

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
AMBIENTAL

BRUNO DE LAQUILA OLIVEIRA

**Toxicidade aguda do cobre sobre o robalo-peva,
Centropomus parallelus (Teleostei: Centropomidae)**

Vitória
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

BRUNO DE LAQUILA OLIVEIRA

**Toxicidade aguda do cobre sobre o robalo-peva,
Centropomus parallelus (Teleostei: Centropomidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Oceanografia Ambiental. Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes.

Vitória
2009

BRUNO DE LAQUILA OLIVEIRA

**Toxicidade aguda do cobre sobre o robalo-peva,
Centropomus parallelus (Teleostei: Centropomidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Oceanografia Ambiental.

Aprovada em 10 de novembro de 2009.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes
Orientador - DOC/UFES

Prof. Dr. Levy de Carvalho Gomes
Coorientador -UVV

Prof. Dr. Adalto Bianchini
Examinador externo Instituto de
Ciências Biológicas - FURG

Prof. Dr. Renato Rodrigues Neto
Examinador Interno -DOC/UFES

Toxicidade aguda do cobre sobre o robalo-peva, *Centropomus parallelus*
(Teleostei: Centropomidae)

por

Bruno De Laquila Oliveira

Submetido como requisito parcial para a obtenção de grau de

Mestre em Oceanografia Ambiental
na

Universidade Federal do Espírito Santo
Dezembro de 2009

© Bruno De Laquila Oliveira

Por meio deste, o autor confere ao Departamento de Oceanografia da UFES permissão para reproduzir e distribuir cópias parciais ou totais deste documento de Dissertação para fins não comerciais.

Assinatura do autor.....
Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental – PPGOAM / UFES
Dezembro de 2009

Certificado por.....
Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes / Orientador / DOC / UFES

Certificado por.....
Dr. Levy de Carvalho Gomes / Coorientador / UUV

Certificado por.....
Dr. Adalto Bianchini / Examinador Externo / Instituto de Ciências Biológicas / FURG

Certificado por.....
Dr. Renato Rodrigues Neto / Examinador Interno / DOC / UFES

Aceito por.....
Dr. Agnaldo Silva Martins Coordenador Adjunto do Programa de Pós-Graduação em
Oceanografia Ambiental PPGOAM CCHN / UFES

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Fernando Loureiro Fernandes por aceitar o desafio da minha orientação mesmo sabendo que os caminhos eram incertos, e pela amizade conquistada por estes anos.

Ao Levy de Carvalho Gomes, meus sinceros agradecimentos pela confiança e incentivo.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Oceanografia Ambiental, pela dedicação e conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Adalto Bianchini, Dr. Renato Rodrigues Neto e Dr^a. Adriana Regina Chippari-Gomes, por aceitarem o convite a fazerem parte da banca e dividirem a experiência adquirida comigo.

Aos meus pais Miguel e Solange (que me assiste do céu) pela exímia educação e por sempre me darem a liberdade da escolha.

Ao meu irmão Miguel De Laquila e os grandes amigos Ângelo Brunelli Valério e Thiago Antunes Ferrari companheiros para todas as horas.

Aos meus amigos e colegas da Pós-Graduação, Carolina, Marcel, Paulo, Flávio, Patrícia, Rodrigo e Maik. Ao Ricardo (*in memoriam*) pela presteza e dedicação a Base Oceanográfica.

Ao Bruno Ferreira da Silva por todo suporte ao longo de todo mestrado e apoio juntamente com os alunos da UVV Celina Alcoforado, Luciano Rodrigues, Michel Galão, Rafael Camporez pela força e idas e vindas na Base.

A Geisamanda do LabPetro pelas análises de cobre nas brânquias dos robalos.

RESUMO

A avaliação dos efeitos subletais de contaminantes em espécies chaves, como o robalo, é de suma importância para a avaliação de alterações genéticas que possam acarretar perturbações populacionais, além da possibilidade de transferência destes contaminantes por bioacumulação na cadeia trófica. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do cobre no robalo peva (*Centropomus parallelus*) através do método de concentração letal de cobre em 50% dos indivíduos (CL₅₀); determinar os efeitos subletais expondo os indivíduos às concentrações de 25 e 50% da CL₅₀; e avaliar a recuperação dos organismos que foram expostos a concentração de 50% da CL₅₀ após o retorno para água sem acréscimo de cobre por 96 e 240 h, observando situações de mutagênese através do ensaio do cometa e teste do micronúcleo. A concentração de cobre nas brânquias de *Centropomus parallelus* ocorrida nas primeiras 24 h obteve valores próximos aos organismos expostos a 96 h, indicando uma saturação do metal no tecido. O ensaio do cometa não apresentou diferença significativa entre as concentrações de cobre, porém ambas tiveram diferença em relação ao controle. Mesmo para o intervalo de 24 h e a menor concentração, houve diferença significativa, demonstrando rápida resposta do organismo ao ensaio do cometa. No teste do micronúcleo foi encontrado valores em média três vezes maiores entre o controle e nas concentrações de 25% e 50% da CL₅₀ de cobre, demonstrando ser um metal tóxico para *C. parallelus*. Os efeitos genotóxicos do ensaio cometa e teste do micronúcleo sobre *Centropomus parallelus* frente à toxicidade do cobre puderam ser evidenciados com clareza, indicando estes como bons biomarcadores de toxicidade ao cobre para esta espécie. O ensaio cometa e teste do micronúcleo mostraram que houve recuperação dos organismos submetidos a um tempo de recuperação por 96 e 240 h, evidenciando que o dano em *C. parallelus* causado pela contaminação por cobre é um processo reversível, desde que o ambiente deixe de receber aporte deste metal. O teste do micronúcleo mostrou-se o método mais eficiente para avaliação do impacto do cobre sobre *C. parallelus*.

ABSTRACT

The assessment of sublethal effects of contaminants on key species such as sea bass, is extremely important for the evaluation of mutagenesis and genetic alterations that may involve disturbances of the population, besides the possibility of transference of these contaminants for bioaccumulation in the food chain. This study aimed to evaluate the acute toxicity of copper in the snook (*Centropomus parallelus*) by the method of lethal concentration of copper in 50% of individuals (CL_{50}) and determine the sublethal effects exposing individuals to the concentrations of 25 and 50% the CL_{50} and to evaluate the recovery of the bodies which were exposed to concentrations of 50% of the LC_{50} after returning water without addition of copper for 96 and 240 hours with situations of mutagenicity and genotoxicity by comet assay and micronucleus test. The concentration of copper in the gills of *Centropomus parallelus* occurred within 24 hours obtained values close to those organisms exposed to 96 hours, indicating a saturation of the metal in the tissue. The comet assay showed no significant difference between the concentrations of copper, but both have difference with the control. Even for the 24 hours interval and the lowest concentration was significant, showing rapid response of the organism to test the comet. The micronucleus test was found in average three times higher among the control and the concentrations of 25% e 50% CL_{50} of copper, being a highly toxic metal to *C. parallelus*. The genotoxic effects of the comet assay and micronucleus test on *Centropomus parallelus* the toxicity of copper could be seen clearly, indicating these as good biomarkers of copper toxicity for this species. The comet assay and micronucleus test showed that there was recovery of bodies subject to a recovery time by 96 and 240 hours, showing that the damage in *C. parallelus* caused by contamination by copper is a reversible process, provided that the environment no longer receive funding this metal. The micronucleus test proved to be the most efficient method for evaluating the impact of copper on *C. parallelus*.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Concentração de cobre total na água utilizada para testar os efeitos subletais do metal no robalo peva (*Centropomus paralellus*) em condições controle e de 25 e 50% da CL50 de cobre, após 2, 24 e 96 h de experimento.....23
- Figura 2.** Concentração de cobre nas brânquias do robalo peva (*Centropomus paralellus*) após 96 h de exposição após 0 25 e 50% da CL₅₀. *Indica diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0.01$), utilizando-se o Teste U de Mann-Whitney.....24
- Figura 3.** Índice de danos de DNA sobre as células sanguíneas após exposição a 0 (controle), 25 e 50% da CL50 por 24 e 96 h no robalo peva (*Centropomus paralellus*). *indica diferença significativa do respectivo controle e as concentrações ($p \leq 0,05$).....27
- Figura 4.** Representação dos 4 níveis de dano do DNA observados no ensaio do cometa após exposição a 0 (controle), 25 e 50% da CL50 por 24 e 96 h no robalo peva (*Centropomus paralellus*).....27
- Figura 5.** Freqüência de células com micronúcleos após 24 e 96 h de exposição ao cobre. *Indica diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0.05$) utilizando o Teste U de Mann-Whitney.....28
- Figura 6.** Concentração de cobre nas brânquias do robalo peva (*Centropomus paralellus*) após 96 e 240 horas de recuperação em água não contaminada pelo cobre.....29
- Figura 7.** Índice de danos de DNA sobre as células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus paralellus*) dos grupos controle e 50%da CL50 de cobre após 96 e 240 h de recuperação em água não contaminada com cobre.32
- Figura 8.** Freqüência de ocorrência dos 4 níveis de dano medido através do ensaio do cometa em robalos peva (*Centropomus paralellus*) dos grupos controle e expostos a 50% da CL50 de cobre após 96 e 240 h de recuperação em água não contaminada com cobre.32
- Figura 9.** Freqüência de células com a presença de micronúcleos (%) em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus paralellus*) após 96 e 240 h de recuperação em água não contaminada pelo cobre.33

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Genotoxicidade do cobre baseado no ensaio do cometa em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) após 24 h de exposição....25

Tabela 2. Genotoxicidade do cobre baseado no ensaio do cometa em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) após 96 h de exposição....26

Tabela 3. Genotoxicidade do cobre baseado no ensaio do cometa em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) após 96 h de recuperação em água não contaminada pelo cobre.....30

Tabela 4. Genotoxicidade do cobre baseado no ensaio do cometa em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) após 240 h de recuperação em água não contaminada pelo cobre.....31

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
ARTIGO	
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. METODOLOGIA.....	20
2.1. DETERMINAÇÃO DA CL₅₀.....	20
2.2. EFEITOS SUBLETAIS.....	20
2.3. RECUPERAÇÃO.....	21
2.4. PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	21
2.4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA ÁGUA E ACÚMULO DE COBRE NA BRÂNQUIA.....	21
2.4.2. ENSAIO DO COMETA.....	21
2.4.3. MICRONÚCLEO.....	22
2.4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
3. RESULTADOS.....	23
3.1. DETERMINAÇÃO DA CL₅₀.....	23
3.2. EXPOSIÇÃO SUBLETAL.....	23
3.2.1. CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA ÁGUA.....	23
3.2.2. CONCENTRAÇÃO DE COBRE NAS BRÂNQUIAS.....	23
3.2.3. ENSAIO DO COMETA.....	24
3.2.4. TESTE DO MICRONÚCLEO.....	28
3.3. RECUPERAÇÃO.....	28
3.3.1. CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA ÁGUA.....	28
3.3.2. CONCENTRAÇÃO DE COBRE NAS BRÂNQUIAS.....	29
3.3.3 ENSAIO DO COMETA.....	29
3.3.4. TESTE DO MICRONÚCLEO.....	33
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÕES.....	36
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
7. REFERÊNCIAS.....	37

INTRODUÇÃO GERAL

Robalo peva (*Centropomus parallelus*)

Os centropomídeos distribuem-se na costa do Atlântico, desde a Carolina do Norte (EUA) até a região sul do Brasil, e na costa do Pacífico, do sul do México até o Peru (RIVAS 1986). As espécies do gênero *Centropomus* são estenotérmicas e estão restritas às regiões tropicais e subtropicais das Américas sendo encontradas na região costeira, geralmente em águas quentes (SHAFLAND; FOOTE, 1983). Caracterizam-se também por serem eurialinos, estando presentes no mar e em águas continentais, geralmente nas águas salobras de ambientes estuarinos, onde são encontrados em maior número (PÉREZ-PINZON, 1991).

A salinidade tem um efeito profundo sobre a osmoregulação e balanço iônico em peixes (MARSHALL; GROSELL, 2005), e pelo fato de *Centropomus parallelus* ser eurialino, deve-se concentrar esforços para o entendimento da espécie frente aos poluentes, tanto em água doce quanto em águas estuarinas e marinhas.

Os robalos são animais de regime carnívoro, sendo peixes e crustáceos os elementos mais importantes na sua alimentação (CARTER et al,1973). Os crustáceos são os animais mais abundantes no conteúdo estomacal dos indivíduos jovens (GILMORE et al. 1983). Juvenis menores de robalo alimentam-se principalmente de copépodes e pequenos camarões (MCMICHAEL et al., 1989; e TEIXEIRA, 1997). Os adultos se alimentam principalmente de peixes (CARVAJAL, 1975).

Na época da reprodução, os peixes são encontrados geralmente nas desembocaduras dos rios ou na zona costeira adjacente. Após a reprodução os adultos são encontrados em rios e lagunas, o que parece indicar que uma vez efetuado o processo reprodutivo, estes se dirigem as águas interiores, com menor salinidade, assim como os peixes menores. Ainda que o robalo adulto possa utilizar habitat de águas continentais, eles não são capazes de se reproduzir em água doce, pois os espermatozóides ficam ativos somente em águas com salinidade elevada (LAU et al., 1982).

No Brasil, tendo em vista à grande exploração deste recurso e com o objetivo de proteger o estoque, tornou-se necessário implementar medidas de controle da pesca. Em maio de 1992 o IBAMA, através da PORTARIA No 49-N estabeleceu um período de defeso para a pesca do robalo no período de 15 de maio a 31 de julho, no litoral e águas interiores do Espírito Santo e da Bahia (IBAMA, 1992).

TOXICIDADE

Análises genotóxicas são consideradas um eficiente indicador de poluição, especialmente tendo em conta a sua sensibilidade e correlação com a contaminação ambiental. Além disso, os dados de genotoxicidade podem ser utilizados como sinais de alerta precoce de degradação, permitindo a

implementação de medidas de controle, sempre que seja detectado um risco biológico (PISONI et al., 2004).

O uso de peixes como modelo animal em testes laboratoriais está aumentando principalmente por atributos positivos como: a) o pequeno tamanho do corpo; b) a existência de uma padronização e de técnicas válidas para as culturas em laboratório; c) o ciclo de vida relativamente curto e; d) a grande quantidade de informações existentes relacionadas aos atributos biológicos e toxicológicos básicos (AL-SABTI; METCALFE, 1995; MIRACLE; ANKLEY, 2005). Além do fato que os peixes podem acumular substâncias químicas pela exposição direta aos poluentes presentes na água ou indiretamente pela cadeia alimentar do ecossistema em questão (ATEEQ et al., 2002).

Os peixes são amplamente utilizados em testes de toxicidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, pois possuem vantagens como: a biodiversidade em relação às outras espécies de vertebrados, à referência evolucionária em estudos com outros vertebrados, à ampla variedade de habitats, que por sua vez se classificam de água doce e salgada, oceanos polares ou em recifes tropicais, em águas superficiais ou em oceanos profundos com intensa pressão (POWERS, 1989).

Dados provenientes de análises toxicológicas em peixes são utilizados para uma variedade de programas regulatórios nos Estados Unidos, incluindo os registros de novos pesticidas, os critérios de qualidade da água no meio ambiente e testes para classificação de químicos específicos, como os desreguladores endócrinos (MIRACLE; ANKLEY, 2005).

De acordo com Ramelow et al. (1989), Wooton (1990) e Fragoso et al. (1998), os peixes são excelentes ferramentas no monitoramento de ambientes aquáticos, servindo como importantes bioindicadores, pois estão no topo da cadeia trófica.

O primeiro órgão interno a ter contato com os poluentes aquáticos são as brânquias, devido ao constante contato com o ambiente externo (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007). Por terem grande eficiência na absorção do O₂ da água, os peixes utilizam a cavidade bucal e as câmaras branquiais, atuando alternadamente como bombas de sucção e pressão, para manter um fluxo contínuo de água sobre as brânquias (MACHADO, 1999).

A bioconcentração aplica-se principalmente à absorção de substâncias dissolvidas ou na forma coloidal na água para o peixe, onde o contaminante presente na água atravessa as suas brânquias, sendo transportado pelo sangue para os diferentes tecidos (PERAZA et al., 1998). Sendo assim, o peixe pode ser utilizado como um organismo indicador da qualidade do ambiente quanto a metais pesados e na avaliação do seu potencial como eventual via de acesso destes metais para o homem. Estes organismos participam ativamente na ciclagem de metais retidos nos compartimentos abióticos de sistemas aquáticos, remobilizando e exportando deste ambiente para o ambiente terrestre via cadeia alimentar (PFEIFFER et al., 1985).

TOXICIDADE DO COBRE

Com relação à essencialidade dos metais para os organismos, eles podem ser classificados em essenciais e não essenciais. Os essenciais são aqueles que possuem função biológica conhecida e são constituintes obrigatórios do metabolismo dos organismos, participando de processos envolvendo compostos enzimáticos, fazendo parte do sistema aceptor/doador de elétrons. Estes elementos são geralmente encontrados na natureza em pequenas concentrações, da ordem de partes por bilhão (ppb) a partes por milhão (ppm), e são conhecidos também como elementos traço. Mesmo elementos com função biológica conhecida, quando em grandes concentrações, podem apresentar toxicidade aos organismos vegetais e animais (LACERDA et al., 1989).

O cobre é amplamente distribuído na natureza no estado elementar, como sulfetos, arsenitos, cloretos e carbonatos, e apresenta uma abundância natural de $2,5 \times 10^{-4}$ mg/litro nos mares. Vários processos influenciam a disponibilidade do cobre no sistema aquático, incluindo a complexação a ligantes orgânicos e inorgânicos, adsorção a óxidos metálicos, argila e material particulado em suspensão, bioacumulação e troca entre sedimento e água. Estima-se que mais de 75.000 toneladas sejam liberadas para a atmosfera anualmente, das quais apenas um quarto procede de fontes naturais e o restante é decorrente de atividades antropogênicas (WHO, 1998).

Na forma de sulfato, o cobre é mundialmente utilizado para inibir o crescimento de algas em reservatórios, piscinas e sistemas de refrigeração industrial. É ainda amplamente utilizado na agricultura, como também na produção de preservantes de madeira, na galvanoplastia e na manufatura de corantes (ATSDR, 1990).

O cobre, também sendo um metal pesado, em quantidade traço é essencial para a vida, enquanto que em excesso é tóxico. Sua importância na saúde e na doença é bem documentada (BHUNYA; JENA, 1996), sendo um elemento essencial para a atividade de diversas enzimas biológicas. Também é predominantemente encontrado no núcleo e nas mitocôndrias de células vivas. Encontra-se estabelecido na literatura que o chumbo e o cobre chegam à água de consumo como resultado de corrosão dos materiais de encanamento. Contatos com o cobre podem ocorrer na agricultura em decorrência do uso de fungicidas e algicidas e nas indústrias de produção de cobre, de fabricação de fungicidas e na fundição de metais (BANU et al., 2004). Um número de metais presentes no ambiente ocupacional tem sido reportado na carcinogênese humana, entretanto não foi verificada correlação positiva entre exposição ao cobre e câncer (LINDER, 1983).

A clastogenicidade do sulfato de cobre *in vivo* vem sendo investigada há bastante tempo em diferentes sistemas teste, porém, os resultados têm se mostrado inconsistentes (BHUNYA; JENA, 1996). De Flora et al. (1984) reportaram sua propriedade não-mutagênica em diversas linhagens de *Salmonella typhimurium* e o seu resultado negativo nos testes de reparo do

DNA com diversas linhagens de *Escherichia coli* deficientes em reparo. O forte potencial clastogênico do cobre foi reportado em plantas (ROSEN, 1964).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA que é o órgão consultivo e deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente do Brasil estabelece que 5 µg/L de cobre dissolvido é a concentração aceitável em ambiente marinho e permite um limite de 1mg/L para o lançamento de efluentes no oceano (CONAMA, 2005). A grande variação entre as espécies sensíveis ao cobre dificulta o estabelecimento de limites máximos de lançamento de metais no meio ambiente. Não é possível testar todos os organismos, e assim agregar toda a gama de sensibilidade. Considerando o grande número de espécies habitando um local específico, é pouco provável que as espécies mais sensíveis e as mais tolerantes já tenham sido identificadas (GROSELL et al. 2007).

ENSAIO DO COMETA

Nos últimos anos, tem crescido o interesse científico no ensaio cometa para demonstrar danos no DNA induzidos por contaminantes (VRZOC; PETRAS, 1997). O ensaio investiga danos no DNA ao nível celular individual, através da medição da migração em gel do DNA de células depois de uma corrida eletroforética. O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (SINGH et al., 1988).

As quebras no material genético podem ocorrer através de um grande número de mecanismos como radiação ionizante nos locais álcali-lábeis, entre outros. Dessa forma, é importante reconhecer que as quebras podem ocorrer por vias não relacionadas diretamente com a genotoxicidade de um químico. A ativação de enzimas como as endonucleases e as topoisomerasas podem resultar em um elevado número de quebras bem como elevados níveis de compostos reativos endógenos, como radicais super-óxidos e óxido nítrico. Assim, quebras podem refletir efeitos diretos de substâncias xenobióticas bem como variações nos níveis de compostos celulares normais. Entretanto, a natureza não específica desse ensaio em se determinar quebras no DNA causadas por agentes químicos é compensada pela alta sensibilidade e aplicabilidade a diversos tipos de células, o que o torna um teste ideal para monitoramento ambiental, segundo Mitchelmore e Chipman (1998).

O ensaio do cometa tem sido descrito como vantajoso por vários fatores: a avaliação do dano é realizada em células individuais, um pequeno número de células é requerido para a realização do teste, toda célula eucariótica poder ser utilizada e pelo fato do teste detectar lesões no DNA em células viáveis, mesmo que não estejam em proliferação (ROJAS et al., 1999).

Durante a última década, o ensaio do cometa foi extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, incluindo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica,

processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética (GONTIJO; TICE, 2003).

A revisão feita por Lee e Steinert (2003) com diferentes animais marinhos e dulceaquícolas utilizando o ensaio cometa, destaca que este teste pode dar resposta negativa a uma substância que sabidamente é genotóxica. Neste caso deve-se levar em consideração que a dose poderia não ter sido suficiente para dar a resposta positiva e/ou o tipo de célula utilizada não foi apropriada para o agente genotóxico.

Diversas publicações provam que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes de mutagênicos em peixes. Pandrangi et al. (1995) demonstraram, utilizando o ensaio cometa, aumento no dano no DNA em eritrócitos de *Ameiurus nebulosus* e de *Cyprinus carpio* depois da exposição à ciclofosfamida; Devaux et al. (1997) também mostraram o aumento no comprimento da cauda do nucleóide após a exposição de hepatócitos de *Onchorynchus mykiss* ao benzopireno e ao peróxido de hidrogênio.

TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido por Schmid (1975) para células da medula óssea de camundongos e foi adaptado por Hooftman e Raat (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratórios. Esse teste é um método citogenético amplamente utilizado, sendo aplicado em pesquisas com populações de células em proliferação, especialmente células eritropoiéticas de roedores, para avaliar dano cromossômico *in vivo* (HAYASHI et al., 1998).

A análise de micronúcleos foi proposta independentemente por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975) como uma alternativa simples para se avaliar danos cromossômicos *in vivo* com populações de células em divisão, tal como as da medula óssea. O ensaio do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico é agora um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica. É evidente que micronúcleos podem somente ser expressos em células eucarióticas em divisão, ou seja, o ensaio não pode ser usado eficientemente ou quantitativamente em populações de células que não estejam em divisão ou em populações de células em divisão nas quais a cinética da divisão celular não seja bem conhecida ou controlada (FENECH, 2000).

Por apresentarem cromossomos pequenos, em grande quantidade, irregulares e com baixo índice mitótico, a aplicação do teste do micronúcleo na maioria das espécies de peixes tornou-se extremamente vantajosa quando comparada a outros biomarcadores de mutagenicidade, tais como a troca entre cromátides irmãs e o teste de aberrações cromossômicas (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000).

AL-SABTI et al. (1995) afirmaram que eritrócitos de peixes são bastante adequados para este teste, especialmente porque micronúcleos podem ser

contados facilmente neste tipo celular. Em peixes, o sangue periférico é de fácil obtenção, o que torna a técnica de micronúcleo bastante simples e rápida (GRASSI, 2002).

Nos últimos anos a aplicação do teste do micronúcleo em peixes tem sido bastante discutida e alguns problemas metodológicos têm sido descritos. Um deles é a falta de sensibilidade demonstrada por algumas espécies. Hose et al. (1987) utilizaram o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes (*Genyonemus lineatus* e *Paralabrus clathratus*) de um rio do sul da Califórnia. Porém, os autores mostraram que a presença de DDT e PCB no ambiente não resultou em um aumento significativo na frequência de micronúcleos. Além disso, *Phoxinus phoxinus* mostrou-se pouco sensível a diferentes produtos, tais como metais pesados (SANCHEZ-GALAN et al, 1999) e *Genyonemus lineatus* apresentou baixa sensibilidade a poluentes ambientais (CARRASCO et al, 1990).

ARTIGO

**Toxicidade aguda do cobre sobre o robalo-peva,
Centropomus parallelus (Teleostei: Centropomidae)**

1. INTRODUÇÃO

Animais aquáticos são naturalmente expostos a uma variedade de metais, cuja forma química e concentração na água são governadas pela natureza dos processos geoquímicos e atividades antropogênicas (ROESIJADI; ROBINSON, 1994; SOUSA et al., 2007). Além disso, a mesma espécie geralmente apresenta sensibilidade diferente para metais, de acordo com a fase ontogenética, massa corporal e sexo (SERAFIM; BEBIANNO, 2001; MUBIANA et al., 2006).

O cobre é considerado um elemento traço essencial para o bom funcionamento do organismo, participando da defesa contra radicais livres, na neurotransmissão, no metabolismo celular e compondo enzimas envolvidas na respiração celular (MATSUO, 2004). As atividades de mineração, fundição e industriais geram resíduos na forma de material particulado ou solúvel liberados para a atmosfera ou para os efluentes industriais, tendo em grande parte os estuários, mares e oceano como destino de metais e compostos tóxicos. O cobre é um elemento importante em muitos processos industriais e é considerado altamente tóxico para biota mesmo em baixas concentrações (WHO, 1998).

Diversos métodos vêm sendo empregados para determinação da contaminação do cobre sobre os organismos aquáticos (MONTEIH; VANSTONE, 1995; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; SASAKI et al., 1997; BELPAEME et al., 1996; LEMOS et al., 2005; MOLLER, 2006). O ensaio do cometa tem sido indicado como um método capaz de detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA (KOPPEN et al., 1999; GONTIJO; TICE, 2003) e tem sido aplicado com sucesso em eritrócitos de várias espécies de peixes, visto a sensibilidade das células sanguíneas destes animais aos efeitos genotóxicos (NACCI et al., 1996; BELPAEME et al., 1996; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; LEE; STEINERT, 2003; VAN DER OOST et al., 2003). Dentre as inúmeras aplicações deste ensaio, a eficiência da técnica para a detecção do potencial genotóxico de contaminantes aquáticos tem sido descrita por muitos autores (KOSZ-VNENCHAK; ROKOSZ, 1997; SASAKI et al., 1997; AVISHAI et al., 2002; MATSUMOTO, 2004).

Uma das vantagens dos ensaios do cometa e micronúcleo é de que ambos podem ser utilizados para a avaliação simultânea de lesões no DNA em muitos tecidos do mesmo animal, traçando um comparativo entre as suas respostas sob idênticas condições do tratamento. Assim, estas técnicas podem ser utilizadas em conjunto para o rastreamento de substâncias químicas e assim investigar suas implicações de lesões no DNA e a sua recuperação de espécies sentinelas tais como os peixes (ALI et al., 2009).

As espécies do gênero *Centropomus* são estenotérmicas e estão restritas às regiões tropicais e subtropicais das Américas, sendo encontradas na região costeira, geralmente em águas quentes, em torno de 24°C. O robalo peva (*Centropomus parallelus*) habita as águas costeiras rasas e estuários do sul da Flórida até a costa brasileira (águas tropicais e subtropicais), e não realiza grandes ciclos migratórios (RIVAS, 1962; FAO, 1978; VASCONCELOS-FILHO

et al., 1980; MARTIN; KING, 1991). Peixe carnívoro, situado no topo da cadeia alimentar, possui como elementos mais importantes na sua alimentação os peixes e os crustáceos (CHÁVES, 1963). A avaliação dos efeitos subletais de contaminantes em espécies chaves, como o robalo, é de suma importância para a avaliação de mutagênese e alterações genéticas que possam acarretar perturbações populacionais, além da possibilidade de transferência destes contaminantes por bioacumulação na cadeia trófica.

O presente estudo teve como objetivos: avaliar a toxicidade aguda do cobre no robalo peva (*Centropomus parallelus*) através da determinação da concentração letal de cobre para 50% dos indivíduos testados (CL_{50}); determinar a acumulação de cobre nas brânquias e os efeitos subletais de exposição às concentrações de 25 e 50% da CL_{50} por 24 e 96 h; e avaliar a recuperação dos organismos que foram expostos a concentração de 50% da CL_{50} por 96h após o retorno para água sem acréscimo de cobre por 96 e 240 h.

2. METODOLOGIA

A água coletada no estuário do rio Piraqueaçu utilizada nos experimentos passou por um processo de filtração em filtros tipo Cuno de 20, 10 e 5 μm e esterilização utilizando um sistema de filtração por raios ultravioleta (UV). Os parâmetros físico-químicos analisados foram temperatura, salinidade, pH e condutividade, e os biológicos foram tamanho e peso úmido. Estes parâmetros apresentaram as seguintes médias: temperatura de 24,6°C ($\pm 0,6$); salinidade de 32,2 ($\pm 1,1$); pH de 7,58 ($\pm 0,38$) e condutividade de 47,46 mS ($\pm 0,20$). O tamanho médio dos peixes foi de 6,8 cm ($\pm 1,3$) e peso de 3,5 g ($\pm 1,7$). Os juvenis do robalo peva, *Centropomus parallelus*, foram adquiridos comercialmente no laboratório Pandini Maricultura. Os experimentos realizados são descritos a seguir.

2.1. DETERMINAÇÃO DA CL₅₀

Exemplares do robalo peva, *C. parallelus*, foram aclimatados e acondicionados por 25 dias em 2 tanques de 1000 L nos padrões de qualidade de água acima estabelecidos e alimentados diariamente com ração comercial (Inve, Bélgica) com 60% de proteína. Após aclimação, os peixes foram transferidos para tanques de 30 L contendo 10 peixes em cada tanque, divididos em 5 diferentes concentrações de sulfato de cobre penta-hidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,0 mg/L de Cu) mais o controle (sem adição de cobre na água), todos em triplicata, em sistema estático e aeração constante, perfazendo um total de 18 unidades experimentais.

Para a determinação da CL₅₀, foi observada a mortalidade a cada 24 h de teste até 96 h. O critério de mortalidade adotado foi a ausência de qualquer tipo de movimento e reação a estímulos táteis. Os dados gerados foram analisados utilizando-se o programa computacional Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) para determinação da CL₅₀ após 96 h de exposição.

2.2. EFEITOS SUBLETAIS

Após a determinação da CL₅₀, foi realizado outro experimento para determinar os efeitos subletais do cobre sobre *C. parallelus*. O experimento foi fatorial com três concentrações cobre e dois tempos de exposição. Cada combinação de concentração e tempo de exposição teve dez repetições, perfazendo um total de 60 unidades experimentais. Os peixes foram dispostos individualmente em aquários de 2 L, divididos em concentrações de 0 (controle) 25 (0,47mg/L) e 50% (0,94mg/L) da CL₅₀ obtida no experimento anterior. Após 24 e 96 h de exposição ao cobre, os peixes foram individualmente retirados e colocados em solução anestésica para coleta de sangue por meio de punção da veia caudal, com a utilização de seringas heparinizadas, sendo este colocado em tubos Eppendorf para posterior elaboração dos ensaios cometa e micronúcleo, e dissecação das brânquias com a finalidade de determinar a concentração de cobre no tecido. Para determinação da concentração de cobre na água,

amostras foram coletadas nos diferentes meios experimentais após 2, 24 e 96 h de experimento.

2.3. RECUPERAÇÃO

O terceiro experimento consistiu em submeter 48 peixes ao cobre (0.96 mg/L; 50% da CL50) durante 96 h. Os peixes foram divididos em 8 tanques com 6 peixes cada, sendo 4 tanques com a adição do metal e 4 tanques controle. Após a exposição, os peixes foram acondicionados em outros tanques de plástico de 30 L com água salgada (média de 32,2ppm) sem o poluente para recuperação. Após 96 h de recuperação, foram coletados 3 peixes de cada tanque, onde foram extraídas as brânquias para determinação da concentração de cobre, e o sangue para o ensaio cometa e teste do micronúcleo. Após 240 h de recuperação, 3 peixes de cada tanque foram coletados e os mesmos procedimentos foram realizados. Coletas de água foram feitas após 2 e 96 h após a adição de cobre, assim como para 96 e 240 h após o início do período de recuperação para a determinação da concentração de cobre.

2.4. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

2.4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA ÁGUA E ACÚMULO DE COBRE NA BRÂNQUIA

Amostras de água foram preservadas em ácido nítrico 1% para determinação da concentração de Cu por meio de espectrofotometria de absorção atômica (limite de detecção = 10 µg/L, $\lambda = 324.7$ nm, GBC Avanta 932, IL, USA). As brânquias foram extraídas com uso de pinça. Logo após serem retiradas, foram enxaguadas com EDTA (1 mM) para eliminar o cobre adsorvido a brânquia. As amostras foram pesadas em balança digital de precisão e digeridas com ácido nítrico 10% em estufa a 80°C por 24 h. O volume de ácido nítrico foi constante, sendo posteriormente calculada a diluição final da amostra digerida pelo peso do tecido fresco. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e uma alíquota do sobrenadante foi diluída em HNO₃ 1% para leitura da concentração do metal por meio de espectrofotometria de absorção atômica acoplada a forno grafite e os resultados foram expressos em µg/g de cobre.

2.4.2. ENSAIO DO COMETA

Através de metodologia descrita por TICE et al., (2000), a análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando-se o ensaio do cometa alcalino e coloração com nitrato de prata. Para isso, lâminas de microscopia, duas para cada exemplar, foram previamente cobertas com agarose 1,5% (1,80 g de agarose e 120 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4). As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e, posteriormente, 10 µl do sangue diluído foi misturado com 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,15 g de agarose em 20 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40°C. As lâminas foram

recobertas com lamínulas para o gel se espalhar até solidificar. Após a retirada das lamínulas, os slides foram colocados na solução de lise [146,1g NaCl (2,5 M), 37,2g EDTA (100 mM), 1,2g de Tris (10 mM), 1 L de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH e, no momento do uso, foram adicionados 1% de Triton X-100 e 10% DMSO] por no mínimo 2 h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da lise, as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300 mM NaOH e 1 mM EDTA em pH>13) por 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25V e 300mA por 15 min. Após esta etapa, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris e lavadas em seguida com água destilada. As lâminas foram secas por 2 h a 37°C. Após esse período, as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco heptahidratado, 5% de glicerol e 1 L de água destilada) por 10 min. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas por 2 h a 37°C. Depois de secas, as lâminas foram hidratadas por 5 min com água destilada e coradas com solução de coloração com prata [66 ml da solução de carbonato de cálcio (12,5g de carbonato de cálcio para 250 ml de água) e 34 ml da solução de nitrato de prata (50mg de nitrato de prata, 50 mg de nitrato de amônio, 250 mg de ácido tungstosalicílico e 125 µl de formaldeído] por 15 min a 37°C.

Os danos no DNA foram avaliados em 100 células utilizando-se um microscópio óptico (Nikon, Modelo 50i) e classificados posteriormente de acordo com o tamanho da cauda do cometa em 4 classes: classe 0 – célula não apresentava cauda; classe 1 – a cauda era menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 – cauda com variação de comprimento de 1x a 2x o diâmetro do núcleo; classe 3 – cauda maior que 2x o diâmetro do núcleo (GRAZEFTE et al., 2008). O índice de danos (ID) analisado pelo teste cometa foi avaliado utilizando a somatória do número de células danificadas multiplicado pelo valor da classe de dano (0 a 3). Esses valores demonstram os danos verificados nos tratamentos de acordo com Heuser et al., (2008).

2.4.3. MICRONÚCLEO

O sangue foi coletado e gotejado sobre uma lâmina para ser feito o esfregaço. O material foi deixado secar durante a noite. Em seguida as lâminas foram submetidas a um banho de 30 min em metanol p.a. (100%) para fixação, sendo coradas em seguida com uma solução de Giemsa 5% por 40 min. O material foi observado em microscópio óptico (Nikon, Modelo 50i) para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico em resolução de 1000x, com contagem de 1000 células sanguíneas (eritrócitos) por lâmina (CAMPANA et al., 1999; GRISOLIA, 2002; BUCKER et al., 2006). Os micronúcleos foram identificados seguindo o critério proposto por Fenech et al. (2003) e analisadas 2 lâminas por indivíduo para todos os tratamentos.

2.4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises dos dados de concentrações de cobre na água, nas brânquias e do ensaio do cometa e micronúcleo entre os peixes expostos ao cobre e seus

respectivos controles, foram determinadas utilizando o Teste U de Mann-Whitney, teste estatístico não-paramétrico, utilizando-se o programa BioEstat versão 5.0. O índice de danos do controle foi comparado com o das diferentes concentrações de cobre nos diferentes tempos de amostragem pelos testes de ANOVA e de Dunnet's ($p < 0,05$). A diferença entre o mesmo tratamento nos dois tempos de amostragem foi determinada pelo teste-T ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. DETERMINAÇÃO DA CL_{50}

O valor encontrado para a CL_{50} dos indivíduos expostos após 96 h foi de 1,88 mg/L de cobre total, com um limite inferior de 1,67 mg/L e superior de 2,11 mg/L, valores estes dentro do intervalo de confiança de 95%.

3.2. EXPOSIÇÃO SUBLETAL

3.2.1. CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA ÁGUA

A adição da concentração de cobre na água para atingir valores próximos a 0,94 mg/L (50% da CL_{50}) ao longo dos experimentos (2, 24 e 96 h) esteve dentro do desvio padrão aceitável. A mesma proximidade ocorreu com a concentração de 25% da CL_{50} para 2, 24 e 96 h, que inicialmente foi de 0,47mg/L (Figura 1).

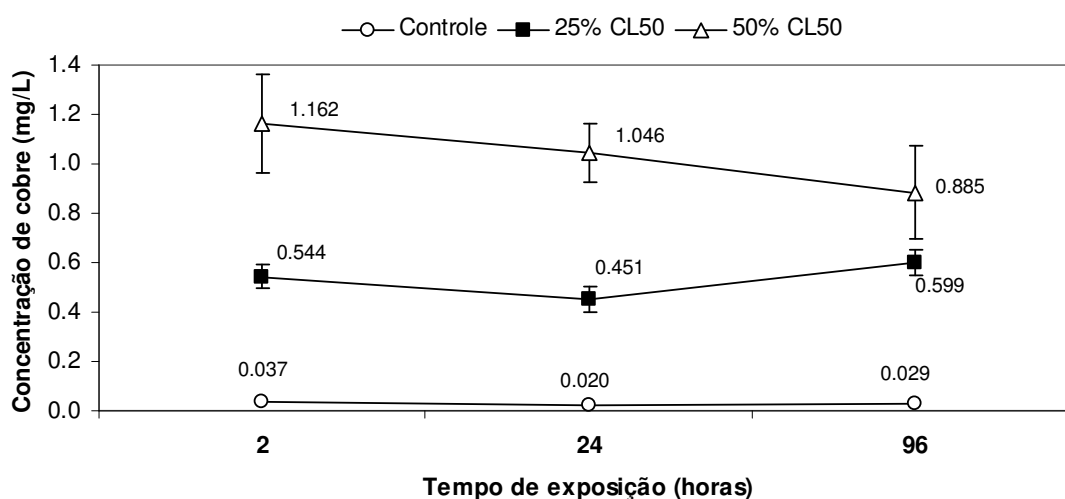


Figura 1. Concentração de cobre total na água utilizada para testar os efeitos subletais do metal no robalo peva (*Centropomus paralellus*) em condições controle e de 25 e 50% da CL_{50} de cobre, após 2, 24 e 96 h de experimento.

3.2.2. CONCENTRAÇÃO DE COBRE NAS BRÂNQUIAS

Os resultados da concentração de cobre nas brânquias estão mostrados na Figura 2, onde observa-se que após 96 h de exposição, houve um aumento significativo nas concentrações de cobre nas brânquias dos peixes expostos a

25 e 50% da CL_{50} . Após a extração as brânquias foram lavadas do EDTA e os resultados foram calculados a partir do peso seco das brânquias. Não houve diferença significativa entre as duas concentrações de cobre testadas.

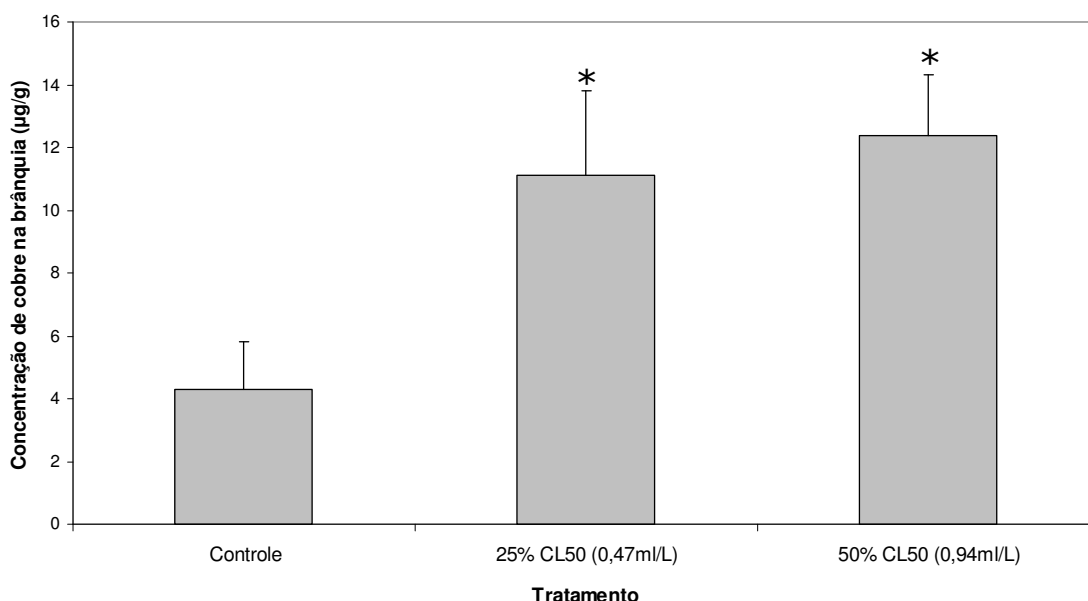


Figura 2. Concentração de cobre nas brânquias do robalo peva (*Centropomus paralellus*) após 96 h de exposição após 0 25 e 50% da CL_{50} . *Indica diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0.01$), utilizando-se o Teste U de Mann-Whitney.

3.2.3 ENSAIO DO COMETA

Após 24 h de exposição não houve diferença significativa entre as duas concentrações de cobre testadas (Tabela 1), sendo que o mesmo foi encontrado para o índice de dano de DNA (Figura 3). Após 96 h de exposição, houve diferença entre o controle e a maior concentração e não houve diferença entre as duas concentrações de cobre (Tabela 2). A Figura 4 apresenta a visualização das tabelas em forma de gráfico, permitindo uma comparação entre os controles, as concentrações e os tempos de exposição de 24 e 96 h.

Tabela 1. Genotoxicidade do cobre baseado no ensaio do cometa em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) após 24 h de exposição.

Grupo	Peixe	Número de células com cometa	Classes de dano			
			0	1	2	3
Controle	C11	83	17	35	20	28
	C12	62	38	35	15	12
	C13	92	8	23	33	36
	C14	84	16	21	18	45
	C15	81	19	21	30	30
	C16	86	14	39	15	32
	C17	62	38	41	13	8
	C18	92	8	21	27	44
	C19	68	32	37	9	22
	C20	66	34	26	23	17
	$\bar{x} \pm D.P.$	77.6 ± 11.9	22.4 ± 11.9	29.9 ± 8.2	20.3 ± 7.8	27.4 ± 12.6
25% CL50	B11	98	2	18	36	44
	B12	99	1	8	19	72
	B13	100	0	11	12	77
	B14	98	2	5	24	69
	B15	95	5	11	26	58
	B16	93	7	16	48	29
	B17	84	16	21	23	40
	B18	98	2	5	12	81
	B19	93	7	16	21	56
	B20	91	9	15	27	49
	$\bar{x} \pm D.P.$	$94.9 \pm 4.8^*$	$5.1 \pm 4.8^*$	$12.6 \pm 5.5^*$	24.8 ± 10.8	$57.5 \pm 17.2^*$
50% CL50	A11	100	0	6	40	54
	A12	99	1	7	39	53
	A13	89	11	19	27	43
	A14	99	1	6	24	69
	A15	100	0	3	31	66
	A16	98	2	11	44	43
	A17	95	5	16	26	53
	A18	100	0	5	14	81
	A19	91	9	20	49	22
	A20	97	3	8	21	68
	$\bar{x} \pm D.P.$	$96.8 \pm 3.9^*$	$3.2 \pm 3.9^*$	$10.1 \pm 6.1^*$	$31.5 \pm 11.1^*$	$55.2 \pm 16.8^*$

* Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0.05$), utilizando o Teste U de Mann-Whitney. \bar{x} = média; D.P. = desvio padrão.

Tabela 2. Genotoxicidade do cobre baseado no ensaio do cometa em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) após 96 h de exposição.

Grupo	Peixe	Número de células com cometa	Classes de dano			
			0	1	2	3
Controle	C1	85	15	22	28	35
	C2	94	6	18	26	50
	C3	89	11	14	38	37
	C4	86	14	15	16	55
	C5	90	10	25	22	43
	C6	84	16	27	32	25
	C7	88	12	21	25	42
	C8	81	19	21	23	37
	C9	88	12	14	20	54
	C10	83	17	21	18	44
	$x \pm D.P.$	86.8 ± 3.8	13.2 ± 3.8	19.8 ± 4.5	24.8 ± 6.6	42.2 ± 9.2
25% CL50	B1	81	19	22	30	29
	B2	91.5	9	12	35	44
	B3	99	1	11	26	62
	B4	98.5	1	14	23	62
	B5	97	3	9	19	69
	B6	86.5	14	21	28	37
	B7	89.5	10	18	19	53
	B8	92.5	8	9	27	56
	B9	96	4	9	8	79
	B10	78	22	33	26	19
	$x \pm D.P.$	91.0 ± 7.3	9.1 ± 7.3	15.8 ± 7.8	24.1 ± 7.4	51.0 ± 18.7
50% CL50	A1	98	2	8	22	68
	A2	99	1	4	9	86
	A3	99	1	4	15	80
	A4	†				
	A5	99	1	6	26	67
	A6	98	2	9	38	51
	A7	97	3	8	28	61
	A8	91	9	14	37	40
	A9	95	5	18	33	44
	A10	90	10	15	30	45
	$x \pm D.P.$	$96.2 \pm 3.6^*$	$3.8 \pm 3.5^*$	$9.6 \pm 5.0^*$	26.4 ± 9.7	$60.2 \pm 16.4^*$

* Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0.05$). x = média; D.P. = desvio padrão; † peixe morto durante o experimento.

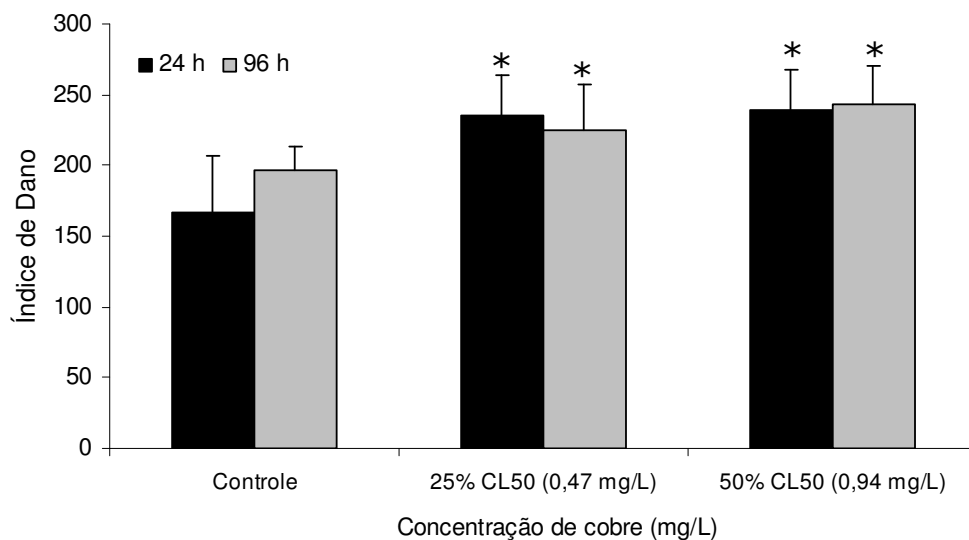


Figura 3. Índice de danos de DNA sobre as células sanguíneas após exposição a 0 (controle), 25 e 50% da CL50 por 24 e 96 h no robalo peva (*Centropomus paralellus*). *indica diferença significativa do respectivo controle e as concentrações ($p \leq 0,05$).

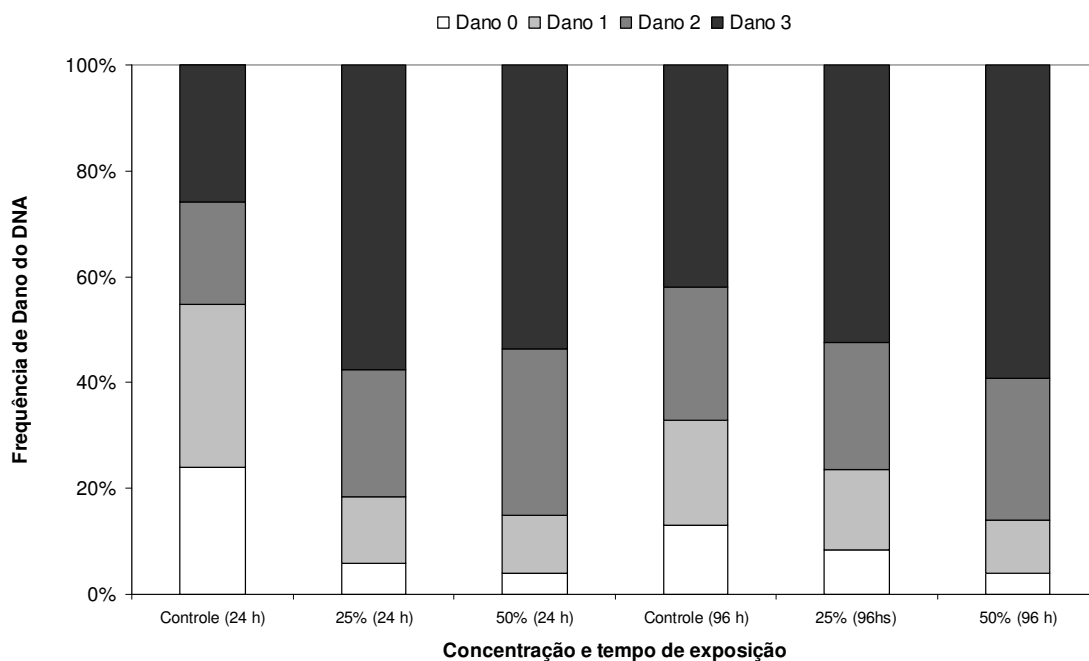


Figura 4. Representação dos 4 níveis de dano do DNA observados no ensaio do cometa após exposição a 0 (controle), 25 e 50% da CL50 por 24 e 96 h no robalo peva (*Centropomus paralellus*).

3.2.4. TESTE DO MICRONÚCLEO

Não houve diferença significativa entre as concentrações de 0,47 mg/L (25% da CL₅₀) e 0,94 mg/L (50% da CL₅₀), porém houve diferença entre estas e o controle (Figura 5), mostrando que o dano é o mesmo para os tempos de exposição. Isto significa um dano rápido causado pelo cobre em 24 h que se estende até pelo menos 96 h de exposição, sem diferença significativa no número de células com a presença de micronúcleos.

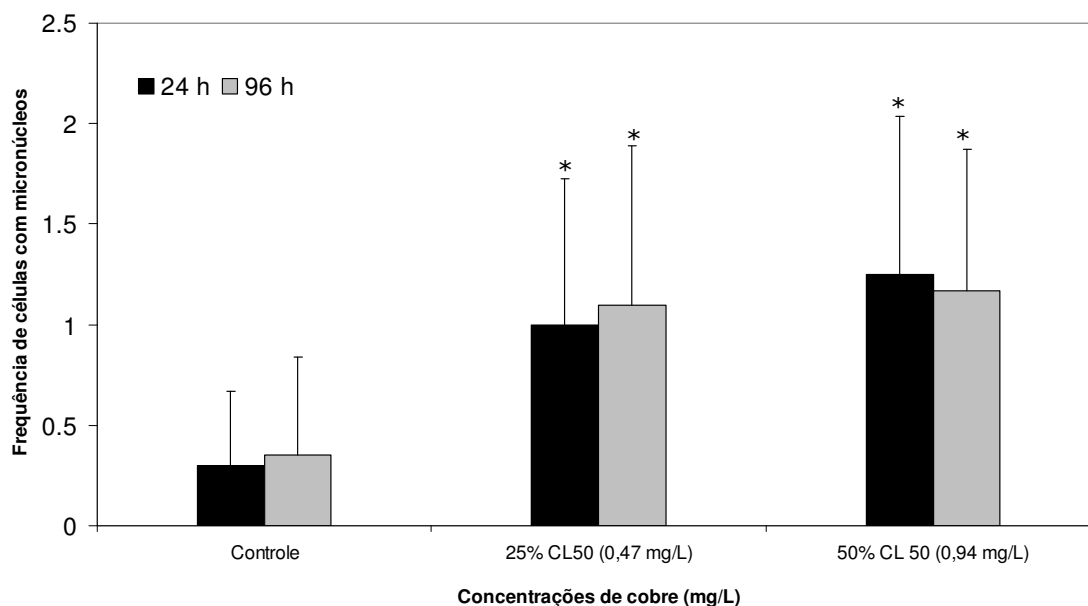


Figura 5. Frequência de células com micronúcleos após 24 e 96 h de exposição ao cobre. *Indica diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$) utilizando o Teste U de Mann-Whitney.

3.3. RECUPERAÇÃO

3.3.1. CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA ÁGUA

No experimento de recuperação, a adição de cobre para a exposição dos peixes por de 96 h foi de 1,034 mg/L, valor este dentro dos limites esperados para a concentração de cobre na água de 50% da CL₅₀ (0,94 mg/L). Tanto o controle quanto os experimentos de recuperação em 96 e 240 h, apresentaram níveis muito baixos de cobre, variando desde níveis não detectados pelo espectrofotômetro a, no máximo, 0,009 mg/L. Os valores encontrados são considerados muito baixos, mostrando que não houve contaminação da água de recuperação pelo cobre.

3.3.2. CONCENTRAÇÃO DE COBRE NAS BRÂNQUIAS

A concentração de cobre nas brânquias dos peixes expostos foi semelhante entre os controles após 96 e 240 h de recuperação, não havendo diferença significativa das concentrações, tanto para os tempos de exposição quanto para os peixes controles e os peixes expostos ao cobre (Figura 6).

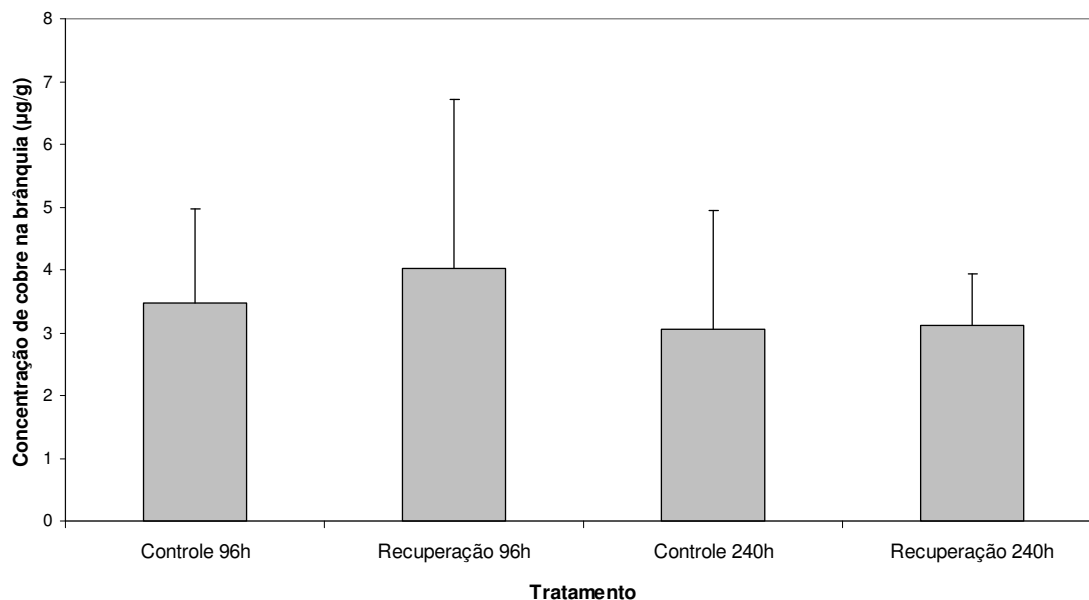


Figura 6. Concentração de cobre nas brânquias do robalo peva (*Centropomus paralellus*) após 96 e 240 horas de recuperação em água não contaminada pelo cobre.

3.3.3 ENSAIO DO COMETA

Para os períodos de recuperação, não houve diferença significativa de dano em relação ao controle, mostrando que houve recuperação das células dos organismos expostos a concentração subletal de 50% da CL50 (0,94 mg/L), e em seguida submetidos por um processo de recuperação de 96 e 240h em água sem acréscimo de cobre (Tabelas 3 e 4). Para o índice de dano, também não houve diferença significativa entre as recuperações e o controle (Figura 7). A Figura 8 apresenta a visualização das tabelas em forma de gráfico, permitindo uma comparação entre os controles e os organismos expostos e submetidos a recuperação nos tempos de exposição de 96 e 240 h.

Tabela 3. Genotoxicidade do cobre baseado no ensaio do cometa em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) após 96 h de recuperação em água não contaminada pelo cobre.

Grupo	Peixe	Número de células com cometa	Classes de dano			
			0	1	2	3
Controle	CR1	85	15	23	25	37
	CR2	78	22	19	13	46
	CR3	93	7	12	24	57
	CR4	77	23	16	28	33
	CR5	81	19	25	32	24
	CR6	96	4	22	24	50
	CR7	68	32	28	15	25
	CR8	88	12	23	23	42
	CR9	89	11	11	43	35
	CR10	79	21	22	35	22
	CR11	97	3	6	36	55
	CR12	†				
	x ± D.P.	84.6 ± 9.0	15.4 ± 9.0	18.8 ± 6.8	27.1 ± 9.0	38.7 ± 12.3
Recup. 96hs	R1	84	16	22	24	38
	R2	78	22	11	19	48
	R3	97	3	23	25	49
	R4	96	4	8	21	67
	R5	92	8	4	25	63
	R6	87	13	22	24	41
	R7	100	0	2	22	76
	R8	91	9	21	22	48
	R9	89	11	9	21	59
	R10	96	4	12	51	33
	R11	98	2	3	23	72
	R12	95	5	0	32	63
	x ± D.P.	91.9 ± 6.5	8.1 ± 6.5*	11.4 ± 8.6*	25.8 ± 8.6	54.8 ± 13.9*

* Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0.05$). x = média; D.P. = desvio padrão; † peixe morto durante o experimento.

Tabela 4. Genotoxicidade do cobre baseado no ensaio do cometa em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) após 240 h de recuperação em água não contaminada pelo cobre.

Grupo	Peixe	Número de células com cometa	Classes de dano				
			0	1	2	3	
Controle	CR13	89	11	21	22	46	
	CR14	98	2	6	45	47	
	CR15	84	16	22	32	30	
	CR16	82	18	12	12	58	
	CR17	95	5	2	21	72	
	CR18	†					
	CR19	79	21	19	35	25	
	CR20	99	1	0	21	78	
	CR21	96	4	12	11	73	
	CR22	89	11	10	23	56	
	CR23	90	10	4	11	75	
	CR24	93	7	3	28	62	
		x ± D.P.	91.0 ± 7.2	9.0 ± 7.2	10.0 ± 8.0	23.7 ± 10.7	57.3 ± 18.4
	Recup. 240hs	R13	88	12	13	21	54
R14		97	3	2	17	78	
R15		94	6	12	9	73	
R16		99	1	1	8	90	
R17		91	9	7	34	50	
R18		84	16	12	28	44	
R19		80	20	12	19	49	
R20		89	11	22	23	44	
R21		96	4	7	12	77	
R22		98	2	1	9	88	
R23		83	17	11	9	63	
R24		100	0	1	6	93	
		x ± D.P.	91.6 ± 6.8	8.4 ± 6.8	8.4 ± 6.5	16.3 ± 8.9	66.9 ± 18.5

* Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0.05$). x = média; D.P. = desvio padrão; † peixe morto durante o experimento.

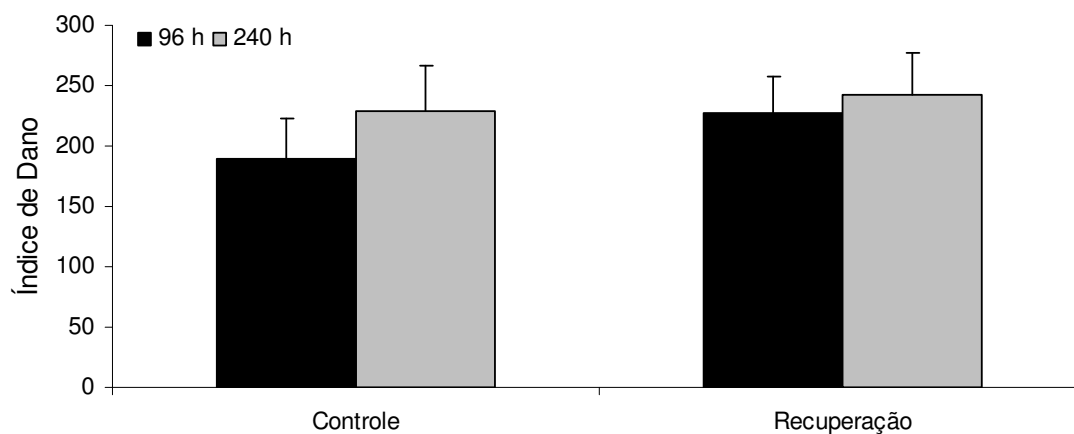


Figura 7. Índice de danos de DNA sobre as células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) dos grupos controle e 50%da CL50 de cobre após 96 e 240 h de recuperação em água não contaminada com cobre.

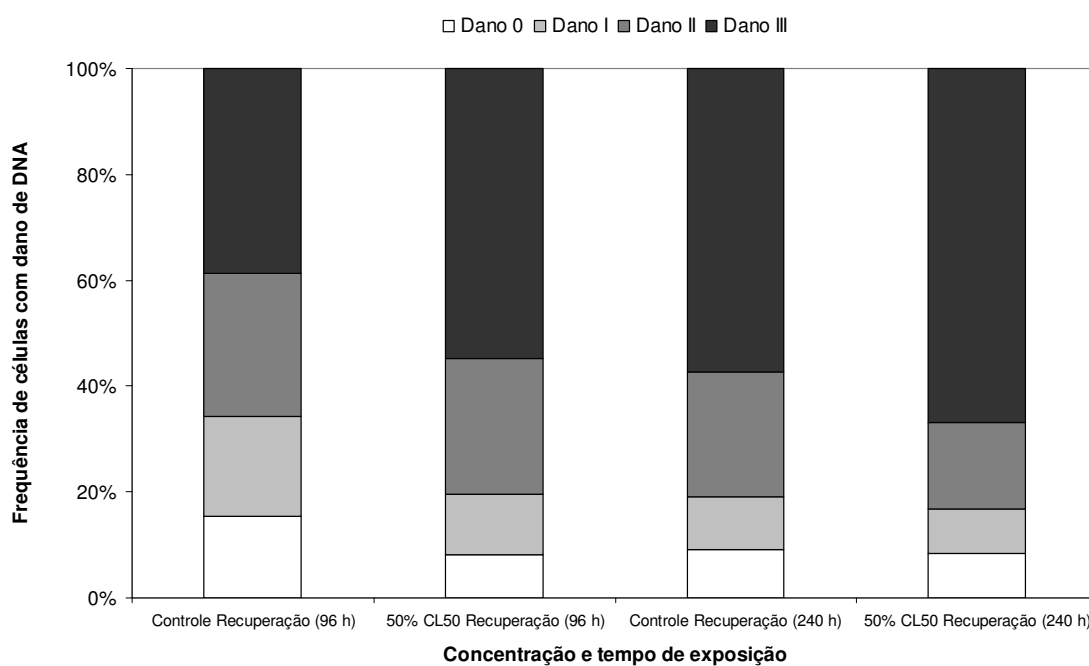


Figura 8. Frequência de ocorrência dos 4 níveis de dano medido através do ensaio do cometa em robalos peva (*Centropomus parallelus*) dos grupos controle e expostos a 50% da CL50 de cobre após 96 e 240 h de recuperação em água não contaminada com cobre.

3.3.4. TESTE DO MICRONÚCLEO

Não houve diferença significativa entre o controle e recuperação para 96 e 240 h. A redução significativa de células com presença de micronúcleos dos organismos anteriormente expostos apresentou níveis próximos (sem diferença significativa) a frequência de micronúcleo do controle. A frequência de micronúcleos dos tempos de recuperação foi reduzida a aproximadamente 50% daquelas observada nos peixes expostos as concentrações subletais de cobre.

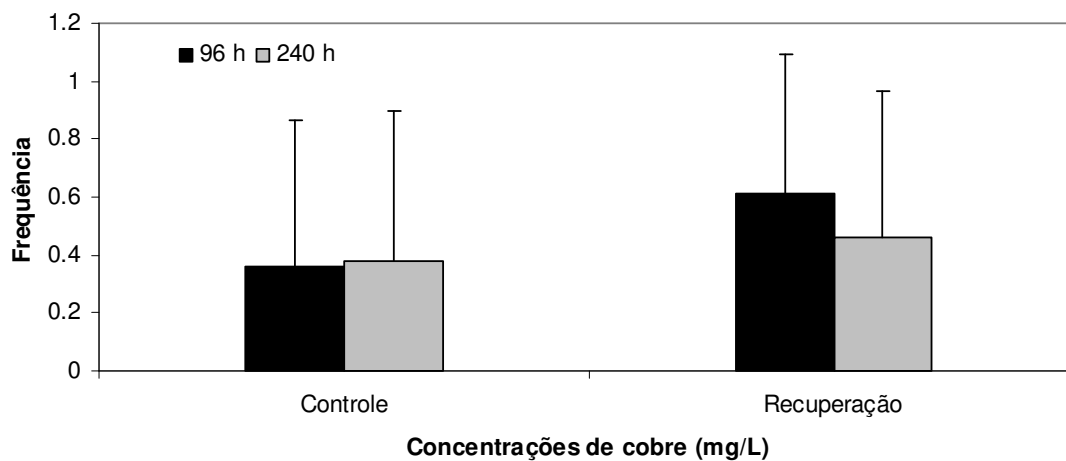


Figura 9. Frequência de células com a presença de micronúcleos (‰) em células sanguíneas do robalo peva (*Centropomus parallelus*) após 96 e 240 h de recuperação em água não contaminada pelo cobre.

4. DISCUSSÃO

Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 h (RAND; PETROCELLI, 1985). Comparando a tolerância ao cobre entre *Centropomus parallelus* e juvenis de outros peixes marinhos, este mostrou ser menos sensível em relação a *Trachinotus marginatus* (MARTINS; BIANCHINI, 2008) e menos sensível ainda quando comparado com a grande maioria de peixes dulcícolas como *Pimmepholes promelas*, *Lepomis macrochirus*, *Carassius auratus* e *Poecilia reticulatus* (PICKERING; HENDERSON, 1966) *Prochilodus scrofa* (MAZON; FERNANDES, 1999), *Hyphessobrycon scofoli* e *Corydoras sp.* (DUARTE et al., 2005), e *Paracheirodon axelrodi* (SILVEIRA RODRIGUEZ, 2006).

A concentração de cobre nas brânquias de *Centropomus parallelus* observada nas primeiras 24 h de exposição ao cobre foi próxima aquela observada nos peixes expostos a 96 h, indicando uma saturação do metal no tecido. Resultado semelhante foi relatado por Martins e Bianchini (2008) para *Trachinotus marginatus* expostos a uma concentração letal (CL₅₀) de cobre (0,369 mg/L) em que, após 6 h de exposição, houve saturação da concentração brânquial de cobre, indicando que os sítios de ligação do metal nas brânquias podem ter sido completamente ocupados nas primeiras horas de exposição. Portanto, as brânquias podem agir como um ligante biótico importante para o cobre, sendo um sítio primário de acúmulo do metal na fase dissolvida (ROMEO et al. 1994; ZIA; MCDONALD, 1994; MARTINS; BIANCHINI, 2008).

De acordo com Hagger et al. (2006), *C. parallelus* pode ser considerado uma espécie relevante em programas de monitoramento utilizando biomarcadores, com o objetivo de identificar a ocorrência de efeitos nocivos induzidos pelo cobre na água do mar. O teste cometa permite uma clara distinção entre a variabilidade natural e aquela induzida pelo estresse causado pelo contaminante que apresentar genotoxicidade (LEMOS et al., 2005). Há um número limitado de estudos utilizando o ensaio do cometa com espécies de peixes marinhos, em comparação com aqueles que utilizam espécies de água doce (FRENZILLI et al., 2009). Neste estudo, o ensaio do cometa não apresentou diferença significativa entre as concentrações de cobre, porém ambas mostraram diferença em relação ao controle. Mesmo para o intervalo de 24 horas e a menor concentração, houve diferença significativa, demonstrando rápida resposta do organismo ao ensaio do cometa. Di Paolo (2006) aplicando o ensaio cometa, também em *C. parallelus* exposto à β -naftoflavona, encontrou alta sensibilidade para este método, similar aos resultados obtidos por Villela et al. (2006) em estudo realizado com o bivalve *Limnoperna fortuna* utilizando diferentes concentrações de sulfato de cobre.

Na maioria dos estudos de curto prazo em períodos de exposição, variando entre 24 e 96 h, foram observados micronúcleos, sendo notificados como biomarcador sensível de genotoxicidade (CAVAS et al., 2005). Kirschbaum et al. (2008) comparando a frequência de micronúcleos em eritrócitos de *C. parallelus* para um estuário considerado poluído (estuário de São Vicente SP) e

outro conservado (estuário de Cananéia SP), encontrou valores até dez vezes maiores do ponto poluído em relação ao controle, apontando o método como satisfatório para ser empregado em estudos de monitoramento ambiental de ecossistemas marinhos e estuarinos. Para o presente estudo foi encontrado valores em média três vezes maiores entre o controle e as concentrações de 0,47 e 0,94 mg/L de cobre, resultados inferiores aos encontrados por Kirschbaum et al. (2008), porém de relevância significativa para estudos com substância única de controle.

Diferente dos altos níveis de toxicidade encontrados em *C. parallelus*, Bueno (2000) não encontrou diferenças significativas para a espécie de água doce *Geophagus brasiliensis*, coletados em sítio referência e em local poluído, utilizando como biomarcador citogenético a presença de micronúcleos em células. Sanchez-Galan et al. (1999) relataram que *Phoxinus phoxinus* também se mostrou pouco sensível a diferentes poluentes, tais como metais pesados. A grande variação de sensibilidade ao cobre entre as espécies sensíveis ao cobre dificulta o estabelecimento de limites máximos de lançamento deste metal no ambiente. Não é possível testar todos os organismos e, assim, agregar toda a gama de sensibilidade. Considerando o grande número de espécies habitando um local específico, é pouco provável que as espécies mais sensíveis e as mais tolerantes já tenham sido submetidas a testes de toxicidade (GROSELL et al., 2007).

O cobre demonstrou ser um metal tóxico para *C. parallelus* pelo teste do micronúcleo, se comparado com outras espécies de peixes. Cavas et al. (2005) submeteu 3 espécies de peixes de água doce às concentrações de 0,01 e 0,25 mg/L de cobre, onde *Carassius gibelio* apresentou frequência de micronúcleos na concentração de 0,25 mg/L semelhante aos encontrado no presente trabalho. Em *Cyprinus carpio* foram encontrados valores praticamente quatro vezes acima da frequência de MN de *C. parallelus*, e para a espécie *Corydoras paleatus* houve mortalidade em ambas concentrações.

De acordo com Grazeffe et al. (2008), o aumento da concentração de contaminante induz a ocorrência de mais danos ao material genético. Contudo, ao retirarmos o contaminante é esperado que o nível de recuperação seja acelerado. Diferente das mutações, as lesões detectadas com o teste do cometa são passíveis de correção (GONTIJO; TICE, 2003), constituindo, portanto, lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001).

Tanto o ensaio cometa quanto o teste do micronúcleo não apresentaram diferenças significativas para os testes de recuperação, onde os organismos que foram previamente expostos por 96 horas obtiveram padrões de danos não significativos em relação ao controle, diferentemente dos testes de exposição para 24 e 96 horas, onde houve diferença em relação aos respectivos controles. De acordo com Amado et al. (2006) em avaliações de recuperação de animais após exposição a contaminantes, quando a recuperação é mais rápida indica danos leves ocorridos e que o organismo foi capaz de se defender, evidenciando então que *C. parallelus* é uma espécie capaz de se defender rapidamente de uma ameaça fisiológica.

5. CONCLUSÕES

Os efeitos genotóxicos medidos através do ensaio cometa e do teste do micronúcleo sobre *Centropomus parallelus* frente à toxicidade do cobre puderam ser evidenciados, indicando estes como biomarcadores de toxicidade ao cobre para esta espécie.

Os resultados do ensaio cometa não evidenciaram com clareza o impacto do cobre sobre o robalo peva, enquanto o teste do micronúcleo mostrou que houve recuperação dos organismos submetidos a um tempo de recuperação por 96 e 240 horas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A toxicidade das substâncias aos organismos depende da concentração e das características ambientais que tem papel na especiação do cobre (HEATH, 1995), onde sugere-se a aplicação do Modelo do Ligante Biótico (BLM), cuja finalidade é avaliar a sensibilidade dos organismos, levando em consideração não só as características físicas e químicas da água, mas também o componente biológico exposto a toxicidade dos metais (PAQUIN et al., 1999; DI TORO et al., 2001). Este modelo teoriza que os ligantes abióticos, como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e a matéria orgânica, juntamente com o ligante biótico competem pelos metais existentes no meio. Considera-se para os peixes que este ligante biótico são as brânquias, mas especificamente os canais de Na^+ e Ca^{2+} .

SANTORE et al. (2001) propôs uma versão deste modelo para o cobre, cuja idéia é que sua toxicidade sobre o peixe ocorre quando o acúmulo nas brânquias ultrapassa uma concentração crítica. Para o presente estudo, verificou-se que a menor concentração sub-letal (25% da CL50) já foi suficiente para demonstrar a concentração crítica do cobre sobre o robalo, onde a partir desta concentração o nível de dano deixa de ser exponencial até atingir um nível máximo de concentração de cobre por grama de tecido nas brânquias.

Como foi possível evidenciar o impacto do cobre sobre *C. parallelus*, é de suma importância que outras linhas de pesquisas sejam desenvolvidas, onde seja possível detectar fontes de despejo de efluentes com altos teores de cobre, e realizar experimentos de bioacumulação do metal nos tecidos e analisar efeitos os de mutagênese e genotoxicidade. A relação de impacto do cobre sobre o robalo deve ser apresentada aos programas governamentais regulatórios no que tange a qualidade dos organismos marinhos com grande apelo comercial que habitam áreas poluídas.

7. REFERÊNCIAS

Ali D, Nagpure NS, Kumar S, Kushwaha B, Lakra WS. 2009. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Food and Chemical Toxicology**, 47: 650–656.

Ateeq B, Abul Farah M, Ali NM, Ahmad W. 2002. Induction of micronuclei & erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, 518:135-144.

ATSDR, 1990. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for copper**. Syracuse: US Department of Commerce.

Avishai N, Rabinowitz C, Moiseeva E, Rinkevich B. 2002. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay, **Mutation Research**, 518:21-37.

Ayllón F, Garcia-Vazquez E. 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of fish micronucleus test. **Mutation Research**, 467:177-186.

Bahari IB, Noor FM, Daud NM. 1994. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. **Mutation Research** 313:1-5.

Bhunya SP, Jena GB. 1996. Clastogenic effects of copper sulphate in chick *in vivo* test system. **Mutation Research**, 367:57-63.

Banu BS, Ishaq M, Danadevi K, Padmavathi P, Ahuja YR. 2004. DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate. **Food and Chemical Toxicology**, 42:1931-1936.

Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsch-Volders M. 1996. Cytogenetic studies of PCB on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, 11: 485-492.

Bombail V, Dennis A, Gordon E, Batty J. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, 44:383-392.

Brunetti R, Majone F, Gola I, Beltrame A. 1988. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. **Marine Ecology Progress Series**, 44:65-68.

Bücker A, Carvalho A, Alves-Gomes JA. 2006. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazônica*, 36: 357–364.

Bueno AMS. 2000. Biomonitoramento citogenético *in situ*: um instrumento indicador de genotoxicidade ambiental. **Biotemas**, 13:137-158.

Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulout FN. 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research**, 438:155-161.

Carrasco KR, Tilbury KL, Mayers MS. 1990. Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 47:2123-2136.

Carter MR, Burns LA, Cavinder TR, Dugger KR, Fore PL, Hicks DB, Revells HL, Schmidt TW, Farley R. 1973. **Ecosystems analysis of the big cypress swamp and estuaries**. United States Environmental Protection Agency. South Florida Ecological Study. Florida: 20 p.

Carvajal JR. 1975. **Contribucion al conocimiento de la biología de los robalos *Centropomus undecimalis* y *C. Poeyi* en la laguna de terminos, Campeche, México**. Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela: Boletín del Instituto Oceanográfico. 14:51-70.

Cavas T, Ergene-Gözükara S. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silverstained nucleolar regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, 538:81-91.

Cavas T, Garanko NN, Arkhipchuk VV. 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, 43:569–574.

Chaves H. 1963. Contribucion al conocimiento de la biología de los robalos, chucumite y constantino (*Centropomus spp.*) del estado de Veracruz. **Contribución de la Estación de Biología Marina del Instituto Tecnológico de Veracruz. México: Ciência**. 22:141-161.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente, **Resolução nº 357**, de 17 de março de 2005, Brasil, 23 p.

De Flora S, Zanicchi P, Camoirano A, Bennicelli C, Badolati GS. 1984. Genotoxicity activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. **Mutation Research**, 133:161-198.

Devaux A, Pesonen M, Monod G. 1997. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, 11:71-79.

Di-Paolo C. 2006. **Aplicação do ensaio do cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

Di Toro D, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR, Santore RC. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. **Environmental Toxicology Chemical**, 200:2383-2396.

Duarte RM, Menezes AC, Rodrigues LS, Laredo MA, Val AD. 2005. Biological effects of copper on fish of the Amazon. Quartely Report of Activites for ICA.

FAO Fisheries Department. 1978. FAO Species – Identification Sheets for Fishery Purposes, v. II. **Marine Resources and Environmental Division**, Rome.

Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455:81-95.

Fenech M, Cheng WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, 534:65-75.

Ferraro MVM, Fenocchio AS, Mantovani MS, Ribeiro CO, Cestari MM. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, 27:103-107.

Figueiredo-Fernandes A, Ferreira-Cardoso JV, Matos P, Fontaínhas-Fernandes A. 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesq. Veterinary. Brasil**. 27:103-109.

Fragoso NM, Parrot JL, Hahn ME, Hodson PV. 1998. Chronic retene exposure caises sustained induction of CYP1A activity and protein in rainbow trot (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology Chemical**. 17:2347-2353.

Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, 681:80–92.

Gilmore RG, Donahoe CJ, Cooke DW. 1983. Observations on the distribution and biology of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Florida Scientist**. 46:313–336.

Gontijo AMM, Tice R. 2003. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 173-200p.

Grassi LEA. 2002. **Hematologia, biometria, teor de compostos organoclorados e freqüência de formação de micronúcleos em teleósteos de água doce, sob diferentes condições limnológicas**. Tese (Doutorado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 166 p.

Grazeffe VS, Tallarico LF, Pinheiro AS, Kawano T, Suzuki MF, Okazaki K, Pereira CAB, Nakano E. 2008. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research**, 654:58–63.

Grisolia CK. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, 518:145-150.

Grosell M, Blanchard J, Brix KV, Gerdes R. 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. **Aquatic Toxicology**, 84:162-172.

Hagger JA, Jones MB, Leonard DR, Owen R, Galloway TS. 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers? **Integrated Environmental Assessment and Management**, 2:312-129.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**. 11:714-719.

Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Asano N, Sofuni T, Ojima Y. 1998. Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, 399 :125-133.

Heat AG. 1995. **Water Pollution and Fish Physiology**. C.R.C. Press Inc., Boca Raton, 245p.

Heddle JA. 1973. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, 18:187-192.

Heuser V.; D.; Andrade V. M.; Peres A.; Braga L. M. G. M.; Chies J. A. B. 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cellular Biology**, 32:1223-1229.

Hooftman RN, Raat WK. 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, 104:147–152.

Hose JE, Cross JN, Smith SG, Diehl D. 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. **Marine Environmental Research**, 22:167-176.

IBAMA (Brasil). Portaria no 49-N, de maio de 1992. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília.

Kammann U, Bunke M, Steinhart H, Theobald N. 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, 498:61-77.

Kirschbaum AA, Seriani R, Pereira CDS, Assunção A, Abessa DM, Rotundo MM, Ranzani-Paiva MJT. 2008. **Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*.**

Koppen G, Toncelli LM, Triest L, Verschaeve L. 1999. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, 110:13-24.

Kosz-Vnenchak M, Rokosz K. 1997. The comet assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. **Folia Biologica**, 45:153-156.

Lacerda, L. D.; Carvalho, C. E. V.; Gomes, M. P. 1989. Nota sobre a distribuição de Mn, Zn e Cu em siris da Baía de Sepetiba. **Revista Brasileira de Biologia**, 49:847-849.

Lau SR, Shafland PL. 1982. Larval Development of Snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae). **Copeia**, 3:618-627.

Lee RF, Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, 544:43-64.

Lemos NG. 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 19:197-201.

Linder MC. 1983. Changes in the distribution and metabolism of copper in cancer: a review. **Journal Growth Cancer**, 1:27-38.

Machado MR. 1999. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Ciência Biologia e Saúde**, 1:63-76.

Marshall WS, Grosell M. 2005. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Eds.), **The Physiology of Fishes**, 3:177-230.

Martin JH, King TT. 1991. Occurrence of fat snook (*Centropomus parallelus*) in Texas: evidence for a range extension. **Marine Science**, 32:123-126.

Martins SE, Bianchini A. 2008. Copper accumulation and toxicity in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832 (Teleostei, Carangidae). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, 3:384-390.

Matsumoto ST. 2004. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de**

recursos hídricos da região de Franca/SP. Tese de Doutorado em Genética, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 216p.

Matsuo AYO. 2004. **Aspectos ecofisiológicos e ecotoxicológicos em espécies da ictiofauna do Rio Negro, Amazônia, com ênfase em regulação iônica.** Tese de Doutorado, INPA/UFAM, Manaus, 204p.

Mazon AF, Fernandes MN. 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Environmental Toxicology**, 63:797-804.

McMichael RH, Peters KM, Parsons GR. 1989. Early life history of the snook, *Centropomus undecimalis* in Tampa Bay, Florida. **Northeast Gulf Science**, 10:113–125.

Mitchelmore CL, Chipman JK. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, 399:135-147.

Miracle AL, Ankley GT. 2005. Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. **Reproductive Toxicology**, 19:321-326.

Montei DK, Vanstone J. 1995. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. **Mutation Research**, 345:97-103.

Moller P. 2006. The Alkaline Comet Assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic. Pharmacology. Toxicology**, 98:336-345.

Mubiana VK, Vercauteren K, Blust R. 2006. The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal accumulation in *Mytilus edulis*. **Environmental Pollution**, 144:272-279.

Nacci DE, Cayula S, Jackmin E. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, 35:197- 210.

Pandrangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M. 1995. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 26:345-356.

Paquin PR, Di Toro DM, Santore RC, Triveldi D, Wu K. 1999. **A biotic ligand model of the acute toxicity of metals.** Office of Research and Development, Washington DC. 102p.

Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT. 1998. Effects of micronutrients on metal toxicity. **Environmental Health Perspectives**. 106:203-215.

Pérez-Pinzón MA, Lutz PL. 1991. Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook (*Centropomus undecimalis*). **Bulletin of Marine Science**, 48:58-66.

Pfeiffer WC, Lacerda CD, Fiszman M, Lima NRW. 1985. Metais pesados no pescado da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, RJ. **Ciência e Cultura**, 37:297-302.

Pickering QH, Henderson P. 1966. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fishes. **Air Water Pollut Int Journal**. 10: 453-463.

Pisoni M, Cogotzi L, Frigeri A, Corsi I, Bonacci S, Focardi S, Svelto M. 2004. DNA adducts, benzopyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). **Environmental Research**, 96:163-175.

Powers D.A. 1989. Fish as model systems. **Science**. 246:352-358.

Ramelow GJ, Webre CL, Mueller CL, Beck JN, Young JC, Langley MP. 1989. Variations of heavy metals and arsenic in fish and other organisms from the Calcasien River and Lake, Louisiana. **Arch. Environmental Toxicology**, 18:804-818.

Rand GM, Petrocelli SR. 1985. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington. 665p.

Rivas LR. 1962. The Florida fishes of the genus *Centropomus*, commonly known as snook. **Quarterly Journal of the Florida Academy of Science**, 25(1):53-64.

Rivas LR. 1986. Sistematic Review of the Perciform fishes of the genus *Centropomus*. American Society of Ichthyologist and Herpetologist. **Copeia**, 3:579-611.

Roesijadi G, Robinson WE. 1994. Metal Regulation in Aquatic Animals: Mechanisms of Uptake, Accumulation, and Release. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives**, 23:387-420.

Rojas E, Lopez MC, Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, 722: 250-254.

Roméo M, Mathieu A, Gnassia-Barelli M, Romana A, Lafaurie M. 1994. Heavy metal content and biotransformation enzymes in two fish species from the NW Mediterranean. **Marine Ecology Progress Series**, 107:15-22.

Rosen G. 1964. Mutations induced by the action of metal ions in *Pisum* II. **Hereditas**, 51:90-94.

Sasaki YF, Izumiyama F, Nishidate E, Ishibashi S, Tsuda S, Matsusaka N, Asano N, Saotome K, Sofuni T, Hayashi M. 1997. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, 393:133-139.

Sanchez-Galan S, Linde AR, Arcia-Vazquez E. 1999. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 43:301-304.

Santore RC, Di Toro DM, Paquin PR, Allen HE, Meyer JS. 2001. Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and Daphnia. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 20:2397-2402.

Schmid W. 1975. The micronucleus test. **Mutation Research**, 31:9-15.

Serafim MA, Bebianno MJ. 2001. Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 20:544-552.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider ELA. 1988. Simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175:184-191.

Shafland PL, Foote KJ. 1983. A lower lethal temperature for fingerling snook, *Centropomus undecimalis*. **Northeast Gulf Science**. 6:175-178.

Silveira Rodrigues L. 2006. **Efeitos tóxicos do cobre no Cardinal Tetra (*Paracheirodon axelrodi* SCHULZ, 1956)**. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Sousa E, Abessa DMS, Rachid BRF, Gasparro MR, Zaroni LP. 2007. Ecotoxicological assessment of sediments from the port Santos and the disposal sites of dredged material. **Brazilian Journal Oceanography**, 55:75-81.

Teixeira RL. 1997. Distribution and feeding habits of the young common snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae), in the shallow waters of a tropical Brazilian estuary. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, 6:35-46.

Tice R R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and In vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis**, 35:206-22.

Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13:57-149.

Vasconcelos-Filho AL, Azevedo SB, Alves ML. 1980. Regime alimentar dos camorins *Centropomus undecimalis* e *Centropomus parallelus* do Canal de Santa Cruz (Pernambuco, Brasil). Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, Anais, Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 175-184p.

Villela IV, Oliveira IM, Silva J, Henriques JAP. 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, 605:78-86.

Vitozzi L, De Angelis GA. 1991. Critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. **Aquatic Toxicology**, 19:167-204.

Vrzoc M, Petras ML. 1997. Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting. **Mutation Research**, 381:31-40.

WHO, 1998. World Health Organization. **Copper**. Geneva: Environmental Health Criteria 200.

Wootton RJ. 1990. Ecology of teleost fishes. Fishes and Fisheries Series 1. New York, **Chapman and Hall**, 404p.

Zia S, McDonald DG. 1994. Role of the gills and gill chloride cells in metal uptake in the freshwater adapted rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Canadian Journal of Fishery and Aquatic Science**, 51:2482-2492.

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](#)