <i>B. soporator</i> de dois pontos do litoral da cidade de Salvador (Ba)	73
Tabela 7 - Média de oxigênio dissolvido, pH e condutividade em dias alternados de aquários de aclimação e efluente (10%) em teste de exposição de <i>B. soporator</i> por 10 dias	74

Índice Analítico

Lista de abreviaturas	viii
Índice de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Introdução Geral	1
Objetivo	5
Referências Bibliográficas	6
CAPITULO 1. Utilização do biomarcador genotóxico, micronúcleo pisceo em <i>Bathygobius soporator</i> (Valenciennes, 1873) (Teleostei, Gobiidae) do litoral de Salvador (Ba), Brasil	19
<i>Abstract/Resumo</i>	17
1.1. Introdução	19
2.0. Materiais e Métodos	22
2.1. Área de estudo	22
2.2. Espécie estudada	22
2.3. Preparação de lâminas e análise	23
2.4. Controles negativo e positivo	24
2.5. Análise de metais e HPA	25
2.6. Análise estatística	25
3.0. Resultados	26
4.0. Discussão	28
5.0. Conclusão	29
6.0 Referências Bibliográficas	31

CAPITULO 2. Indução de micronúcleos pelo efluente doméstico em *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae) e toxicidade do efluente doméstico em duas populações de *B. soporator* do litoral de Salvador (Ba), Brasil **53**

<i>Abstract/Resumo</i>	55
1.1. Introdução	56
2.0. Materiais e Métodos	58
3.0. Resultados	59
4.0. Discussão	60
5.0. Conclusão	62
6.0. Referências Bibliográficas	64

Conclusões Gerais **75**

Anexo 1. Guia para autores da revista Marine Pollution Bulletin	I
---	---

INTRODUÇÃO GERAL

Os ambientes aquáticos ao redor do mundo são os mais impactados pelas atividades antropogênicas, sendo o destino final de toneladas de poluentes por ano (White e Rasmussen, 1998; Ohe et al., 2004). Considerando que os poluentes orgânicos e inorgânicos têm sido produzidos e em parte liberados no ambiente sem o devido tratamento, podendo causar efeitos adversos ao nível de ecossistema, comunidades, populações, organismo, sistema, tecidos, celular até molecular (Prá et al., 2005), a avaliação da contaminação destes ecossistemas têm sido de grande interesse nas últimas décadas em todo o mundo (Cardozo et al., 2006). A avaliação de substâncias químicas no ambiente é o principal método para o monitoramento de ambientes impactados, porém, há grande discussão sobre as limitações destas análises, (Claxton et al., 1998), e atualmente, as comunidades biológicas têm sido utilizadas como bioindicadoras, pois respondem aos efeitos adversos de forma mais adequada (ex., Peso-Aguiar et al., 2000; Bervoets et al., 2005; Hatje et al., 2006). Para a avaliação destes efeitos, também são utilizados instrumentos como os biomarcadores, que podem ser definidos como uma mudança na resposta biológica (estendendo-se de nível molecular a celular, e respostas fisiológicas a comportamentais) as quais podem ser relacionadas à exposição ou efeitos de substâncias químicas ambientais (van der Oost et al., 2003).

Biomarcadores têm sido utilizados em estudos de laboratório demonstrando efeitos adversos de substâncias químicas como metais e hidrocarbonetos policíclos aromáticos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Pacheco e Santos, 2002). Dentre os numerosos contaminantes causadores de impactos em ambientes aquáticos, HPA, PCB e metais são de interesse

particular, podendo se acumular em matrizes diversas como água, solo, sedimento, ar e tecidos vivos (Lafabrie et al., 2007). Porém, o sedimento é a matriz onde muitos poluentes se acumulam após sedimentação e adsorção à partículas (McCready et al., 2000; Mendil e Uluözlü, 2007). Os HPA são definidos como uma classe de substâncias compostas de dois ou mais anéis aromáticos, encontrados em misturas complexas com mais de cem compostos individuais, presentes em diversas matrizes, como ar, alimentos, solo, sedimentos, água, além de gêneros alimentícios (Juhasz e Naidu, 2000; Banjoo e Nelson, 2005). Originam-se de fontes naturais, antropogênicas (ver: Aboul-Kassim e Somoneit, 1996, Gogou et al., 1999; Budzinski et al., 1997), pirogênicas e petrogênicas (Arcaro et al., 1999, Bicego et al., 2006). Dezesesseis destes compostos foram incluídos pela Comunidade Européia e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), na lista de poluentes prioritários (Magi et al., 2002; Anyakora et al., 2005). Segundo Song et al. (2006), os HPA e PCB são poluentes orgânicos persistentes no ambiente, têm baixo metabolismo e degradabilidade por muitos organismos vivos, sendo que, os metais são facilmente adsorvidos e tendem a se acumular dentro de partículas do solo, destacando seu potencial tóxico e genotóxico por diversos autores (Trapido e Veldre, 1996; Jongeneelen, 1997; Li e Ro, 1999; Witt e Trost, 1999; Doong e Lin, 2003; Willes, 2004; Wild e Jones, 1995; Burkhardt et al., 2005; Liu et al., 2005; Boonyatumanond et al., 2006; Galloway, 2006; Olivella et al., 2006). Dentre os efeitos adversos destes poluentes destacam-se também: lesões dérmicas, perda de peso corporal, hepatotoxicidade, imunossupressão, toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, distúrbio endócrino e neurotoxicidade (Zhong et al., 1995; Song et al., 2006).

Assim como os HPA, os metais são poluentes de grande interesse atualmente, já que sua contaminação em sedimentos pode afetar a qualidade da água, a bioassimilação e a bioacumulação em organismos aquáticos, resultando em danos potenciais, a longo prazo, para a saúde humana e para o ecossistema (Ip et al., 2007). A principal origem destes poluentes em ambientes costeiros marinhos está relacionada às fontes de poluição em estuários adjacentes e rios, principalmente relacionadas a atividades humanas de origem terrestre, como, mineração, indústria, desenvolvimento urbano, aquicultura intensiva, efluentes não tratados e atividades portuárias (Dalman et al., 2006). Dentre os efeitos adversos, altos níveis de metais despejados em ecossistemas aquáticos podem resultar na eliminação seletiva de muitos estádios de vida de espécies de peixes, distúrbios na regulação de íons, redução na velocidade de natação e redução no crescimento (Bervoets e Blust, 2003), alterações na comunidade de peixes (Bervoets et al., 2005; Hatje et al., 2006), anormalidades morfológicas, distúrbios neurofisiológicos, distúrbios em atividades enzimáticas e hormonais, assim como alteração na taxa de crescimento e aumento da mortalidade (Idris et al., 2007), além de danos no DNA (Knasmüller et al., 1998; Ferraro et al., 2004).

Para detectar os efeitos de poluentes como metais e HPA nos ecossistemas, um dos instrumentos utilizados no monitoramento ambiental são os bioensaios. Uma ferramenta importante nos bioensaios são os testes de mutagênese que detectam danos no material genético (Claxton et al., 1998). Dentre muitos testes de mutagênese empregados no biomonitoramento, ex., ensaio cometa, aberrações nucleares, aberrações cromossômicas, teste smart (Ateeq et al., 2002; Arkhipchuk e Garango, 2005; Buschini et al., 2004; Diekmann et al., 2004; Ferraro et al., 2004; Hayashi et al., 1998), o teste do micronúcleo é

relativamente simples, sensível e tem sido utilizado para avaliar os efeitos de compostos mutagênicos em muitos ambientes (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Micronúcleos correspondem a fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, que estão presentes no citoplasma da célula (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Çavas e Ergene-Gözükara, 2003). Aumentos nas frequências de micronúcleos, resultantes de danos no DNA, são potencialmente causados por agentes mutagênicos, como metais e compostos orgânicos (Ferraro et al., 2004).

Os peixes têm sido amplamente utilizados como organismos sentinela em estudos de impactos ambientais (van der Oost et al., 2003), por sua grande diversidade e facilidade de coleta, fácil manutenção em laboratório e manipulação, além de baixos custos dos métodos e sua distribuição mundial (Hayashi et al., 1998; Rodrigues-Cea et al., 2003; Çavas, et al., 2005). Por estas características, estes organismos são amplamente utilizados em estudos da avaliação de genotoxicidade em ambientes aquáticos pelo teste dos micronúcleos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Inicialmente proposto em eritrócitos de peixes, na década de 1980 (Metcalfe, 1988), o teste com eritrócitos micronucleados permite uma resposta rápida sem sofrimento e sacrifício dos organismos (Missini et al., 1995).

Os efluentes domésticos e industriais são uma das principais fontes de contaminantes para os ecossistemas aquáticos (Claxton et al, 1998). Os efluentes são misturas de natureza química complexa, produzidos por atividades humanas (Castillo et al., 2001). Muitos compostos como metais e HPA, presentes nesta mistura são potencialmente tóxicos e mutagênicos (Cabrera et al., 1999). Atualmente em muitos países, a avaliação de possíveis efeitos adversos destas descargas para o ecossistema são ineficientes, pois são priorizadas apenas análises químicas antes da disposição. Segundo o IBGE, (2002), no Brasil apenas

52,2% dos municípios são atendidos com serviço de coleta de esgoto. Destaca-se que 66,2% dos distritos brasileiros não dão nenhum tipo de tratamento aos esgotos coletados, que são despejados *in natura* nos corpos de água ou no solo (IBGE, 2002). Algumas fontes de substâncias químicas genotóxicas em extratos de águas superficiais e resíduos municipais incluem descargas sanitárias, pesticidas de gramados e jardins, combustão por produtos que entram no sistema municipal via escoamento superficial de estradas, áreas comerciais e industriais, descargas de hospitais e instituições de pesquisa que usam drogas antineoplásicas e genotóxicos experimentais (White e Rasmussen, 1998; Emamnel et al., 2005).

A descarga de efluentes domésticos não tratados em ambientes aquáticos na Bahia ainda é uma das principais fontes de impactos ambientais. Como resultado destes impactos, alguns estudos realizados na Baía de Todos os Santos, no qual esta inserida uma parte do litoral da cidade de Salvador, sugerem que há contaminação com substâncias com potencial tóxico e genotóxicos como metais (Pb, Cr, As e Mn) (Hatje et al., 2006), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e hidrocarbonetos policíclicos alifáticos (Martins et al., 2005). Diferentes pesticidas derivados de efluentes domésticos (Tavares et al., 1988), efluentes de mais de 20 indústrias, atividades agropecuárias, atividade de produção e transporte de petróleo pela Refinaria Landulpho Alves, também contribuem para a poluição, como evidenciado por diversos autores (Porte et al., 1990; Peso-Aguiar et al., 2000; Venturini et al., 2004; Venturini e Tomasi, 2004). O presente trabalho tem como objetivos: (1) avaliar o uso do biomarcador de genotoxicidade pelo teste dos micronúcleos em *Bathygobius soporator*; (2) avaliar a indução de micronúcleos pelo efluente doméstico

na espécie marinha *Bathygobius soporator* e avaliar a toxicidade do efluente doméstico em duas populações desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboul-Kassim, T.A.T., Simoneit, B.R.T., 1996. Lipid geochemistry of surficial sediments from the coastal environment of Egypt I. Aliphatic hydrocarbons - characterization and sources. *Marine Chemistry* 54, 135-158.

Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Genetic Toxicology* 343, 121-135.

Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P., Coker, H., Ukpo, G., Ogah, C., 2005. GC/MS analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in sediment samples from the Niger Delta region. *Chemosphere* 60, 990-997.

Arcaro, K.F., O'Keefe, P.W., Yang, Y., Clayton, W., 1999. Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells. *Toxicology* 133, 115-127.

Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N., 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 42-52.

- Ateeq, B., Farah, M.A., Ali, M.N., Ahmad, W., 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research* 518, 135-144.
- Banjoo, D.R., Nelson, P.K., 2005. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography* 1066, 9-18.
- Bervoets, L., Blust, R., 2003. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environmental Pollution* 126, 9-19.
- Bervoets, L., Knaepkens, G., Eens, M., Blust, R., 2005. Fish community responses to metal pollution. *Environmental Pollution* 138, 338-349.
- Bicego, M.C., Taniguchi, S., Yogui, G.T., Montone, R.C., Silva, D.A.M., Lourenço, R.A., Martins, C.C., Sasaki, S.T., Pellizari, V.H., Weber, R.R., 2006. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and SãoVicente Estuary System, São Paulo, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 52, 1784-1832.
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A., Takada, H., 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. *Marine Pollution Bulletin* 52, 942-956.

- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., PiCrard, C., Garrigues, P., 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58, 85-97.
- Burkhardt, M.R., Zaugg, S.D., Burbank, T.L., Olson, M.C., Iverson, J.L., 2005. Pressurized liquid extraction using water/isopropanol coupled with solid-phase extraction cleanup for semivolatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and alkylated PAH homolog groups in sediment. *Analytica Chimica Acta* 549, 104-116.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A.J.M., Rizzoni, M., 2004. Comet assay and micronucleus test in circulation erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with desinfectantes for potabilization. *Mutation Research* 557, 119-129.
- Cabrera, G.L., Rodriguez, D.M.G., Maruri, A.B., 1999. Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. *Mutation Research* 426, 201-206.
- Cardozo, T.R., Rosa, D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., Oliveira, N.C.D., Pereira, T.S., Pastoriza, T.F., Marques, D.M., Lemos, C.T., Terra, N.R., Vargas, V.M.F., 2006. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutation Research* 603, 83-96.
- Castillo, M., Alonso, M.C., Riu, J., Reinke, M. Klöter, G., Dizer, H., Fischer, B. Hansen, P.D., Barceló, D., 2001. Identification of cytotoxic compounds in European wastewaters during a field experiment. *Analytica Chimica Acta* 426, 265-277.

- Çavas, T., Ergene-Gözükar, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nuclear organizer regions (AgNORs) as cyto-geneotoxicity indicators in *Oreochromis niloticos* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research* 538, 87-91.
- Çavas, T., Garanko N.N., Arkhipchuk, V.V., 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chlorid and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology* 43, 569-574.
- Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research* 410, 237-243.
- Dalman, O., Demirak, A., Balci, A., 2006. Determination of heavy metals (Cd, Pb) and trace elements (Cu, Zn) in sediments and fish of the Southeastern Aegean Sea (Turkey) by atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 95, 157-162
- Diekmann, M., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Braunbeck, T., Nagel, R., 2004. On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquatic Toxicology* 68, 27-37.
- Doong, R., Lin, Y., 2003. Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. *Water Research* 38, 1733-1744.
- Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.M, Vermande, P., 2005. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for

raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal of Hazardous Materials* 117, 1-11.

Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., Ribeiro, C.O., Cestari, M.M., 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and piscine micronucleus and chromosome aberrations test. *Genetic and Molecular Biology* 27, 103-107.

Galloway, T.S., 2006. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Marine Pollution Bulletin* 53, 606-613.

Gogou, A., Bouloubassi I., Stephanou, E.G., 1999. Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea Surficial sediments. *Marine Chemistry* 68, 265-282.

Hatje, V., Barros, F., Figueiredo, D.G., Santos, V.L.C.S., Peso-Aguiar, M.C., 2006. Trace metal contamination and benthic assemblages in Subaé estuarine system, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 52, 982-987.

Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y. F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y., 1998. Development of genotoxicity assay system that use aquatic organisms. *Mutation Research* 399, 125-133.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional de saneamento básico. Relatório técnico. Rio de Janeiro, 2002.

- Idris, A.M., Eltayeb, M.A.H., Potgieter-Vermaak, S.S., Grieken, R.V., Potgieter, J.H., 2007. Assessment of heavy metals pollution in Sudanese harbours along the Red Sea Coast. *Microchemical Journal* 87, 104-112.
- Ip, C.C.M., Li, X., Zhang, G., Wai, O.W.H., Li, Y., 2007. Trace metal distribution in sediments of the Pearl River Estuary and the surrounding coastal area, South China. *Environmental Pollution* 147, 311-323.
- Jongeneelen, F.J., 1997. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *The Science of the Total Environment* 199, 141-149.
- Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: are view of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation* 45, 57-88.
- Knasmüller, S., Gottmann, E., Steinkellner, H., Fomin, A., Pickl, C., Paschke, A., Göd, R., Kundi, M., 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research* 420, 37-48.
- Lafabrie, C., Pergent, G., Kantin, R., Pergent-Martini, C., Gonzalez, C., 2007. Trace metals assessment in water, sediment, mussel and seagrass species – validation of the use of *Posidonia oceanica* as a metal biomonitor. *Chemosphere* 68, 2033-2039
- Li, C., Ro, Y., 2000. Indoor characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere of Taipei. *Atmospheric Environment* 34, 611-620.

- Liu, G.Q., Zhang, G., Li, X.D., Li, J., Peng, X.Z., Qi, S.H., 2005. Sedimentary record of polycyclic aromatic hydrocarbons in a sediment core from the Pearl River Estuary, South China. *Marine Pollution Bulletin* 51, 912-921.
- Magi, E., Bianco, R., Ianni, C., Di Carro, M., 2002. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. *Environmental Pollution* 119, 91-98.
- Martins, L.K.P., Nascimento, I.A., Fillmann, G., King, R., Evangelista, A.J.A., Readman, J.W., Depledge, M., 2005. Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil. *Environmental Research* 99, 387-396.
- McCready, S., Slee, D.J., Birch, G.F., Taylor, S.E., 2000. The distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments of Sydney Harbour, Australia. *Marine Pollution Bulletin* 40, 999-1006.
- Mendil, D., Uluözlü, Ö.D., 2007. Determination of trace metal levels in sediment and five fish species from lakes in Tokat, Turkey. *Food Chemistry* 101, 739-745.
- Metcalf, C.D., 1988. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of Mudminnows (*Umbra limi*) and Brown Bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Environmental Contaminants Toxicology* 40, 489-495.

- Missini, S., Ciccoti, E., Rizzoni, M., 1995. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research* 367, 245-251.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research* 567, 109-149.
- Olivella, M.A., Ribalta, T.G., de Febrer, A.R., Mollet, J.M., de las Heras, F.X.C., 2006. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine waters after Mediterranean forest fires. *Science of the Total Environment* 355, 156-166.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Naphthalene and β -naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. *Environment International* 28, 285-293.
- Peso-Aguiar, M.C., Smith, D.H., Assis, R.C.F., Santa-Isabel, L.M., Peixinho, S., Gouveia, E.P., Almeida, T.C.A., Andrade, W.S., Carqueija, C.R.G., Kelmo, F., Carrozo, G., Rodrigues, C.V., Carvalho, G.C., Jesus, A.C.S., 2000. Effects of petroleum and derivatives in benthic communities at Baía de Todos os Santos/ Todos os Santos bay, Bahia, Brazil. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 3, 459-470.
- Porte, C., Barceló, D., Tavares, T. M., Rocha, V.C., Albaigés, J., 1990. The use of mussel watch and molecular marker concepts in studies of hydrocarbons in a tropical bay (Todos os Santos, Bahia, Brazil). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19, 263-274.

- Prá, D., Lau, A.H., Knakiewicz, T., Carneiro, F.R., Erdtmann, B., 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutation Research* 585, 79-85.
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vasquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for applications in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 442-448.
- Song, Y.F., Wilke, B.M., Song, X.Y., Gong, P., Zhou, Q.X., Yang G.F., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and heavy metals (HMs) as well as their genotoxicity in soil after long-term wastewater irrigation. *Chemosphere* 65, 1859-1868.
- Tavares, T.M., Rocha, V.C., Porte, V.C., Barceló, D., Albaigés, J., 1988. Application of the mussel watch concept in studies of hydrocarbons, PCBs and DDT in the Brazilian Bay of Todos os Santos (Bahia). *Marine Pollution Bulletin* 19, 575-578.
- Trapido, M., Veldre, I., 1996. On polynuclear aromatic hydrocarbons contamination levels in the ecosystem of Lake Peipsi in the 1970s-1980s. *Hydrobiologia* 338, 185-190.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.

- Venturini, N, Tommasi, L, A., Bicego, M.C., Martins, C.C., 2004. Characterization of the benthic environment of a coastal area adjacent to an oil refinery, Todos os Santos Bay (NE-Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography* 5, 123-134.
- Venturini, N., Tomassi, L.R., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons and charges in the trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todos os Santos Bay Northeastern, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 48, 97-107.
- White, P.A., Rasmussen, J.P., 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research* 410, 223-236.
- Wild, S.R., Jones, K.C., 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution* 88, 91-108.
- Willes, M.C., 2004. Chemical and biological methods for the analysis and remediation of environmental contaminants frequently identified at superfund sites. *Dissertação de Doutorado. Graduate Studies of Texas A&M University. Texas, U.S.A.*
- Witt, G., Trost, E., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the Baltic Sea and of the German Coastal Waters. *Chemosphere* 38, 1603-1614.
- Zhong, B.Z., Gu, Z.W., Stewart, J., Ong, T., 1995. Micronucleus formation induced by three polycyclic aromatic hydrocarbons in rat bone marrow and spleen erythrocytes following intratracheal instillation. *Mutation Research* 326, 147-153.

Utilização do biomarcador genotóxico, micronúcleo pisceio em *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1873) (Teleostei, Gobiidae) do litoral de Salvador (Ba), Brasil.

Toni Pablo Souto Galindo*, Eduardo Mendes da Silva

Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-115, Salvador, BA, Brazil.

Fax: + 55 (71) 3283 1145

* Para corresponder com o autor: pablimgalindo@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar o uso do biomarcador de genotoxicidade micronúcleo pisceio em *Bathygobius soporator* do litoral de Salvador (Ba). Neste estudo foram avaliados metais (Cr, Cd, Mn, Pb, Hg, Zn) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com os dezesseis compostos prioritários no sedimento. Foram feitas mensurações de oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água das poças-de-maré. Foi coletado sangue periférico branquial de adultos da espécie marinha *B. soporator* para análise de eritrócitos micronucleados em poças-de-maré de dez pontos do litoral da cidade de Salvador. Os resultados mostraram que a frequência média de micronúcleos foi significativamente mais elevada ($p < 0,05$) na maioria dos pontos amostrais quando comparadas aos controles negativo e positivo em laboratório. Houve uma correlação ($r = -0,743$, $p = -0,023$) pelo teste de correlação de Pearson entre a frequência média de micronúcleos e o primeiro eixo da análise dos componentes principais, no qual este eixo explicou a maior variação dos dados (70,56%). Não foi possível estabelecer uma correlação entre os HPA e a frequência de micronúcleos, porém, concluímos que houve uma correlação entre os metais do sedimento e a frequência de eritrócitos micronucleados dos peixes.

Palavras-chave: genotoxicidade, micronúcleos, metais, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, peixes, *Bathygobius soporator*.

ABSTRACT

The aim of this study was to use the genotoxicity biomarker through micronucleus test in *Bathygobius soporator* in an urban coast environment. Herein we evaluated the metals Cr, Cd, Mn, Pb, Hg, Zn and 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments. The dissolved oxygen, the pH and tide-pools temperature were measured as well. Micronucleus analyses were carried out on peripheral blood erythrocytes of *Bathygobius soporator*. There were significant differences ($p < 005$) in the frequencies of micronuclei between the negative and positive controls and the treatments (ANOVA one-way). Significant correlation was observed ($r = -0,743$, $p = -0,023$) between average frequency of micronucleus and the first axis of principal components analyses (PCA), which explained most of data variation (70,56%). We concluded that there was a correlation between the micronucleus frequency and metals.

keywords: genotoxicity, micronucleus, metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, *Bathygobius soporator*.

1 **1.1 INTRODUÇÃO**

2
3 A poluição ambiental, atualmente, é um problema mundial originado da expansão e
4 atividades urbanas bem como industriais, que produzem centenas de compostos orgânicos e
5 inorgânicos diariamente (Byrne, 1997; Trielli et al., 2007). Danos ao ambiente por
6 atividades antropogênicas não é um fenômeno recente, porém, preocupante pelo seu
7 aumento excessivo em curto espaço de tempo nas últimas décadas (Knapen et al., 2004;
8 Yeung e Petrosyan, 2008). Desde o século XX tem sido produzidas toneladas de poluentes
9 por ano, como metais e compostos orgânicos, como bifenis policlorinados (PCB),
10 pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e alifáticos,
11 dibenzofuranos policlorinados e dibenzodioxinas. Uma parte destas substâncias são
12 liberadas no ambiente (van der Oost et al., 2003), sendo os ecossistemas aquáticos um dos
13 destinos finais (Ohe et al., 2004). A avaliação de substâncias químicas no ambiente é o
14 principal método para o monitoramento de ambientes sujeitos a contaminação, porém, há
15 grande discussão sobre as limitações destas análises (Claxton et al., 1998; Angerer et al.,
16 2007). Testes ecotoxicológicos ou bioensaios, empregados para detectar efeitos adversos de
17 substâncias nos organismos, são uma poderosa ferramenta na identificação, compreensão,
18 avaliação e previsão de risco de compostos tóxicos (Lambolez et al., 1994; da Silva et al.,
19 1998; Boogaard, 2007; Hays et al., 2007). Para a avaliação destes efeitos, também são
20 utilizados instrumentos como os biomarcadores, que podem ser definidos como uma
21 mudança na resposta biológica (estendendo-se de nível molecular a celular, e respostas
22 fisiológicas a comportamentais) as quais podem ser relacionadas à exposição ou efeitos de
23 substâncias químicas ambientais (van der Oost et al., 2003).

24

25 Estudos têm avaliado os efeitos adversos de poluentes nos organismos, sendo que, os
26 metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) têm atraído grande atenção por
27 seus efeitos tóxicos e genotóxicos (Wild e Jones, 1995; Zhong et al., 1995; Trapido e
28 Veldre, 1996; Jongeneelen, 1997; Li e Ro, 1999; Witt e Trost, 1999; Doong e Lin, 2003;
29 Willes, 2004; Burkhardt et al., 2005; Liu et al., 2005; Boonyatumanond et al., 2006;
30 Galloway, 2006; Olivella et al., 2006; Song et al., 2006). As fontes de HPA são de origens
31 diversas (Aboul-Kassim e Simoneit, 1996; Arcaro et al., 1999; Gogou et al., 1999; Bicego
32 et al., 2006; Budzinski et al., 1997) e estes correspondem a uma classe de substâncias
33 compostas de dois ou mais anéis aromáticos, encontrados em misturas complexas com mais
34 de cem substâncias individuais, presentes em diversas matrizes (ver: Juhasz e Naidu, 2000;
35 Banjoo e Nelson, 2005). Dezesesseis destes compostos foram incluídos pela Comunidade
36 Européia e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), na lista de
37 poluentes prioritários (Magi et al., 2002; Anyakora et al., 2005).

38
39 Grande interesse têm sido demonstrado em compostos inorgânicos como metais, já que a
40 contaminação por alguns destes metais em sedimentos, podem afetar a qualidade da água, a
41 bioassimilação e a bioacumulação em organismos aquáticos, resultando em danos
42 potenciais, a longo prazo, para a saúde humana e para o ecossistema (Ip et al., 2007). A
43 origem da entrada destes compostos para o ambiente aquático é derivada principalmente de
44 atividades antropogênicas como, mineração, indústria, desenvolvimento urbano,
45 aquicultura intensiva, efluentes não tratados e atividades portuárias (Dalman et al., 2006).
46 Dentre os efeitos adversos, altos níveis de metais despejados em ecossistemas aquáticos
47 podem resultar na eliminação seletiva de muitos estádios de vida de espécies de peixes
48 (Bervoets et al., 2005), além de distúrbios na regulação de íons, redução na velocidade de

49 natação, redução no crescimento (Bervoets e Blust, 2003), anormalidades morfológicas,
50 distúrbios neurofisiológicos, distúrbios em atividades enzimáticas e hormonais, assim como
51 alteração na taxa de crescimento e aumento da mortalidade (Idris et al., 2007), além de
52 danos no material genético (Knasmüller et al., 1998; Ferraro et al., 2004). Como
53 conseqüência, pode ser esperado, que a poluição por metais, também resultará em
54 alterações na comunidade de peixes (Bervoets et al., 2005; Hatje et al., 2006).

55
56 O teste dos micronúcleos é um ensaio relativamente simples, confiável, sensível e tem sido
57 utilizado para avaliar os efeitos de compostos mutagênicos em diferentes ambientes (Al-
58 Sabti e Metcalfe, 1995; Hayashi et al., 1998), vez que estes correspondem a fragmentos
59 cromossômicos, que aumentam em frequência como resultado de quebras cromossômicas
60 após a ação clastogênica (quebras de cromossomos) ou cromossomos inteiros que não
61 migraram durante a anáfase como resultado de efeitos aneugênicos (indução de aneuploidia
62 e segregação cromossômica anormal) (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Çavas e Ergene-
63 Gözükar, 2003).

64
65 A poluição hoje é um problema mundial que tem afetado a maioria dos ecossistemas, por
66 isso, muitos organismos têm sido utilizados como sentinela no monitoramento ambiental de
67 ambientes impactados (van der Oost et al., 2003). Espécies de diversos grupos são
68 empregadas para estudos de avaliação de impactos, como exemplo do teste dos
69 micronúcleos, utilizando organismos como plantas (Steinkellner et al., 1999), moluscos
70 (Venier e Zampieron, 2005), anfíbios (Lajmanovich et al., 2005), répteis, pássaros e
71 mamíferos (Zúñiga-González et al., 2000; Zúñiga-González et al., 2001) e peixes (Al-Sabti
72 e Metcalfe, 1995). Atualmente, os peixes têm sido amplamente utilizados como organismos
73 sentinela no monitoramento ambiental (van der Oost et al., 2003), e em testes de

74 genotoxicidade pelo teste dos micronúcleos, pois estes parecem responder a xenobióticos
75 de forma semelhante aos mamíferos (Udroiu, 2006). O presente trabalho tem como objetivo
76 avaliar o uso do biomarcador de genotoxicidade pelo teste dos micronúcleos em
77 *Bathygobius soporator* do litoral da cidade de Salvador (Ba).

78

79 **2.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

80

81 **2.1 ÁREA DE ESTUDO**

82

83 A área de estudo compreende o litoral da cidade de Salvador, com aproximadamente 2.8
84 milhões de habitantes (IBGE, 2007), onde as principais fontes de impactos ambientais são o
85 derramamento de efluentes domésticos, principalmente por quatro rios e canais que
86 despejam efluentes domésticos diretamente na zona intertidal (Figura 1), emissário
87 submarino despejando efluentes não tratados a duas milhas da costa próximo aos pontos
88 amostrais cinco, seis e sete, e água de escoamento superficial. Outras fontes de impactos
89 são os despejos de efluentes domésticos e industriais na área da Baía de Todos os Santos,
90 onde efluentes de 29 indústrias e dos principais centros urbanos são drenadas para esta baía
91 que abrange parte do litoral da cidade de Salvador-Ba (Venturini e Tomasi, 2004), e
92 atividades relacionadas ao petróleo da Refinaria Landulpho Alves, localizada ao norte da
93 baía (Peso-Aguiar et al., 2000; Venturini et al., 2004), além de dois portos, o porto de
94 Salvador e porto de Aratú (Porte, et al., 1990), (Figura 1).

95

96 **2.2 ESPÉCIE ESTUDADA**

97

98 Maria-da-Toca (*Bathygobius soporator* Valenciennes, 1837) é um pequeno teleósteo da
99 família Gobiidae, que habita poças-de-maré em regiões costeiras e ilhas oceânicas,

100 ocorrendo em praias rochosas, corais, raízes de mangues, lagunas, rios costeiros, estuários,
101 apresentando uma notável adaptação ao modo de vida bentônico com o desenvolvimento de
102 uma ventosa formada pela união das nadadeiras pélvicas que se fixam ao substrato (Akihito
103 et al., 2000). Sua distribuição é ampla (Lima et al., 2005). Eles se alimentam de
104 invertebrados bentônicos, ovos, zooplâncton e habitam ambientes de grandes variações de
105 salinidade, oxigênio, turbidez e temperatura (Rantin et al., 1997).

106
107 Foram coletados entre 13 e 20 espécimes com armadilhas de garrafas tipo PET
108 (politereftalato de etila) de 500 ml, isca de carne e rede de aquário nas poças-de-maré de
109 dez praias da cidade de Salvador, quando da baixamar, em maio de 2007. No momento da
110 coleta dos peixes, a temperatura foi mensurada em dez réplicas por ponto e amostras de
111 água também em dez réplicas, foram coletadas em tubos Falcon, levadas ao laboratório
112 para medição imediata de oxigênio dissolvido com oxímetro (marca LT Lutron, modelo
113 DO-5510), salinidade com salinômetro (marca Atago, modelo S/Mill) e pH com
114 potenciômetro (Misura Line, modelo ML 1010). Foram coletadas amostras de sedimento
115 superficial (5 cm de profundidade) na zona intertidal, segundo Bicego et al. (2006), com
116 espátula de aço inoxidável, estocados em vasilhas de alumínio (Gogou et al., 2000), para
117 análise de HPA, com os dezesseis compostos prioritários. Para os metais o material foi
118 coletado e armazenado em sacos plásticos nos dez pontos amostrais, os quais foram
119 imediatamente conduzidos para o laboratório em caixa de isopor.

120
121 **2.3 PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PARA O TESTE DE MICRONÚCLEOS E ANÁLISE**

122
123 Após a coleta, os peixes foram colocados em vasilhames plásticos de 10 L com água do
124 mar do próprio ponto amostral (aproximadamente 20 espécimes), transportados

125 imediatamente para o laboratório, onde foram mantidos com aeração constante de oxigênio.
126 Os peixes apresentavam bom aspecto de saúde e o sangue branquial foi coletado o mais
127 rapidamente possível para minimizar o estresse dos organismos que foram manuseados de
128 acordo com as recomendações de Baumans (2005). Em seguida, foram distribuídos em
129 recipientes individuais de plástico de 500 mL com água do próprio ponto amostral,
130 numerados para sorteio de dez exemplares para coleta de sangue branquial por ponto
131 amostral. Foram realizados esfregaços de eritrócitos (Bombail et al., 2001), sem sacrifício
132 dos peixes, que foram devolvidos ao hábitat logo após a coleta do sangue. As lâminas
133 foram fixadas e coradas (Çavas et al., 2005; Grisolia et al., 2005, adaptado). De cada peixe,
134 foram contados 3000 eritrócitos (Metcalf, 1988), em microscópio Zeiss em aumento de
135 1000 X. Micronúcleos foram considerados todas as pequenas inclusões de material nuclear
136 no citoplasma do eritrócito com tamanho variando de 1/3 a 1/20 do núcleo principal,
137 critérios para identificação dos micronúcleos (ver: Al-Sabti e Metcalf, 1995; Çavas et al.,
138 2005).

139 140 2.4 CONTROLES NEGATIVO E POSITIVO

141
142 Dez espécimes de *B. saporator* foram coletados na praia de Stella Maris (Ponto 1) em
143 janeiro de 2006 e mantidos em aquário (72 L) com água destilada e sal marinho em
144 temperatura constante de $(30 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C})$, salinidade de 30 UPS e alimentados com ração para
145 peixe (Tetra Marine) um vez ao dia por 90 dias. Após esse período, uma primeira amostra
146 de sangue periférico foi coletada, e as lâminas foram preparadas para a análise dos
147 micronúcleos segundo o método descrito acima. Cinquenta e cinco dias depois da primeira
148 coleta de sangue branquial periférico, os peixes foram pesados, medidos e submetidos a
149 uma injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (Merck) em cloreto de sódio (4%) com

150 concentração de 40 mg/kg de peso, segundo Grisolia e Starling, (2001). O sangue periférico
151 foi coletado após cinco dias da injeção intraperitoneal, relatado como pico de eritrócitos
152 micronucleados após exposição para muitas espécies de peixes (Udroiu, 2006) e as lâminas
153 foram preparadas para análise como controle positivo (Palhares e Grisolia, 2002).

154

155 2.5 ANÁLISE DE METAIS E HPA

156

157 A análise dos dezesseis compostos prioritários de HPA (naftaleno, acenaftileno, acenafteno,
158 fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno,
159 benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno,
160 benzo[g,h,i]perileno) foi realizada segundo a metodologia da USEPA (2007), em
161 cromatógrafo gasoso (modelo Varian CP3800), com espectrômetro de massa acoplado
162 (marca CG/MS-Varian, modelo Saturn 2200) após extração com o método 8270D
163 (<http://www.epa.gov>). Para a análise de metais, foi feita a extração segundo o método
164 LEM-08 EPA 3051 (<http://www.epa.gov>). Esse método utiliza 0,5 g de amostra em ácido
165 nítrico e água 1:1, digerido em forno de microondas (marca Provecto, modelo DGT 100
166 Plus), segundo a metodologia D5258-92 (ASTM, 1992). Após abertura as amostras foram
167 filtradas em filtro quantitativo (0,80 µM) e avolumadas em balão volumétrico de (50,0 mL)
168 com água deionizada. Posteriormente foram armazenadas em frascos plásticos previamente
169 descontaminados e etiquetados até o início da etapa de leitura. Após a digestão, o material
170 foi filtrado e levado para a leitura no espectrômetro de absorção atômica (marca Varian,
171 modelo SpectrAA 220 FS). Foram utilizados padrões Merck para a construção da curva de
172 calibração do equipamento e 10 brancos para ser calculado o limite de detecção do método
173 (LDM).

174

175 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

176
177 Foi aplicado um teste de análise de variância (ANOVA) de um fator, não paramétrica, após
178 verificação da normalidade e homogeneidade dos dados da frequência de micronúcleos,
179 com os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente (Zar, 1996). O teste
180 posterior de comparações múltiplas de Dunn foi usado para discriminar as diferenças entre
181 o controle negativo e positivo com os demais tratamentos. Posteriormente, foi feita uma
182 análise de componentes principais (ACP) extraído-se os quatro eixos principais com os
183 metais (Mn, Pb, Hg e Zn), com os escores do primeiro eixo (PC1), o qual apresentou a
184 maior explicação da variação dos dados (70,56%), utilizado em uma correlação de Pearson
185 com a frequência média de micronúcleos dos pontos amostrais.

186

187 **3.0 RESULTADOS**

188

189 A Tabela 1 mostra os resultados das variáveis da água em cada ponto amostral. O pH (7,69-
190 8,39) e a temperatura (26,7 - 33,2 °C) apresentaram médias com pouca variação entre todos
191 os pontos amostrais, enquanto que a salinidade apresentou maior variação (17,1 - 36,3
192 UPS), como também o oxigênio dissolvido (3,09 - 8,34 mg/L), e a porcentagem de
193 saturação de oxigênio, com o menor valor no ponto 10.

194

195 As concentrações de metais no sedimento estão abaixo do nível de detecção do método para
196 os metais cádmio e cromo em todos os pontos amostrais (Tabela 2). O manganês teve
197 concentração variando abaixo do nível de detecção a 95,38 mg.kg⁻¹ no ponto 6, enquanto
198 que o chumbo só foi detectado no ponto 10 (31,28 mg.kg⁻¹). O mercúrio teve concentração
199 variando abaixo do nível de detecção nos pontos 1 e 2, e variando de 1,79 a 29,46 µg.kg⁻¹
200 nos demais pontos, e valores mais elevados nos pontos 9 e 10. Por outro lado, o zinco teve

201 concentração abaixo do nível de detecção nos pontos 1 e 2, e variando de 2,8 a 7,448
202 mg.kg⁻¹ nos demais pontos.

203
204 Em todos os pontos amostrais, as concentrações para HPA no sedimento estão abaixo do
205 nível de detecção do método, exceto para o ponto 9, no qual foram detectados os compostos
206 fenantreno (17,76 µg.kg⁻¹), fluoranteno (60,17 µg.kg⁻¹), pireno (43,59 µg.kg⁻¹),
207 benzo(a)antraceno (29,51 µg.kg⁻¹), criseno (27,55 µg.kg⁻¹), benzo(b)fluoranteno (14,19
208 µg.kg⁻¹), benzo(a)pireno (12,01 µg.kg⁻¹) e indeno[1,2,3-cd]pireno (11,19 µg.kg⁻¹).

209
210 A frequência média de micronúcleos foi significativamente mais elevada que o controle
211 negativo em todos os pontos amostrais, exceto no ponto 5. Os pontos 1, 2, 4, 6, 7, 8 e 10
212 apresentaram frequências significativamente mais elevadas em relação ao controle negativo
213 e positivo. Os pontos 3, 5 e 9 apresentaram as menores frequências de micronúcleos, não
214 diferindo significativamente do controle negativo.

215 A análise de componentes principais (Figura 3) extraiu os quatro eixos, no qual, foi
216 utilizado o componente 1, que explicou a maior variação dos dados (70,56%) e autovalores
217 maior que 1 (Tabela 3), em uma correlação de Pearson com a frequência média de
218 micronúcleos, com resultado significativo ($p = -0,023$) e coeficiente de correlação ($r = -$
219 0,7043).

220 221 **4.0 DISCUSSÃO**

222
223 No presente trabalho, houve uma correlação entre os metais e a frequência média de
224 micronúcleos, demonstrada pelo teste de correlação de Pearson com o primeiro componente
225 da análise de componentes principais. Diversos autores têm demonstrado o efeito

226 genotóxico de alguns metais em peixes expostos, como indução de micronúcleos e células
227 binucleadas por Cr, Cu e Cd em *Carassius gibelio* e *Cyprinus carpio* (Çavas et al., 2005),
228 Hg em *Prochilodus nigricans*, *Mylossoma duriventris* e *Hoplias malabaricus* no Rio
229 Madeira (Porto et al., 2004), Hg, Cd e Cu em *Oncorhynchus mykiss* (Al-Sabti, 1995) e em
230 *Carassius gibelio* (Arkhipchuk e Garango, 2005). No entanto, outros estudos mostram
231 resultados conflitantes. Sanchez-Galan et al. (2001) demonstraram a indução de MNs em
232 *Anguilla anguilla* por Cd e Hg, mas não houve efeito significativo para Zn e Cu; Ferraro et
233 al. (2004) não observaram efeito em *H. malabaricus* expostos a Pb pelo teste de MNs;
234 Ayllon e Garcia-Vazquez. (2000) não observaram diferenças significativas em *Phoxinus*
235 *phoxinus* e *Poecilia latipinna* expostos a quatro concentrações de Cd e Hg. Metais como
236 Pb, Hg, Cr e Cd, podem causar danos no material genético como quebras de fita dupla,
237 danos oxidativos, mutações, aberrações cromossômicas, formação de aductos de DNA,
238 efeitos no mecanismo de reparo de DNA e inibição da polimerização dos filamentos de
239 actina durante a divisão celular (Fatur et al., 2002; Sánchez-Galán et al., 2001; Ferraro et
240 al., 2004; Çavas et al., 2005; Porto et al., 2005).

241
242 Devido à maioria das concentrações dos dezesseis compostos prioritários de HPA estarem
243 abaixo do nível de detecção do método nos pontos amostrais, não foi possível estabelecer
244 uma relação de efeito destes compostos com aumento da frequência de MNs. Porém,
245 estudos demonstram também o efeito genotóxico de HPA em organismos expostos
246 (Pacheco e Santos, 1998; Zhong et al., 2005; Binelli et al., 2008; Pan et al., 2008). Os HPA
247 e seus metabólitos nos organismos podem se ligar covalentemente às macromoléculas
248 como DNA, RNA e proteínas, formando aductos que prejudicam suas funções (van der
249 Oost et al., 2003). Atualmente, tem se discutido o fenômeno de sinergismo e antagonismo

250 de diferentes substâncias presentes no ambiente como causadoras de efeitos adversos, e não
251 apenas uma única substância, além da biodisponibilidade e a metabolização pelos
252 organismos expostos (Békaert et al., 2002; Song et al., 2006). Cabrera et al. (1999),
253 ressaltam que os efeitos destas possíveis interações entre substâncias são escassamente
254 conhecidos.

255
256 As concentrações dos compostos prioritários de HPA e os metais Cr e Cd, apresentaram
257 concentrações abaixo dos limites de detecção do método, exceto no ponto 9 para HPA. Os
258 pontos 9 e 10, localizados na BTS, apresentaram maiores concentrações de Hg e Zn, e o Pb
259 foi detectado apenas no ponto 10. A frequência de MNs foi mais elevada que o controle
260 positivo e negativo nos pontos 1, 2, 4, 6, 7, 8 e 10. Ressalta-se que a ciclofosfamida é
261 rotineiramente utilizada em controles positivos por seu comprovado efeito genotóxico em
262 vários estudos com peixes (Ayllon e Garcia-Vazquez, 2000; Campana et al., 1999; Grisolia
263 e Cordeiro, 2000; Rodriguez-Cea et al., 2003; Çavas e Ergene-Gözükara, 2003; Winter et
264 al., 2007). Estes resultados apontam para um alerta de poluição na BTS, à luz das respostas
265 dos organismos produzindo elevadas frequências de micronúcleos, que permitem a
266 detecção de propriedades genotóxicas de compostos presentes no ambiente (Udroiu, 2006).
267 Os pontos 1 e 2, mais distantes do conglomerado urbano, apresentaram o menor grau de
268 contaminação do sedimento, detectando apenas Mn, além dos maiores valores de oxigênio
269 dissolvido. Então, parece haver um efeito de metais sobre a frequência de MNs, o que foi
270 confirmado por um teste de correlação entre os metais e a frequência de micronúcleos.
271 Porém, não foi possível estabelecer uma correlação com os compostos de HPA, também
272 pelas baixas concentrações, mas não se pode afirmar, neste estudo, que não haja efeito

273 genotóxico desses compostos sobre a espécie estudada e interações entre as diferentes

274 substâncias.

275

276 **AGRADECIMENTOS**

277

278 Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

279 e à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão

280 de uma bolsa de mestrado. Igor Rebouças, Ubiratam Outeiro e Tito.

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

299

300 Akihito., Iwata, A., Kobayashi, T., Ikeo, K., Imanishi, T., Ono, H., Umehara, Y.,

301 Hamamatsu, C., Sugiyama, K., Ikeda, Y., Sakamoto, K., Fumihito, A. Ohno, S.,

302 Gojobori, T., 2000. Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic

303 analysis of mitochondrial cytochrome *b* genes. *Gene* 259, 5-15.

304

305 Aboul-Kassim, T.A.T., Simoneit, B.R.T., 1996. Lipid geochemistry of surficial sediments

306 from the coastal environment of Egypt I. Aliphatic hydrocarbons-characterization

307 and sources. *Marine Chemistry* 54, 135-158.

308

309 Al-Sabti, K., 1995. An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity

310 testing in fish. *Mutation Research* 335, 109-120.

311

312 Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water.

313 *Genetic Toxicology* 343, 121-135.

314

315 Angerer, J., Ewers, U., Wilhelm, M., 2007. Human biomonitoring: state of the art.

316 *International Journal of Hygiene Environmental Health* 210, 201-228.

317

318 Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P., Coker, H., Ukpo, G., Ogah, C., 2005. GC/MS

319 analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in sediment samples from the Niger

320 Delta region. *Chemosphere* 60, 990-997.

321

322 Arcaro, K.F., O'Keefe, P.W., Yang, Y., Clayton, W., 1999. Antiestrogenicity of

323 environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells.

324 *Toxicology* 133, 115-127.

- 325
326 Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N., 2005. Using the nucleolar biomarker and the
327 micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*
328 62, 42-52.
- 329
330 ASTM-American Society for Testing Materials. Standard pratic for acid-extraction of
331 elements from sediments using closed vessel microwave heating. ASTM D258-02
332 /1992.
- 333
334 Ayllon, F., Garcia-Vazquez., 2000. Induction of micronuclei and other nuclear
335 abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*:
336 an asesment of he fish micronucleus test. *Mutation Research* 467, 177-186.
- 337
338 Banjoo, D.R., Nelson, P.K., 2005. Improved ultrasonic extraction procedure for the
339 determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of*
340 *Chromatography* 1066, 9-18.
- 341
342 Baumans, V., 2005. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals.
343 Review of Science and Technology Office International des Epizooties 24, 503-514.
- 344
345 Békaert, C., Ferrier, V., Marty, J., Pfohl-Leszkowicz, A., Bispo, A., Jourdain, M.J.,
346 Jauzein, M., Lambomez-Michel, L., Billard, H., 2002. Evaluation of toxic and
347 genotoxic potential of stabilized industrial waste and contaminated soils. *Waste*
348 *Management* 22, 241-247.
- 349
350 Beldowski, J., Pempkowiak, J., 2007. Mercury transformations in marine coastal sediments
351 as derived from mercury concentration and speciation changes along source/sink

- 352 transport pathway (Southern Baltic). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 72, 370-
353 378.
- 354 Bervoets, L., Knaepkens, G., Eens, M., Blust, R., 2005. Fish community responses to metal
355 pollution. *Environmental Pollution* 138, 338-349.
- 357 Bervoets, L., Blust, R., 2003. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio*
358 *gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor.
359 *Environmental Pollution* 126, 9-19.
- 361 Bicego, M.C., Taniguchi, S., Yogui, G.T., Montone, R.C., Silva, D.A.M., Lourenço, R.A.,
362 Martins, C.C., Sasaki, S.T., Pellizari, V.H., Weber, R.R., 2006. Assessment of
363 contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons
364 in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. *Marine*
365 *Pollution Bulletin* 52, 1784-1832.
- 367 Binelli, A., Riva, C., Cogni, D., Provini, A., 2008. Assessment of the genotoxic potential of
368 benzo(a)pyrene and *pp*-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena*
369 *polymorpha*). *Mutation Research* 649, 135-145.
- 371 Boogaard, P.J., 2007. Human biomonitoring activities – programmes by industry.
372 *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 210, 259-261.
- 373 Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A., Takada, H., 2006. Distribution and
374 origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine
375 sediments in Thailand. *Marine Pollution Bulletin* 52, 942-956.
- 377

- 378 Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J., 2001. Application of the comet and
379 micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of
380 Forth, Scotland. *Chemosphere* 44, 383-392.
- 381
382 Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., PiCrard, C., Garrigues, P., 1997. Evaluation of
383 sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary.
384 *Marine Chemistry* 58, 85-97.
- 385
386 Burkhardt, M.R., Zaugg, S.D., Burbank, T.L., Olson, M.C., Iverson, J.L., 2005. Pressurized
387 liquid extraction using water/isopropanol coupled with solid-phase extraction cleanup
388 for semivolatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and
389 alkylated PAH homolog groups in sediment. *Analytica Chimica Acta* 549, 104-116.
- 390
391 Byrne, M.M., 1997. Is growth a dirty word? Pollution, abatement and endogenous growth.
392 *Journal of Development Economics* 54, 261-284.
- 393
394 Cabrera, G.L., Rodriguez, D.M.G., Maruri, A.B., 1999. Genotoxicity of the extracts from
395 the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant
396 bioassays. *Mutation Research* 426, 201-206.
- 397
398 Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J., Dulout, F.N., 1999. Genotoxic evaluation of
399 the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the
400 fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research* 438, 155-161.
- 401
402 Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-
403 stained nuclear organizer regions (AgNORs) as cyto-geneotoxicity indicators in
404 *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research* 538, 87-91.

405

406 Çavas, T., Garanko N.N., Arkhipchuk, V.V., 2005. Induction of micronuclei and binuclei in
407 blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chlorid and
408 copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology* 43, 569-574.

409

410 Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and
411 effluents. *Mutation Research* 410, 237-243.

412

413 CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério do Meio Ambiente.

414

415 Resolução CONAMA nº 344, de 25 de março de 2004. Publicada no DOU no dia 07
416 de maio de 2004.

416

417 da Silva, E.M., Soares, A.M.V.M., Sobral, O.M.F., Lopes, I.M.C.A., Correia, J.F.J.S.,

418

419 Marchante, E.M.D.C., Chastinet, C.B.A., Moreno, A.J.M., 1998. Ecotoxicological
420 responses of isolated mitochondrial systems to complex effluents. Are they
421 worthwhile? *Chemosphere* 37, 2695-2701.

421

422 Dalman, O., Demirak, A., Balci, A., 2006. Determination of heavy metals (Cd, Pb) and
423 trace elements (Cu, Zn) in sediments and fish of the Southeastern Aegean Sea
424 (Turkey) by atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 95, 157-162.

425

426 Di Leonardo, R., Tranchida, G., Bellanca, A., Neri, R., Angelone, M., Mazzola, S., 2006.

427

428 Mercury levels in sediments of central Mediterranean Sea: A 150+ year record from
429 box-cores recovered in the Strait of Sicily. *Chemosphere* 65, 2366-2376.

429

- 430 Doong, R., Lin, Y., 2003. Characterization and distribution of polycyclic aromatic
431 hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River,
432 Taiwan. *Water Research* 38, 1733-1744.
- 433
434 Fatur, T., Tusek, M., Falnogab, I., Scancar, J., Laha, T.T., Filipic, M., 2002. DNA damage
435 and metallothionein synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposed to cadmium
436 *Food and Chemical Toxicology* 40, 1069-1076.
- 437
438 Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., Ribeiro, C.O., Cestari, M.M., 2004.
439 Mutagenic effects of tributyltin and inorganic (PbII) on the fish *H. malabaricus* as
440 evaluated usin the comet assay and piscine micronucleus and chromosome aberrations
441 test. *Genetic and Molecular Biology* 27, 103-107.
- 442
443 Gogou, A., Bouloubassi I., Stephanou, E.G., 1999. Marine organic geochemistry of the
444 Eastern Mediterranean: Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea
445 Surficial sediments. *Marine Chemistry* 68, 265-282.
- 446
447 Galloway, T.S., 2006. Biomarkers in environmental and human health risk assessment.
448 *Marine Pollution Bulletin* 53, 606-613.
- 449
450 Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T., 2000. Variability in micronucleus induction with
451 different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*
452 23, 235-239.

- 453 Grisolia, C.K., Starling, F.L.R.M., 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake
454 Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research*.
455 491, 39-44.
- 456
457 Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B., Bonfim, H., Klautau-Guimarães, N., 2005. Genotoxicity
458 evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genetics
459 and Molecular Biology* 28, 334-338.
- 460
461 Grover, I.S., Kaur, S., 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and
462 industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus
463 assays. *Mutation Research* 426, 183-188.
- 464
465 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contagem da população, censo 2007.
466 Relatório técnico, Brasil, 2007.
- 467
468 Knasmüller, S., Gottmann, E., Steinkellner, H., Fomin, A., Pickl, C., Paschke, A., Göd, R.,
469 Kundi, M., 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils
470 with plant bioassays. *Mutation Research* 420, 37-48.
- 471
472 Lajmanovich, R.C., Cabagna, M., Peltzer, P.M., Stringhini, G.A., Attademo, A.M., 2005.
473 Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia:
474 Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* 587, 67-72.
- 475
476 Leonardo, R., Tranchida, G., Bellanca, A., Néri, R., Angelone, M., Mazzola, S., 2006.
477 Mercury levels in sediments of central Mediterranean Sea: A 150+ year record from
478 box-cores recovered in the Strait of Sicily Rossella. *Chemosphere* 65, 2366-2376.
479

- 480 Li, C., Ro, Y., 2000. Indoor characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the
481 urban atmosphere of Taipei. *Atmospheric Environment* 34, 611-620.
- 482
483 Lima, D., Freitas, J.E.P., Araújo, M.E., Solé-Cava, A.M., 2005. Genetic detection of cryptic
484 species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. *Journal of Experimental Marine*
485 *Biology and Ecology* 302, 211-223.
- 486
487 Liu, G.Q., Zhang, G., Li, X.D., Li, J., Peng, X.Z., Qi, S.H., 2005. Sedimentary record of
488 polycyclic aromatic hydrocarbons in a sediment core from the Pearl River Estuary,
489 South China. *Marine Pollution Bulletin* 51, 912-921.
- 490
491 Knapen, D., Bervoets, L., Verheyen, E., Blust, R., 2004. Resistance to water pollution in
492 natural gudgeon (*Gobio gobio*) populations may be due to genetic adaptation. *Aquatic*
493 *Toxicology* 67, 155-165.
- 494
495 Lambolez, L., Vasseur, P., Ferard, J.F., Gisbert, T., 1994. The environmental risks of
496 industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic
497 toxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28, 317-328.
- 498
499 Magi, E., Bianco, R., Ianni, C., Di Carro, M., 2002. Distribution of polycyclic aromatic
500 hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. *Environmental Pollution* 119, 91-
501 98.
- 502
503 Martins, L.K., Nascimento, I.A., Fillmann, G., King, R., Evangelista, A.J., Readman, J.W.,
504 Depledge, M.H., 2005. Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of
505 chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil. *Environmental Research*

- 506 99, 387-96.
- 507
- 508 Metcalfe C.D., 1988. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the
509 erythrocytes of mudminnows (*Ulbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus*
510 *nebulosus*). Environmental Contamination and Toxicology 40, 498-495.
- 511
- 512 Missini, S., Ciccoti, E., Rizzoni, M., 1995. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus*
513 *plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ
514 detection of mutagens in freshwater. Mutation Research 367, 245-251.
- 515
- 516 Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review.
517 Mutation Research 567, 109-149.
- 518
- 519 Olivella, M.A., Ribalta, T.G., de Febrer, A.R., Mollet, J.M., de las Heras, F.X.C., 2006.
520 Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine waters after
521 Mediterranean forest fires. Science of the Total Environment 355, 156-166.
- 522
- 523 Palhares, D., Grisolia, C.K., 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of
524 kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment.
525 Genetics and Molecular Biology 25, 21-284.
- 526
- 527 Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Naphthalene and β -naphthoflavone effects on *Anguilla*
528 *anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. Environment
529 International 28, 285-293.
- 530

- 531 Pan, L., Miao, J., Wang J., Liu, J., 2008. AHH activity, tissue dose and DNA damage in
532 different tissues of the scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene.
533 *Environmental Pollution* 153, 192-198.
- 534
535 Peso-Aguiar, M.C., Smith, D.H., Assis, R.C.F., Santa-Isabel, L.M., Peixinho, S., Gouveia,
536 E.P., Almeida, T.C.A., Andrade, W.S., Carqueija, C.R.G., Kelmo, F., Carrozo, G.,
537 Rodrigues, C.V., Carvalho, G.C., Jesus, A.C.S., 2000. Effects o petroleum and
538 derivates in benthic communities at Baía de Todos os Santos/ Todos os Santos bay,
539 Bahia, Brazil. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 3, 459-470.
- 540
541 Porte, C., Barceló, D., Tavares, T. M., Rocha, V.C., Albaigés, J., 1990. The use of mussel
542 watch and molecular marker concepts in studies of hydrocarbons in a tropical bay
543 (Todos os Santos, Bahia, Brazil). *Archives of Environmental Contamination and*
544 *Toxicology* 19, 263-274.
- 545
546 Porto, J.I.R., Araújo, C.S.O., Feldberg, E., 2004. Mutagenic effects of mercury pollution as
547 revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Enviromental*
548 *Research* 97, 287-292.
- 549
550 Prá, D., Lau, A.H., Knakievicz, T., Carneiro, F.R., Erdtmann, B., 2005. Environmental
551 genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutation*
552 *Research* 585, 79-85.
- 553
554 Rantin, F.T., Gesser H., Kalinin, A.L., Guerra, C.D.R., De Freitas, J.C., Driedzic, W.R.,
555 1997. Heart perfomance, Ca^{2+} regulation and energy meabolism at high temperatures

- 556 in *Bathygobius soporator*, an tropical marine teleost. *Journal of Thermal Biology* 23,
557 31-39.
- 558
559 Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vasquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater
560 fish species: an evaluation of its sensitivity for applications in field surveys.
561 *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 442-448.
- 562
563 Sánchez-Galán, S., Linde, A. R., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2001. Induction of
564 micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. *Ecotoxicology and*
565 *Environmental Safety* 49, 139-143.
- 566
567 Song, Y.F., Wilke, B.M., Song, X.Y., Gong, P., Zhou, Q.X., Yang, G.F., 2006. Polycyclic
568 aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and heavy metals
569 (HMs) as well as their genotoxicity in soil after long-term wastewater irrigation.
570 *Chemosphere* 65, 1859-1868.
- 571
572 Steinkellner, H., Kassie, F., Knasmuller, S., 1999. *Tradescantia*-micronucleus assay for the
573 assessment of the clastogenicity of Austrian water. *Mutation Research* 426, 113-116.
- 574 Tavares, T.M., Rocha, V.C., Porte, V.C., Barceló, D., Albaigés, J., 1988. Application of the
575 mussel watch concept in studies of hidrocarbons, PCBs and DDT in the Brazilian Bay
576 of Todos os Santos (Bahia). *Marine Pollution Bulletin* 19, 575-578.
- 577
578 Teles, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2003. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-
579 deethylation, glutathione *S*-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and
580 endocrine responses to naphthalene and β -naphthoflavone. *Ecotoxicology and*
581 *Environmental Safety* 55, 98-107.

- 582
583 Trapido, M., Veldre, I., 1996. On polynuclear aromatic hydrocarbons contamination levels
584 in the ecosystem of Lake Peipsi in the 1970s-1980s. *Hydrobiologia* 338, 185-190.
- 585
586 Trielli, F., Amaroli, A., Sifredi, F., Marchi, B., Falugi, C., Corrado, D., 2007. Effects of
587 xenobiotic compounds on the cell activities of *Euplotes crassus*, a single-cell
588 eukaryotic test organism for the study of the pollution of marine sediments. *Aquatic*
589 *Toxicology* 83, 272-283.
- 590
591 Udriou, I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79,
592 201-204.
- 593
594 van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers
595 in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and*
596 *Pharmacology* 13, 57-149.
- 597
598 Venier, P., Zampieron, C., 2005. Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels
599 from the Venice lagoon. *Environment International* 31, 1053-1064.
- 600
601 Venturini, N., Tomassi, L.R., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons and changes in the
602 trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todos os Santos Bay
603 Northeastern, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 48, 97-107.
- 604
605 Venturini, N., Tommasi, L.R., Bicego, M.C., Martins, C.C., 2004. Characterization of the
606 benthic environment of a coastal area adjacent to an oil refinery, Todos os Santos Bay
607 (NE-Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography* 52, 123-134.
- 608

- 609 Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabrii, E., Koehler., 2007. The use of biomarkers in
610 biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollute-induced stress
611 syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146, 281-
612 300.
- 613
614 White, P.A., Rasmussen, J.P., 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface
615 waters. *Mutation Research*, 410, 223-236.
- 616
617 Wild, S.R., Jones, K.C., 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United kingdom
618 environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution* 88,
619 91-108.
- 620
621 Willes, M.C., 2004. Chemical and biological methods for the analysis and remediation of
622 environmental contaminants frequently identified at superfund sites. Tese de
623 Doutorado. Graduate Studies of Texas A&M University, Texas, U.S.A.
- 624
625 Winter, J.M., Ellis, L.C.J., Hutchinson, T.H., 2007. Formation of micronuclei in
626 erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with
627 mitomycin C or cyclophosphamide. *Mutation Research* 629, 89-99.
- 628
629 Witt, G., Trost, E., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the
630 Baltic Sea and of the German Coastal Waters. *Chemosphere* 38, 1603-1614.
- 631
632 Yeung, D.W.K., Petrosyan, L.A., 2008. A cooperative stochastic differential game of
633 transboundary industrial pollution. *Automatica*, In Press.
634 doi:10.1016/j.automatica.2008.03.005
635

- 636 Zhong, B.Z., Gu, Z.W., Stewart, J., Ong, T., 1995. Micronucleus formation induced by
637 three polycyclic aromatic hydrocarbons in rat bone marrow and spleen erythrocytes
638 following intratracheal instillation. *Mutation Research* 326, 147-153.
- 639
640 Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd Ed., Prentice-Hall Int, Upper Saddle River, N.J.
641 662p.
- 642
643 Zúñiga-González, G., Torres-Bugarin, O., Luna-Aguirre, J., Gonzalez-Rodriguez, A.,
644 Zamora-Perez, A., Gomez-Meda, B.C., Ventura-Aguilar, A.J., Ramos-Ibarra, M.L.,
645 Ramos-Mora, A., Ortiz, G.G., Gallegos-Arreola, M.P., 2000. Spontaneous
646 micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals,
647 reptiles and birds): Part two. *Mutation Research* 467, 99-103.
- 648
649 Zúñiga-González, G., Torres-Bugarin, O., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ibarra,
650 M.L.R., Martiez-González, S., Gonsález-Rdiguez, A, Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora,
651 A., Ontiveros-Lira, D., Gallegos-Arreola, M.P., 2001. Differences in the number of
652 micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans
653 Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research* 494, 161-167.
- 654
655
656
657
658
659

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Área de estudo no litoral de Salvador (Bahia, Brasil), mostrando os pontos amostrais e principais riachos.

Figura 2. Frequência de micronúcleos em eritrócitos de *B. saporator* em praias de Salvador, maio de 2007. CN: controle negativo; CP: controle positivo; P (1-10) pontos amostrais. ($\alpha = 0,05$)^a diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle negativo e ^b comparado ao controle positivo.

Figura 3. Análise dos componentes principais de metais mostrando os dois primeiros eixos.

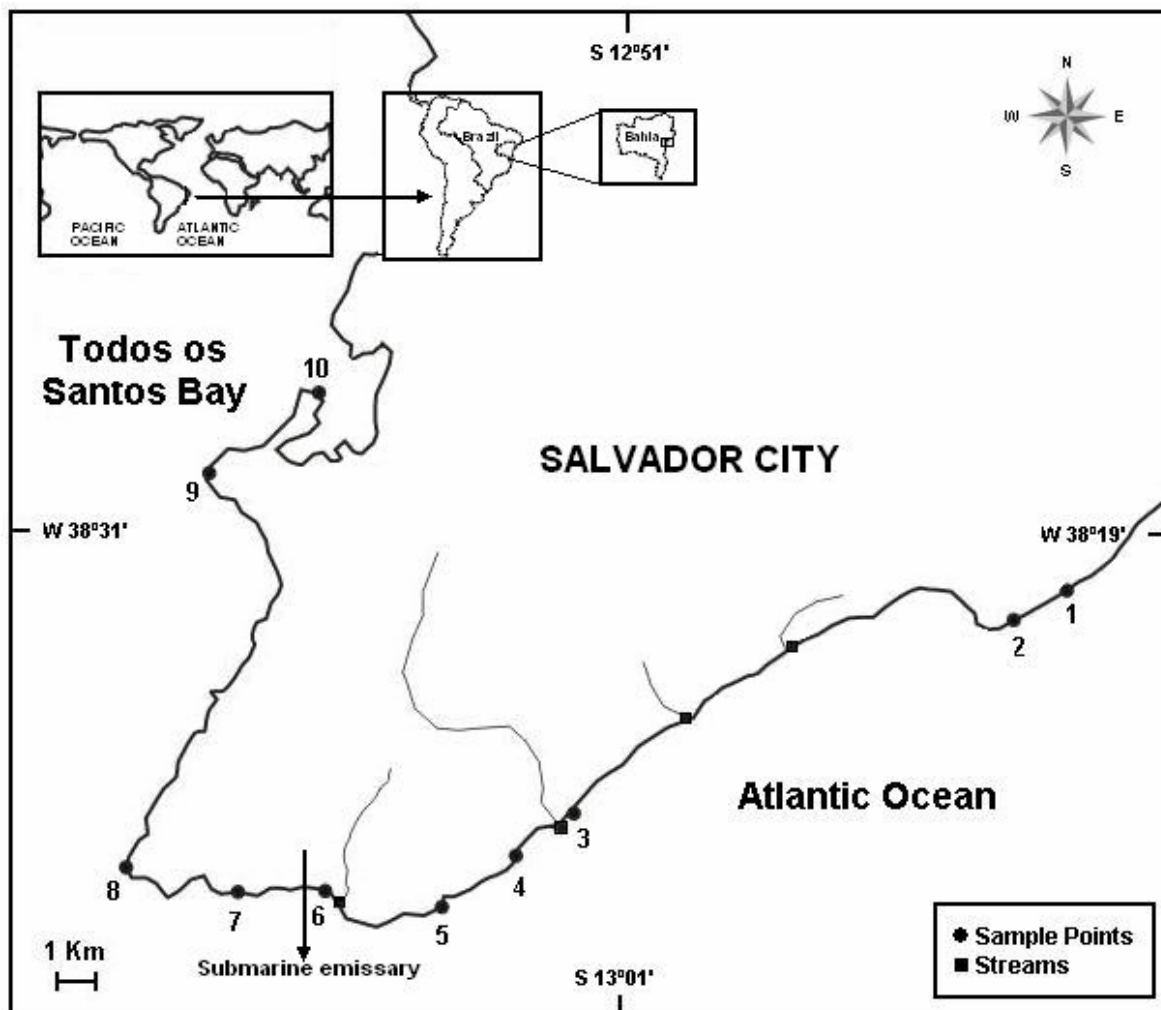


Figura 1.

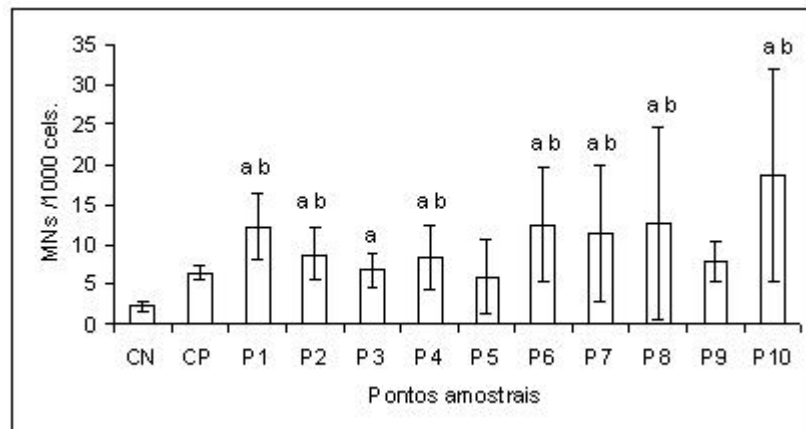


Figura 2.

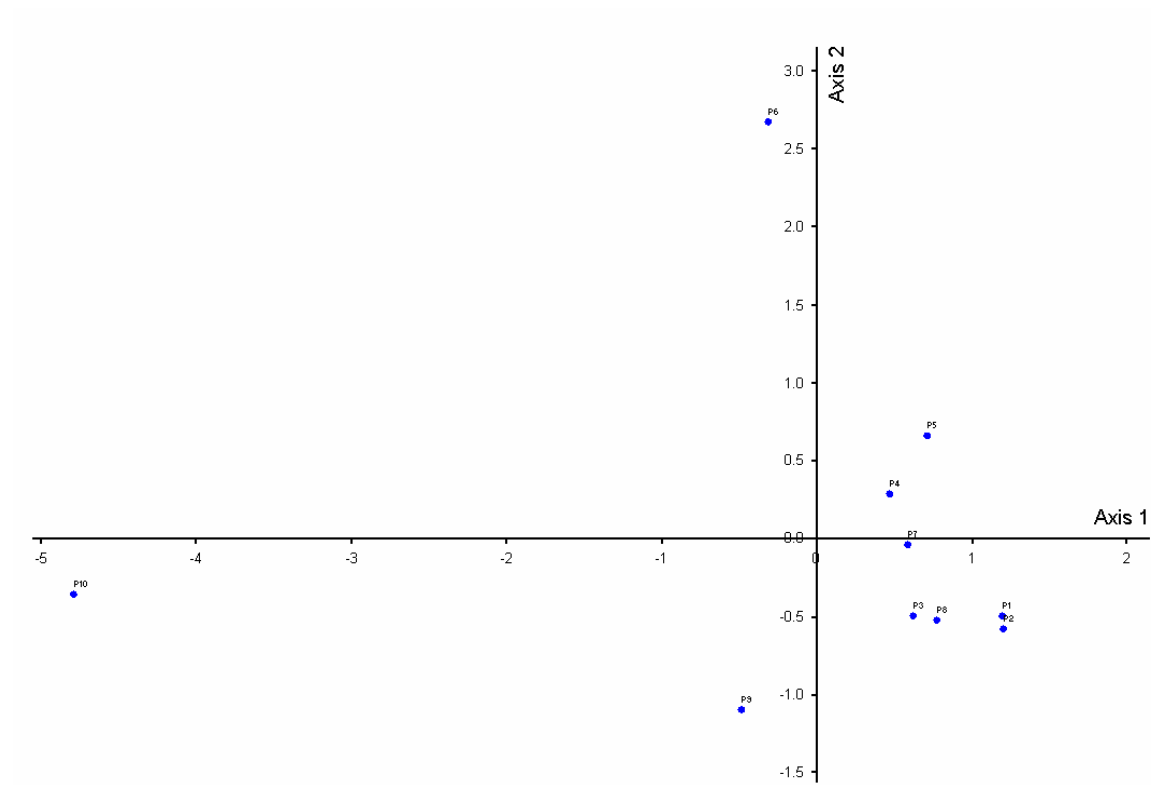


Figura 3.

Tabela 1. Média e desvio padrão da temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, porcentagem de saturação de oxigênio e pH da água das poças-de-maré do litoral de Salvador-Bahia, em maio de 2007.

P. amostrais	T (° C)	Salin. (UPS)	pH	% Sat O₂	OD mg/L
1	27,9 ± 0,74	22,9 ± 4,82	8,19 ± 0,21	105,93	8,22 ± 0,23
2	3,2 ± 1,14	34,11 ± 1,59	8,39 ± 0,18	115,83	8,34 ± 0,36
3	27 ± 0,0	36,3 ± 0,82	8,03 ± 0,11	81,3	6,39 ± 0,98
4	31,6 ± 0,52	33,1 ± 8,49	8,30 ± 0,08	100,41	7,39 ± 0,28
5	26,7 ± 0,67	18,8 ± 10,24	8,39 ± 0,25	107,85	8,52 ± 0,78
6	29,8 ± 0,79	31,6 ± 2,46	8,13 ± 0,07	99,07	7,48 ± 0,08
7	27 ± 0,47	36,3 ± 0,95	7,76 ± 0,16	86,26	6,78 ± 1,02
8	27 ± 0,94	31,9 ± 5,88	8,06 ± 0,11	92,37	7,16 ± 1,03
9	27,5 ± 0,71	17,1 ± 3,54	8,15 ± 0,08	87,19	6,81 ± 1,11
10	28,5 ± 0,53	23,9 ± 5,3	7,69 ± 0,13	40,19	3,09 ± 1,26

Tabela 2. Metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimento do litoral de Salvador, Bahia, 2007.

Metais mg/kg⁻¹	LDM	Conama	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cr	6,07	81	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Mn	7,28		16,869	14,907	16,263	35,814	45,682	95,38	27,728	15,769	<LDM	25,978
Cd	0,892	1.2	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Pb	10,053	46,7	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	31,284
Hg (µg/kg-1)	0,001	0,15	< LDM	< LDM	1,79	4,08	2,37	10,76	2,91	2,52	15,44	29,46
Zn	2,761	150	< LDM	< LDM	5,009	4,676	3,107	7,448	4,397	2,814	7,633	23,538
HPA µg/kg-1	LDM	Conama										
Naftaleno	10	160	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaftileno	10		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acenafteno	10	44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fluoreno	10	19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenantreno	10	240	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	17,76	ND
Antraceno	10	85	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fluoranteno	10	600	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	60,17	ND
Pireno	10	665	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	43,59	ND
Benzo(a)antraceno	10		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29,51	ND
Criseno	10	108	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	27,55	ND
Benzo(b)fluoranteno	10		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14,19	ND
Benzo(k)fluoranteno	10		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benzo(a)pireno	10	89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12,01	ND
Indeno[1,2,3-cd]pireno	10		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11,19	ND
Dibenzo[a,h]antraceno	10		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benzo[g,h,i]perileno	10		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

LDM: limite de detecção do método (mg/kg⁻¹ HPA); ND: não detectado (mg/kg⁻¹ Cr, Mn

Cd, Pb ,Zn e µg/kg⁻¹ para Hg); CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente, resolução 344/2004.

Tabela 3. Análise dos componentes principais com quatro eixos, autovalores, porcentagem da variação e variação cumulativa por eixo de metais.

Eixos	Autovalores	% variação	% var. cumulativa
1	2,822	70,561	70,561
2	1,01	25,248	95,809
3	0,144	3,606	99,416
4	0,023	0,584	100

Tabela 4. Escores dos quatro eixos extraídos pela análise de componentes principais dos metais.

	Eixos			
	1	2	3	4
P1	1,2003	-0,5019	0,2902	-0,2091
P2	1,2034	-0,5797	0,2821	-0,2044
P3	0,6221	-0,4963	0,0882	0,3214
P4	0,4737	0,2811	0,0042	0,1056
P5	0,7146	0,6609	0,1921	-0,0192
P6	-0,3089	2,6691	-0,2809	-0,0597
P7	0,5881	-0,043	0,061	0,155
P8	0,7782	-0,5262	0,0618	0,0062
P9	-0,4826	-1,1026	-1,0215	-0,0726
P10	-4,7889	-0,3614	0,3228	-0,0232

Indução de micronúcleos pelo efluente doméstico em *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae) e toxicidade do efluente doméstico em duas populações de *B. soporator* do litoral de Salvador (Ba), Brasil.

Toni Pablo Souto Galindo*, Eduardo Mendes da Silva

Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-115, Salvador, BA, Brazil.

Fax: + 55 (71) 3283 1145

* Para corresponder com o autor: pablimgalindo@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a indução de micronúcleos pelo efluente doméstico na espécie marinha *Bathygobius soporator*, avaliar a toxicidade do efluente doméstico em duas populações de *B. soporator*, uma em ambiente com presença de metais e outra livre de metais. Foi coletado sangue branquial aleatoriamente de dez peixes do ambiente natural para frequência basal de micronúcleos, e mais trinta indivíduos foram coletados no mesmo ponto e levados ao laboratório para aclimatação por trinta dias, sendo coletado então sangue branquial após trinta dias de aclimatação em aquários sobre condições controladas. Os peixes restantes foram utilizados para uma exposição ao efluente doméstico diluído a 10% por dez dias, com coleta de sangue periférico nos momentos cinco e dez dias de exposição. Adicionalmente, foi feito teste ecotoxicológico na mesma espécie com diluições de 0, 1, 3, 7, 10 e 30 % de efluente doméstico, expostos por 48 h, em populações de dois pontos do litoral, um contaminado com metais e outro livre de contaminação. Mensurações de pH, salinidade e oxigênio dissolvido foram realizadas no início, durante e no final dos testes de exposição. Os resultados deste estudo mostraram que houve mortalidade três vezes maior de adultos de *B. soporator* expostos ao efluente doméstico no ponto livre de metais em relação ao ponto com metais. Houve também, indução de micronúcleos nesta mesma espécie à diluição de 10 % após 5 e 10 dias de exposição ao efluente doméstico, com maior frequência média após 10 dias diferindo significativamente ($p < 0,01$) em relação ao nível basal do ponto de coleta dos espécimes.

Palavras-chave: micronúcleos, efluente doméstico, genotoxicidade, toxicidade, peixes, *Bathygobius soporator*.

ABSTRACT

Fish micronuclei tests were used to evaluate the ability of municipal wastewater sewage to cause genetic damage in *Bathygobius soporator* and evaluate the toxicity of municipal wastewater sewage in two populations of *B. Soporator*, one in area with presence of metals and other free metals. Blood samples of ten fish were caught in natural environment for levels of spontaneous micronucleated erythrocytes and 30 specimens were caught and to conduct laboratory for 30 days acclimation. Blood samples were collected after thirty days of acclimation in conditions controlled and remainder specimens were exposed to concentration 10 % of the urban effluents for 10 days. The acute toxicity experiments were carried out to different concentrations (0, 1, 3, 7, 10, and 30%) of urban effluent for 48-h in two populations of *B. Soporator*. The results of this study showed that there was mortality threefolds higher than of fish exposed to the urban effluente in the population of the area free from metals in comparison between the area with metals. There were micronucleus induction in the fish after 10 days of exposed to the urban effluente and there were significant differences ($p < 0,01$) only after 10 days in comparison to spontaneous micronucleus levels. We concluded that were micronucleus induction for urban effluent and mortality of adults fish in the population of the area free from metals higher than to the area with metals.

Keywords: micronucleus, urban effluent, genotoxicity, toxicity, *Bathygobius soporator*.

1 1.1 INTRODUÇÃO

2

3 Dentre as principais fontes de poluição para os ecossistemas aquáticos no mundo destacam-

4 se os efluentes domésticos e industriais, que tem recebido grande atenção por seus efeitos

5 adversos nos organismos e ecossistema (Ohe et al., 2004). Os efluentes são misturas de

6 natureza química complexa, produzidos por atividades humanas (Castillo et al., 2001). A

7 agência de proteção ambiental americana registrou que no ano de 1994, 22,744 fábricas

8 liberaram 432 toneladas de substâncias tóxicas no ambiente, das quais 2,9 % foram

9 despejadas em águas superficiais (Claxton et al., 1998). Muitos compostos como metais e

10 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), pesticidas, bifenis policlorados (PCB),

11 dioxinas, furanos e aminas heterocíclicas presentes nesta mistura são potencialmente

12 tóxicas e mutagênicas (Jensen e Helz, 1998; Rank e Nielsen, 1998; Cabrera et al., 1999;

13 Grisolia e Starling, 2001; Cardozo et al., 2006). Atualmente, em muitos países, a avaliação

14 de possíveis efeitos adversos destas descargas para o ecossistema são inefficientes, pois são

15 priorizadas apenas análises químicas antes da disposição (Bobeldijk et al., 2002). Algumas

16 fontes de substâncias químicas genotóxicas em extratos de águas superficiais e resíduos

17 municipais incluem descargas sanitárias, pesticidas de gramados e jardins, combustão por

18 produtos que entram no sistema municipal via escoamento superficial de estradas, áreas

19 comerciais e industriais, descargas de hospitais e instituições de pesquisa que usam drogas

20 antineoplásicas e genotóxicos experimentais (White e Rasmussen, 1998; Emamnel et al.,

21 2005).

22

23 O potencial de toxicidade destas misturas complexas ainda esta sobre discussão na

24 literatura científica, porém, a maioria dos estudos foram realizados principalmente em

25 bactérias (Claxton et al., 1998; Siddiqui e Ahmad, 2003), e outros organismos como

26 leveduras (Schmitt et al., 2005), plantas (Smaka-Kincl, 1996; Grover e Kaur, 1999),
27 anfíbios (Godet et al., 1996; Zoll-Moreux e Ferrier, 1999), células de mamíferos
28 (Reifferscheid et al., 2008) e peixes (Dizer et al., 2002). O efeito mutagênico e
29 carcinogênico de substâncias individuais que podem estar presentes nestas misturas são
30 bem conhecidos (Cabrera et al., 1999). Substâncias contaminantes tóxicas liberadas na água
31 podem não mostrar efeitos agudos em organismos expostos, porém, podem causar redução
32 de sobrevivência, danos teciduais, danos genéticos de células somáticas e germinativas,
33 acumulação de contaminantes persistentes (White e Rasmussen, 1998) e doenças como
34 câncer e neoplasias (Myers et al., 1998).

35
36 Muitas espécies aquáticas são capazes de sobreviver em ambientes os quais contêm altos
37 níveis de toxinas naturais ou poluentes antropogênicos, como locais sujeitos à descarga de
38 efluentes (Bard, 2000). Os níveis de certos contaminantes nos tecidos destes organismos
39 são mantidos abaixo daqueles observados no ambiente, sugerindo que esta resistência é
40 mediada pelo fenômeno de resistência multixenobiótica, o qual, é muito semelhante ao
41 fenômeno de resistência multidrogas, primeiramente observado em linhagens de células
42 tumorais resistentes a drogas anticâncer (van der Oost et al., 2003). O mecanismo de
43 resistência multixenobiótica funciona como uma bomba dependente de energia que remove
44 substâncias xenobióticas e endógenas das células, prevenindo sua acumulação e efeitos
45 citotóxicos, sendo que, a proteína responsável por esta função de transporte é a P-
46 glicoproteína transmembrana (Kurelec et al., 1995). Neste contexto, o objetivo deste
47 trabalho foi avaliar a indução de micronúcleos pelo efluente doméstico na espécie marinha
48 *Bathygobius soporator* e avaliar a toxicidade do efluente doméstico em duas populações
49 desta espécie, uma em ambiente com presença de metais e outra livre de metais.

50 2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

51
52 O efluente doméstico foi coletado na estação de condicionamento prévio da Embasa
53 (Empresa Baiana de Águas e Saneamento S.A.) em janeiro de 2008. Este efluente
54 corresponde ao efluente produzido na cidade de Salvador, sem tratamento, com a retirada
55 apenas de resíduos sólidos grosseiros, que é então, conduzido pelo emissário submarino e
56 lançado diretamente no mar na região do Rio Vermelho (8,3 mil litros.seg⁻¹ a 2,0 mi de
57 distância da costa). O efluente foi levado ao laboratório, diluído para a realização dos testes
58 ecotoxicológicos e genotóxicos.

59
60 Foram coletadas amostras de sedimento superficial dos pontos P1 e P3 (5 cm de
61 profundidade) na zona intertidal, segundo Bicego et al. (2006), com espátula de aço
62 inoxidável, estocados em vasilhas de alumínio (Gogou et al., 2000). A amostra foi coletada
63 e armazenada em sacos plásticos nos dez pontos amostrais, os quais foram imediatamente
64 conduzidos para o laboratório em caixa de isopor. Para a análise de metais, foi feita a
65 extração segundo o método LEM-08 EPA 3051 (<http://www.epa.gov>). Esse método utiliza
66 0,5 g de amostra em ácido nítrico e água 1:1, digerido em forno de microondas (marca
67 Provecto, modelo DGT 100 Plus), segundo a metodologia D5258-92 (ASTM, 1992). Após
68 abertura as amostras foram filtradas em filtro quantitativo (0,80 µM) e avolumadas em
69 balão volumétrico de (50,0 mL) com água deionizada. Posteriormente foram armazenadas
70 em frascos plásticos previamente descontaminados e etiquetados até o início da etapa de
71 leitura. Após a digestão, o material foi filtrado e levado para a leitura no espectrômetro de
72 absorção atômica (marca Varian, modelo SpectrAA 220 FS). Foram utilizados padrões
73 Merck para a construção da curva de calibração do equipamento e 10 brancos para ser
74 calculado o limite de detecção do método (LDM).

75 Foram coletadas aleatoriamente entre 20-25 espécimes de *B. saporator* nos pontos P1 e P3
76 em maio de 2007. Após a coleta, os peixes foram colocados em vasilhames plásticos de 10
77 L com água do mar do próprio ponto amostral, transportados imediatamente para o
78 laboratório, onde foram mantidos com aeração constante. Em seguida, foram distribuídos
79 em recipientes individuais de plástico de 500 mL com água do próprio ponto amostral,
80 numerados para sorteio de dez exemplares para coleta de sangue branquial por ponto
81 amostral. Foram realizados esfregaços de eritrócitos (Bombail et al., 2001), sem sacrifício
82 dos peixes, que foram devolvidos ao hábitat logo após a coleta do sangue. As lâminas
83 foram fixadas e coradas (Çavas et al., 2005; Grisolia et al., 2005, adaptado). De cada peixe,
84 foram contados 3.000 eritrócitos (Metcalf, 1988), em microscópio Zeiss em aumento de
85 1.000 X. Micronúcleos foram considerados todas as pequenas inclusões de material nuclear
86 no citoplasma do eritrócito com tamanho variando de 1/3 a 1/20 do núcleo principal,
87 critérios para identificação dos micronúcleos (ver: Al-Sabti e Metcalf, 1995; Çavas et al.,
88 2005).

89
90 Em janeiro de 2008, foram coletadas quarenta e oito espécimes de *B. saporator* por ponto
91 amostral em dois pontos (P1 e P3) no litoral de Salvador-Ba (Figura 1), que foram levados
92 ao laboratório e aclimatados em aquários com água do ponto 1 (72 L) por 24 h, temperatura
93 controlada ($26 \pm 3^\circ \text{C}$) e manuseados segundo Baumans (2005). Em cada ponto amostral
94 foram expostos oito exemplares por diluição do efluente doméstico 0, 1, 3, 7, 10, 30%,
95 diluído com água mar filtrada (200 μm) do ponto 1. Foram utilizados frascos plásticos (2-3
96 indivíduos por frasco) de 500 mL com aeração constante. A contagem dos indivíduos
97 mortos foi feita nos momentos $\frac{1}{4}$, $\frac{3}{4}$, 3, 9, 24 e 48 h. Foram feitas mensurações de pH com
98 potenciômetro Misura Line, modelo ML 1010, oxigênio dissolvido com oxímetro LT

99 Lutron, modelo DO-5510, e condutividade através de condutivímetro Hanna Instruments,
100 modelo HI 9030, antes, durante e no final do teste de exposição ao efluente, além da
101 salinidade com salinômetro (marca Atago, modelo S/Mill).

102
103 Para avaliar o efeito da exposição dos peixes por um período de 10 dias ao efluente
104 doméstico em laboratório, em dezembro de 2007, amostras de sangue periférico foram
105 coletadas de dez indivíduos de *B. saporator* capturados aleatoriamente no ponto 2 (Figura
106 2) para a determinação da frequência basal de micronúcleos desta espécie neste ponto.

107 Adicionalmente, 30 espécimes de *B. saporator* foram coletados no ponto 2, conduzidos ao
108 laboratório, aclimatados em aquários de 72 L com água do mar previamente filtrada (200
109 μm) do ponto 1, por 30 dias, sendo alimentados uma vez ao dia com ração (Tetra Marine).

110 Após 30 dias de aclimação destes peixes em laboratório, foi feita nova coleta de sangue
111 periférico por sorteio de dez indivíduos dos aquários para observação de um possível efeito
112 do estresse de confinamento sobre a frequência de micronúcleos dos espécimes em
113 cativeiro. Os mesmos peixes aclimatados nos aquários foram então utilizados para o teste
114 de exposição ao efluente doméstico diluído a 10 % com a água dos aquários, com coleta de
115 sangue periférico de dez indivíduos sorteados nos momentos cinco e dez dias de exposição
116 ao efluente. A exposição dos peixes foi feita em frascos plásticos de 500 mL com aeração
117 constante e temperatura constante ($26 \pm 3^\circ \text{C}$). Foram mensurados pH, oxigênio dissolvido
118 e condutividade em dias alternados no momento da exposição com os mesmos
119 equipamentos descritos acima.

120

121 Foi aplicado um teste de análise de variância (ANOVA) de um fator, não paramétrica, após
122 verificação da normalidade e homogeneidade dos dados da frequência de micronúcleos,
123 com os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente (Zar, 1996).

124

125 **3.0 RESULTADOS**

126

127 No teste ecotoxicológico os dois pontos com maior e menor grau de contaminação do
128 sedimento, mostraram que o ponto 3, com maior frequência média de MNs (18,53/1000
129 cels) (Figura 1) e presença de metais (Pb 31,28 mg.kg⁻¹, Hg 29,46 µg.kg⁻¹, Zn 25,53 mg.kg⁻¹)
130 ¹) (Tabela 1) apresentou menor mortalidade no total de todos os tratamentos (6 mortos), e o
131 ponto 1 com todos os metais abaixo do limite de detecção do método e frequência média de
132 MNs (8,73/1000 cels), apresentou mortalidade três vezes mais elevada (19 indivíduos),
133 (Tabela 2).

134

135 A salinidade variou de 35 a 33 ‰ nas diluições, porém, com menor valor (25‰) na
136 diluição de 30%. Não houve uma grande variação do pH do efluente nos diferentes
137 tratamentos e momentos do teste (Tabela 3). O oxigênio dissolvido teve pouca variação
138 entre os tratamentos e etapas do teste, com menor valor nas diluições 10 e 30% no início da
139 exposição (Tabela 3).

140

141 Não houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência média de
142 micronúcleos do momento da coleta dos peixes no ambiente e após trinta dias de
143 aclimatação em aquários, com pequeno decréscimo no último. Houve indução de
144 micronúcleos em *B. soporator* exposto ao efluente doméstico a 10% nos momentos de

145 exposição cinco e dez dias, comparados à frequência basal, porém houve diferença
146 significativa ($p < 0,005$) apenas no último (Figura 2).
147
148 Não houve grande variação do pH nos aquários de aclimatação e no efluente doméstico no
149 teste de exposição de dez dias. A média de oxigênio dissolvido e condutividade foram mais
150 elevadas nos aquários de aclimatação em relação aos efluentes domésticos diluídos a 10%
151 (Tabela 4).

152 153 **4.0 DISCUSSÃO**

154
155 Embora, as análises químicas sejam o método primário comumente utilizado para avaliar o
156 potencial de toxicidade de efluentes, devido à complexidade química (Cardozo et al., 2006),
157 ressalta-se as limitações desta extrapolação, portanto, nenhum programa de
158 biomonitoramento deve ser baseado unicamente em análise química, a qual não fornece
159 informações suficientes para a análise de risco ecológico (Castillo et al., 2001). Em
160 contraste, os bioensaios demonstram os efeitos em análises de toxicidade de misturas
161 complexas, sem um conhecimento *a priori* da composição química da mistura. Claxton et
162 al. (1998) argumentam que, a utilização conjunta de análises químicas e bioensaios
163 aumentam a confiabilidade destes testes, permitindo ainda o isolamento e identificação de
164 frações que contêm atividade genotóxica.

165
166 O presente estudo mostrou que a população de *B. soporator* do ponto livre de contaminação
167 (P1) teve mortalidade três vezes mais elevada em comparação ao ponto com metais (P3).
168 Estudos demonstram que espécies de ambientes prístinos são mais susceptíveis a efeitos
169 adversos que espécies de ambientes impactados em casos de acidentes como
170 derramamentos de óleos (Bard, 2000), comuns em locais de atividades de petróleo. A

171 resistência multixenobiótica em espécies expostas é explicada pela superexpressão da P-
172 glicoproteína transmembrana que previne a acumulação de drogas citotóxicas em células
173 resistentes, além do sistema de detoxificação de fase I, II e III (Bard, 2000; van der Oost et
174 al., 2003). Este mecanismo de resistência foi encontrado em diversos animais marinhos e
175 representa o mecanismo de defesa geral de proteção contra toxinas endógenas e ambientais
176 (Kurelec et al., 1995; Moreau et al., 2008). Processos naturais também estão relacionados
177 ao mecanismo de resistência, como mudança na diversidade genética de uma população
178 exposta através da deriva genética randômica, fluxo gênico após redução drástica no
179 tamanho populacional e seleção de um caráter após seleção dirigida causada por estresse
180 ambiental de poluentes (Knapen et al., 2004; Medina et al., 2007), que explicariam
181 mudanças rápidas na diversidade genética das populações expostas.

182
183 Neste estudo foi evidenciado efeito genotóxico pela indução de micronúcleos em eritrócitos
184 na espécie *B. soporator* do ponto 2 exposta a efluente doméstico por 5 e 10 dias. Diversos
185 autores têm demonstrado o potencial mutagênico em misturas complexas de efluentes
186 domésticos e industriais com testes de genotoxicidade (Cabrera et al., 1999; Castillo et al.,
187 2001; Békaert et al., 2002). Estudos para avaliar o potencial mutagênico de efluentes
188 relatado por Claxton et al. (1988), apontam que, 60% emprega o teste com *Salmonella*, pela
189 facilidade e baixo custo, porém, atualmente, outros organismos estão sendo empregados
190 como sentinela, dentre eles os peixes (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; van der Oost et al, 2003).
191 Os peixes de água doce são os mais utilizados no monitoramento devido à facilidade de
192 manutenção em laboratório de muitas espécies, acessibilidade aos ambientes e facilidade de
193 coleta, mas estes ambientes representam uma pequena porcentagem dos ambientes
194 aquáticos no mundo em comparação aos ambientes marinhos. Grisolia et al. (2005)

195 avaliaram a exposição de duas espécies de peixe de água doce ao efluente doméstico após o
196 processo de tratamento de três etapas, e não encontrou indução de micronúcleos, porém,
197 houve diminuição do índice mitótico em raiz de *Allium cepa* na exposição do efluente
198 bruto, e no tratamento secundário e terciário. Em outro estudo, Grisolia e Starling. (2001)
199 demonstraram diferenças não significativas de micronúcleos em pontos do Lago Paranoá
200 (DF), sujeitos à descarga de efluentes em três espécies de água doce.

201
202 Como conclusão este estudo demonstra que a população de *B. saporator* do ponto livre de
203 contaminação (P1) teve mortalidade três vezes mais elevada em comparação ao ponto com
204 metais (P3). O teste de micronúcleos em eritrócitos do peixe marinho *B. saporator*
205 demonstrou indução de micronúcleos em peixes do ponto 2 expostos ao efluente doméstico
206 após cinco e dez dias. Este trabalho, em acordo com outros estudos já citados, demonstra
207 que houve efeito genotóxico na exposição ao efluente doméstico, com indução três vezes
208 superior em relação à frequência basal.

209
210

211 AGRADECIMENTOS

212
213 Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
214 Tecnológico), a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).
215 Cíntia e Ubiratam Outeiro.

216
217

218

219

220

221 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS**

- 222
223 Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water.
224 Genetic Toxicology 343, 121-135.
- 225
226 ASTM-American Society for Testing Materials. Standard pratic for acid-extraction of
227 elements from sediments using closed vessel microwave heating. ASTM D258-02
228 /1992.
- 229
230 Baumans, V., 2005. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals.
231 Review of Science and Technology Office International des Epizooties 24, 503-514.
- 232
233 Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic
234 organisms Aquatic Toxicology 48, 357-389.
- 235
236 Békaert, C., Ferrier, V., Marty, J., Pfohl-Leszkowicz, A., Bispo, A., Jourdain, M.J.,
237 Jauzein, M., Lambolez-Michel, L., Billard, H., 2002. Evaluation of toxic and
238 genotoxic potential of stabilized industrial waste and contaminated soils. Waste
239 Management 22, 241-247.
- 240
241 Bicego, M.C., Taniguchi, S., Yogui, G.T., Montone, R.C., Silva, D.A.M., Lourenço, R.A.,
242 Martins, C.C., Sasaki, S.T., Pellizari, V.H., Weber, R.R., 2006. Assessment of
243 contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons
244 in sediments of the Santos and SãoVicente Estuary System, São Paulo, Brazil. Marine
245 Pollution Bulletin 52, 1784-1832.
- 246

- 247 Bobeldijk, I., Stoks, P.G.M., Vissers, J.P.C., Emke, E., van Leerdama, J.A., Muilwijk, B.,
248 Berbee, R., Noij, T.H.A., 2002. Surface and wastewater quality monitoring:
249 combination of liquid chromatography with (geno)toxicity detection, diode array
250 detection and tandem mass spectrometry for identification of pollutants. *Journal of*
251 *Chromatography* 970, 167-181.
- 252
253 Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J., 2001. Application of the comet and
254 micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of
255 Forth, Scotland. *Chemosphere* 44, 383-392.
- 256
257 Cabrera, G.L., Rodriguez, D.M.G., Maruri, A.B., 1999. Genotoxicity of the extracts from
258 the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant
259 bioassays. *Mutation Research* 426, 201-206.
- 260
261 Cardozo, T.R., Rosa, D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., Oliveira, N.C.D., Pereira, T.S.,
262 Pastoriza, T.F., Marques, D.M., Lemos, C.T., Terra, N.R., Vargas, V.M.F., 2006.
263 Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutation*
264 *Research* 603, 83-96.
- 265
266 Castillo, M., Alonso, M.C., Riu, J., Reinke, M., Klöter, G., Dizer, H., Fischer, B., Hansen,
267 P.D., Barceló, D., 2001. Identification of cytotoxic compounds in European
268 wastewaters during a field experiment. *Analytica Chimica Acta* 426, 265-277.
- 269
270 Çavas, T., Garanko N.N., Arkhipchuk, V.V., 2005. Induction of micronuclei and binuclei in
271 blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chlorid and
272 copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology* 43, 569-574.

- 273
274 Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and
275 effluents. *Mutation Research* 410, 237-243.
- 276
277 Dizer, H., Wittekindt, E., Fischer, B., Hansen, P.D., 2002. The citotoxic and gentotoxic
278 potential of surface water and wastewater effluents as determined by
279 bioluminescence, *umu*-assays and selected biomarkers. *Chemosphere* 46, 225-233.
- 280
281 Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.M., Vermande, P., 2005.
282 Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for
283 raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal of Hazardous Materials*
284 117, 1-11.
- 285
286 Godet, F., Babut, M., Burnel, D., Veber, A-M., Vasseur, P., 1996. The genotoxicity of iron
287 and chromium in electroplating effluents. *Mutation Research* 370, 19-28.
- 288
289 Gogou, A., Bouloubassi I., Stephanou, E.G., 1999. Marine organic geochemistry of the
290 Eastern Mediterranean: Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea
291 Surficial sediments. *Marine Chemistry* 68, 265-282.
- 292
293 Jensen, J.S., Helz, G.R., 1998. Dechlorination kinetics at alkaline pH of N-
294 chloropiperidine, a genotoxin in chlorinated municipal wastewater. *Water Research*
295 32, 2615-2620.
- 296
297 Knapen, D., Bervoets, L., Verheyen, E., Blust, R., 2004. Resistance to water pollution in
298 natural gudgeon (*Gobio gobio*) populations may be due to genetic adaptation. *Aquatic*
299 *Toxicology* 67, 155-165.

- 300
301 Kurelec, B., Piecevic, B., Miiller, W.E.G., 1995. Determination of pollutants with
302 multixenobiotic- resistance inhibiting properties. *Marine Environmental Research* 39,
303 261-265.
- 304 Medina, M.H., Correa, J.A., Barata, C., 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible
305 consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67, 2105-2114.
- 306 Metcalfe C.D., 1988. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the
307 erythrocytes of mudminnows (*Ulbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus*
308 *nebulosus*). *Environmental Contamination and Toxicology* 40, 498-495.
- 309
310 Moreau, X., Saez, G., Thiéry, A., Clot-Faybesse, O., Guiraudie-Capraz, G., Bienboire-
311 Frosini, C., Martin, C., De Jong L., 2008. Elisa detection of multixenobiotic
312 resistance transporter induction in indigenous freshwater chironomidae larvae
313 (diptera): a biomarker calibration step for in situ monitoring of xenobiotic exposure.
314 *Environmental Pollution* 153, 1-8.
- 315
316 Myers, M.S., Johnson, L.L., Horn, T., Collier, T.K., Stein, J.E., Varanasi, U., 1998.
317 Toxicopathic hepatic lesions in subadult english sole (*Pfeuronectes vetulus*) from
318 Puget Sound, Washington, USA: relationships with other biomarkers of contaminant
319 exposure. *Marine Environmental Research* 45, 41-61.
- 320
321 Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review.
322 *Mutation Research* 567, 109-149.
- 323

- 324 Reifferscheid, G., Ziemann, C., Fieblinger, D., Dill, F., Gminski, R., Grummt, H.G.,
325 Hafner, C., Hollert, H., Kunz, Z., Rodrigo, G., Stopper, H., Selke, D., 2008.
326 Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the *in vitro* micronucleus
327 test-Results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO.
328 Mutation Research 649, 15-27.
- 329
330 Schmitt, M., Gellert, G., Lichtenberg-Fraté, H., 2005. The toxic potential of an industrial
331 effluent determined with the *Saccharomyces cerevisiae*-based assay. Water Research
332 39, 3211-3218.
- 333
334 Siddiqui, A.H., Ahmad, M., 2003. The *Salmonella* mutagenicity of industrial, surface and
335 ground water samples of Aligarh region of India. Mutation Research 541, 21-29.
- 336
337 Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M., Toman, M.J., 1996. The evaluation of waste,
338 surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. Mutation Research
339 368, 171-179.
- 340
341 van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers
342 in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and
343 Pharmacology 13, 57-149.
- 344
345 White, P.A., Rasmussen, J.P., 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface
346 waters. Mutation Research 410, 223-236.
- 347
348 Zar, J.H., 1996. Biostatistical Analysis. 3rd Ed., Prentice-Hall Int, Upper Saddle River, N.J.
349 662p.
- 350

351 Zoll-Moreux, C., Ferrier, V., 1999. The jaylet test (newt micronucleus test) and the
352 micronucleus test in xenopus: two in vivo tests on amphibia evaluation of the
353 genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents. Water Research
354 33, 2301-2314.
355

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Frequência média de micronúcleos em *B. saporator* de dois pontos do litoral de Salvador (Ba), Brasil, 2007.

Figura 2. Área de estudo do litoral de Salvador (Bahia, Brasil), mostrando os pontos amostrais e principais riachos.

Figura 3. Frequência média de micronúcleos em eritrócitos de *B. saporator*. MC: momento de coleta no ambiente; 30 D/A: após 30 dias de aclimação em laboratório; 5 D/Ex: cinco dias de exposição ao efluente doméstico (10%); 10 D/Ex: dez dias de exposição ao efluente doméstico (10%). ANOVA de um fator, ($\alpha = 0,05$). * $p < 0,05$.

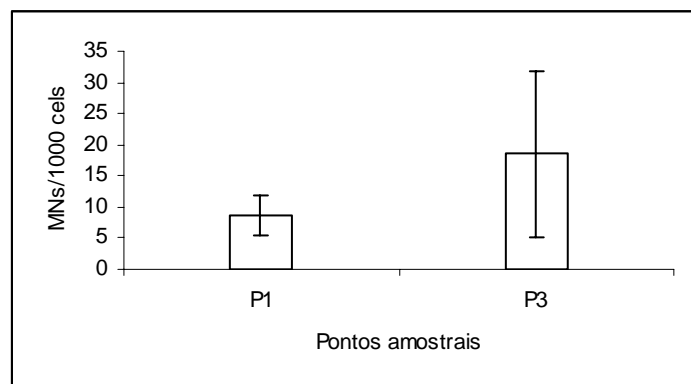


Figura 1.

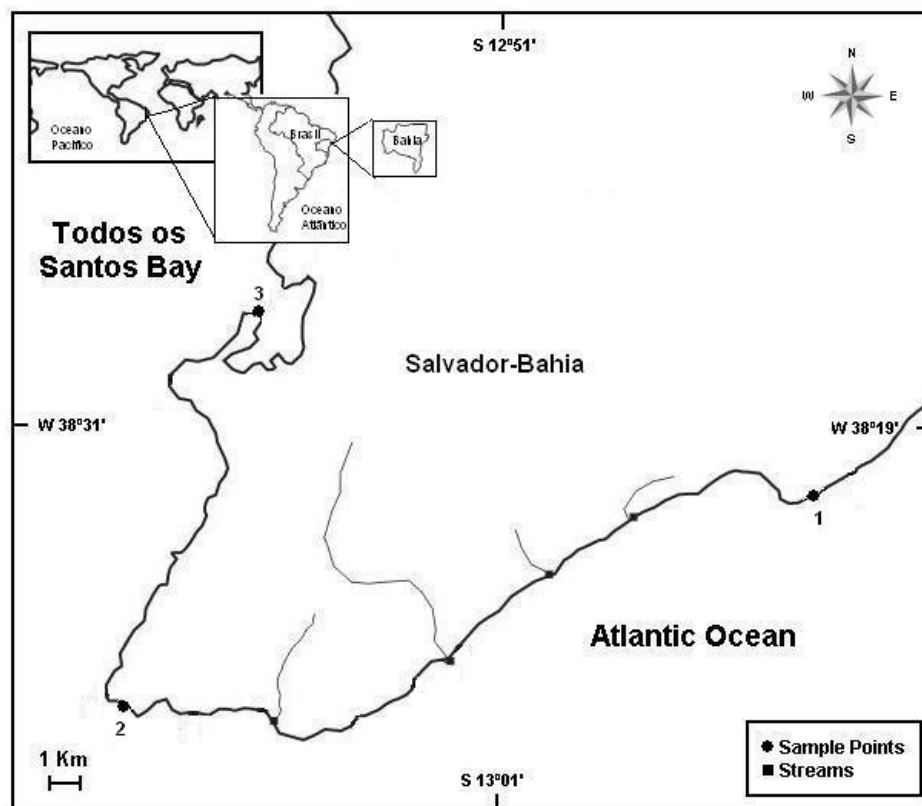


Figura 2.

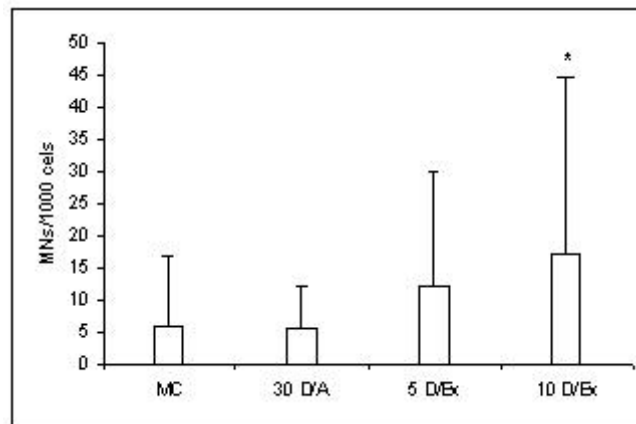


Figura 3.

Tabela 1. Metais em sedimento de dois pontos amostrais do litoral de Salvador (Ba), Brasil, 2007

Metais mg/kg ⁻¹	LDM	1	3
Pb	10,053	< LDM	31,284
Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$)	0,001	< LDM	29,460
Zn	2,761	< LDM	23,538

Tabela 2. Mortalidade em adultos de *B. soporator* coletados em dois pontos do litoral de Salvador-Ba, expostos a diferentes diluições de efluente doméstico.

Diluição (%)	Ponto 1	Ponto 3
0	1	0
1	2	2
3	5	2
7	4	0
10	2	0
30	5	2
Mortalidade Total	19	6

Tabela 3. Variação do pH, oxigênio dissolvido e condutividade de diferentes diluições de efluente doméstico na exposição de *B. saporator* de dois pontos do litoral da cidade de Salvador (Ba).

Ponto 3	Início			9 h			48 h		
	pH	OD (mg/L)	Cond (mS/cm)	pH	OD (mg/L)	Cond (mS/cm)	pH	OD (mg/L)	Cond (mS/cm)
0%	6,59	6,5	47,3	6,9	6,2	47,1	6,4	4,2	52
1%	7,56	5,5	45,6	5,5	5,6	45,5	7	4	45,7
3%	7,4	5,2	51,1	4,6	6	45,6	5,3	3,7	45,7
7%	7,4	5,1	32,5	5,3	4,1	47,6	6	3,8	43,1
10%	6,3	4,5	41,9	6,8	3,8	42,4	6,2	4	47,4
30%	4,22	3,8	43,2	6,2	5,2	45,8	6,8	4,2	45,9
Média	7	5,1	43,6	6	5	45,7	6,28	4	46,6
Ponto 1									
0%	8,5	9,2	51,8	8,5	8,3	46,3	7,9	5,2	46,5
1%	8,5	9	48,8	8,5	8	45,4	8,1	5,4	47,3
3%	8,6	8,9	48,5	8,3	8,3	47,4	8,2	5,7	44,9
7%	8,4	8,8	46,3	8,5	8,5	43,4	8,2	5,8	38,2
10%	8,2	9	41,1	8,5	8,6	41,9	8,4	6,4	37,1
30%	7,9	9,1	38,7	8,5	8,5	36,1	8,3	6,5	36,1
Média	8,4	9,0	45,9	8,5	8,4	43,4	8,2	5,8	41,7

Tabela 4. Média de oxigênio dissolvido, pH e condutividade em dias alternados de aquários de aclimação e efluente (10%) em teste de exposição de *B. soporator* por 10 dias.

	pH	OD (mg/L)	Cond. (μS/cm)
Efluente 1	6,89	3,85	66,71
Efluente 2	7,32	3,20	64,46
Efluente 3	7,40	4,33	61,71
Efluente 4	6,95	3,30	65,30
Efluente 5	7,40	3,70	64,72
Aquário 1	7,34	5,35	76,30
Aquário 2	7,02	5,00	76,75
Aquário 3	7,18	5,18	76,53
Aquário 4	7,10	5,09	76,64
Aquário 5	7,38	4,00	69,85

CONCLUSÕES GERAIS

As concentrações dos compostos prioritários de HPA e os metais Cr e Cd, apresentaram concentrações abaixo dos limites de detecção do método, exceto no ponto 9 para HPA. Os pontos 9 e 10, localizados na BTS, apresentaram maiores concentrações de Hg e Zn, e o Pb foi detectado apenas no ponto 10. A frequência de MNs foi mais elevada que o controle positivo e negativo nos pontos 1, 2, 4, 6, 7, 8 e 10. Os pontos 1 e 2, mais distantes do conglomerado urbano, apresentaram o menor grau de contaminação do sedimento, detectando apenas Mn, além dos maiores valores de oxigênio dissolvido. Houve uma correlação entre a frequência de micronúcleos e o primeiro eixo da análise de componentes principais. Porém, não foi possível estabelecer uma correlação com os compostos de HPA devido às baixas concentrações destes compostos. O teste de micronúcleos em eritrócitos do peixe marinho *B. saporator* demonstrou indução de micronúcleos em peixes expostos ao efluente doméstico diluído a 10 % após cinco e dez dias de exposição. A população de *B. saporator* do ponto livre de contaminação por metais teve mortalidade três vezes mais elevada em comparação ao ponto com metais no sedimento.

ANEXO

MARINE POLLUTION BULLETIN

Guide for Authors

Submission of Papers

Submission for all manuscripts to Marine Pollution Bulletin proceeds totally on-line. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal at <http://ees.elsevier.com/mpb> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript to EES, authors need to provide an electronic version of their manuscript. For this purpose, only original source files are permitted, so no PDF files. Once the uploading is done, our system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. It is crucial that all graphical elements be uploaded in separate files, so that the PDF is suitable for the reviewing process. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be by e-mail. The above represents a very brief outline of electronic submission, you can find further details at the website given above.

Copyright

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by **Funding body agreements and policies** Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Types of Contributions

Research reports; Shorter research Notes; Baseline records of contamination levels; Viewpoint articles; Letters to the Editor; Focus articles (short reviews of 1500 words); Reviews.

Preparation of Texts

We accept most word processing formats for accepted articles, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. It is important that the file is saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/wps/find/authors/homeauthors/howtosubmitpaper>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text. See also the section on Preparation of electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the spelling checker function of your word processor.

LaTeX documents

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsart", or alternatively the standard document class "article". The Elsevier LaTeX package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the files: elsart.cls, guidelines for users of elsart, a template file for quick start and the instruction booklet "Preparing articles with LaTeX".

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins. **The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address).** Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. Please ensure that a fluent English speaker has revised the manuscript prior to submission to the Editors. Authors who require information about language editing and copy editing services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes

responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions.

The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their electronic files.

Abstract: This should not exceed 150 words.

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Keywords: Authors are requested to provide up to six keywords which describe the scope of the article. The keywords will appear listed after the abstract of each paper. Where relevant these should include the main species concerned, the geographical area and the contaminant.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Since Brown (1986) has shown that or "This is in agreement with results obtained later (Chou, 1997) . For citations for three or more authors, use author et al. in the text. The list of references should be arranged alphabetically by author's name. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. References should be given in the following form: Brown, B.E. 1986. Human-induced damage to coral reefs. UNESCO reports in Marine Science No. 40, UNESCO, Paris. Chou, L.M. 1997. The status of southeast asian coral reefs. Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium 11, 317-322. Loya, Y. 1978. Poltless and transect methods. In D. R. Stoddart, R.E. Johannes Coral reefs: research methods, pp. 197-217. Paris: UNESCO. Osterberg, C., Percy, W. & Kujala, N. 1964. Gamma emitters in a Fin Whale. Nature 204, 1006-1007.

Use of the digital object identifier

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal Physics Letters B): doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change. However, please check the DOI very carefully as an error in a letter or number will result in a dead link.

Preparation of electronic illustrations

General

1. Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
2. Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
3. Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
4. Number the illustrations according to their sequence in the text.
5. Use a logical naming convention for your artwork files.
6. Provide all illustrations as separate files.
7. Provide captions to illustrations separately.
8. Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://elsevier.com/artworkinstructions>. Some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

1. embed graphics in your word processor (spreadsheet, presentation) document;
2. supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
3. supply files that are too low in resolution;

4. submit graphics that are disproportionately large for the content.

Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Line drawings

The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.


Tables

Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).

Photographs (halftones)

Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure (plate). Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption.

Colour illustrations

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see 

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

Supplementary Data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instructions <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

GenBank/DNA sequence linking

DNA sequences and GenBank Accession numbers Many Elsevier journals cite ``gene accession numbers in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner: For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier s typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank s sequences. Example 1: ``GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**). Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below). Example 2: ``GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117). In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source

from the article (see Example 3 below). Example 3: ``GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117).

Online Publication

Your article will appear on Elsevier's online journal database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks of acceptance. Articles in Press for this journal can be viewed at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/0025326X>. An Article in Press may be cited prior to its publication by means of its unique digital object identifier (DOI) number, which does not change throughout the publication process.

Proofs

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as `drafts. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Please return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

Reprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Copyright

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, without the author relinquishing his/her proprietary rights. The copyright

transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of a similar nature, and translations. It also includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any material for which copyright already exists.

Author Discount

Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.

Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript s status, by using the "Track a Paper" feature found at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author. In case of problems or questions, authors may contact the Author Support Department, E-mail: authorsupport@elsevier.com

Marine Pollution Bulletin has no page charges.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)