

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
MESTRADO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA

**BIOMARCADORES EM PEIXES COMO FERRAMENTA NA AVALIAÇÃO
DA QUALIDADE DE AMBIENTES ESTUARINOS NA ILHA DO MARANHÃO,
BRASIL**

São Luís – MA

2016

SILDIANE MARTINS CANTANHÊDE

**BIOMARCADORES EM PEIXES COMO FERRAMENTA NA AVALIAÇÃO
DA QUALIDADE DE AMBIENTES ESTUARINOS NA ILHA DO MARANHÃO,
BRASIL**

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Martins Silva Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lígia Tchaicka

São Luís – MA

2016

Cantanhêde, Sildiane Martins.

Biomarcadores em peixes como ferramenta na avaliação da qualidade de ambientes estuarinos na Ilha do Maranhão, Brasil / Sildiane Martins Cantanhêde – São Luís, 2015.

62 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Débora Martins Silva Santos.

1. Ambiente aquático. 2. Peixe. 3. Monitoramento. I. Título

CDU: 639.2.053.3(812.1)

SILDIANE MARTINS CANTANHÊDE

**BIOMARCADORES EM PEIXES COMO FERRAMENTA NA AVALIAÇÃO
DA QUALIDADE DE AMBIENTES ESTUARINOS NA ILHA DO MARANHÃO,
BRASIL**

Dissertação apresentada em
cumprimento às exigências do Programa
de Pós-Graduação em Recursos
Aquáticos e Pesca da Universidade
Estadual do Maranhão.

Aprovada em ____/____/____

Banca examinadora

Prof^a Dr^a. Débora Martins Silva Santos (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Prof^a. Dr^a. Juliana da Silva
Universidade Luterana do Brasil (ULBRA)
1^a Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
2^a Examinadora

Prof^a. Dr^a. Raimunda Nonata Carvalho Neta
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
3^a Examinadora

Agradecimentos

À Deus, pela vida e pela força para realizar esse trabalho;

À minha família que é a minha base e o motivo da concretização desse sonho, em especial ao meu esposo, Dailton, pela ajuda nas coletas;

À minha orientadora professora Dra. Débora Martins Silva Santos pela motivação, paciência e compreensão;

À minha co-orientadora professora Dra. Lígia Tchaicka pela contribuição, motivação, criatividade e por sempre me mostrar uma solução.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa Biologia e Ambiente Aquático;

À professora Dra. Juliana da Silva pelas contribuições;

Ao professor Torres pela grande ajuda nas coletas;

Ao Laboratório de Solos e ao Laboratório de Microbiologia e Alimentos da Universidade Estadual do Maranhão pelas análises de metais e microbiológica da água respectivamente;

À Lorrane, Fernanda, Solange e Priscila pela contribuição na pesquisa;

À Laurinete pelo apoio durante o mestrado;

À banca de qualificação, professor Dr. Ricardo Luvizotto Santos e professora Dra. Ana Lúcia Abreu Silva;

À Universidade Estadual do Maranhão pela minha formação acadêmica;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa;

Obrigada a todos que contribuíram e torceram por mim durante essa jornada!

Resumo

Os ambientes estuarinos recebem muitos contaminantes que podem induzir danos em nível molecular, bioquímico, celular, histológico e fisiológico. Espécies de peixes do gênero *Centropomus* são importantes recursos alimentares para as populações locais, as espécies desse grupo são predadoras que se alimentam de pequenos peixes e invertebrados bentônicos, sendo, portanto, vulneráveis à bioconcentração e biomagnificação de contaminantes. Considerando que os estuários são continuamente impactados devido à urbanização, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a qualidade de dois ambientes salobros localizados na Ilha do Maranhão por meio de biomarcadores histológicos e genotóxicos em *Centropomus undecimalis* comparando os dados obtidos às concentrações de metais nas amostras de água coletadas em cada ponto de estudo. As alterações histológicas nas brânquias foram analisadas através do Índice de Alteração Histológica e as lesões genotóxicas nos eritrócitos foram detectadas pelo Teste do Micronúcleo e a técnica do Ensaio Cometa. As lesões branquiais e os micronúcleos foram utilizados na avaliação dos estuários da bacia do Bacanga e do Pau Deitado nos períodos chuvoso e seco de 2015. Já o Ensaio Cometa foi utilizado para comparar as duas áreas citadas apenas no período chuvoso. Os resultados da análise de metais mostraram que todas as amostras de água apresentaram no mínimo dois elementos com concentração acima do valor permitido pela resolução CONAMA 357/2005. Para a análise histológica das brânquias, os robalos de ambas as áreas avaliadas estavam com lesões moderadas, indicando que os peixes locais estão respondendo à estressores ambientais. Os valores de micronúcleo foram significativos entre as duas localidades no período chuvoso, mostrando que a bacia do rio Bacanga é a área mais impactada. Os valores médios dos escores de danos no DNA avaliados pelo Ensaio Cometa mostraram que os peixes da bacia do rio Bacanga apresentaram mais danos que os exemplares do estuário do Pau Deitado. Esses resultados servem de alerta à saúde pública, pois em ambas as áreas de estudo os peixes de *C. undecimalis* são comercializados. Diante dos resultados, os biomarcadores analisados mostraram-se como boas ferramentas na avaliação da qualidade ambiental das áreas e os dados gerados na pesquisa podem subsidiar programas de conservação pelos gestores locais, visto que os biomarcadores utilizados possibilitam a avaliação tanto da saúde do ambiente quanto dos organismos.

Abstract

Estuarine environments receive lots of contaminants that might induce to molecular, biochemical, cellular, histological and physiological damages. Species of fish from *Centropomus* genus are important as a food resource for the local populations, the species from this group are predators that feed from small fishes and benthic invertebrates; therefore, they are vulnerable to bioconcentration and biomagnification of contaminants. Considering that estuaries are continuously impacted due the urbanization, this research had the intention to measure the quality of two brackish environments located in the Island of Maranhão using histological and genotoxic biomarkers in *Centropomus undecimalis* comparing the gotten data to the concentration of metals in the water samples collected from each study point. Histological variations in gill were analyzed through the Histological Variation Index and genotoxic lesions in erythrocyte were detected by the Micronucleus Test and the Single Cell Gel Electrophoresis process (Comet Assay). Gill's lesions and micronucleus were used in evaluations of estuaries from the hydrographic basin of Bacanga and Pau Deitado in the raining and dry periods of 2015. The Comet Assay was used to compare the two mentioned areas only during the rainy season. The results from the analyses of metals showed that all water samples presented at least two elements with their concentrations above the allowed values, according to the resolution of CONAMA 357/2005. Regarding the gill's histological analyses, basses from both areas presented moderated lesions; witch indicates that the local fishes are reacting to stress environmental agents. The values of micronucleus were significant between both locations in the raining period, demonstrating that the hydrographic basin of Bacanga is an impacted area. The average values of DNA damage scores evaluated by the Comet Assay showed that fishes oh hydrographic basin of Bacanga presented more damages when compared to samples from estuaries of Pau Deitado. Those results have significant value to the public health, serving as an alert, because in both study areas the fishes from *C. undecimalis* are commercialized. Facing the results, the analyzed biomarkers were presented as good tools of environmental evaluation of quality of the areas, and the data produced by this research can subsidize conservation programs by the local managers, since the used biomarkers allows the evaluation of the environments' and organisms' health.

Lista de Figuras

| | P |
|--|----|
| Figura 1. Localização das áreas de estudo, Bacia do rio Bacanga e estuário do Pau Deitado, Ilha do Maranhão, Brasil..... | 20 |
| Figura 2. Exemplar de peixe do gênero <i>Centropomus undecimalis</i> , coletado na bacia do rio Bacanga, São Luís, Maranhão..... | 22 |
| Figura 3. Estrutura branquial normal de <i>Centropomus undecimalis</i> coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015. A: 1 – lamela secundária; 2 – seio venoso; 3 – epitélio basal; 4 – epitélio filamentar. B: 1 – ápice do filamento; 2 – sistema de células pilares..... | 27 |
| Figura 4. Alterações histológicas em brânquias de <i>Centropomus undecimalis</i> coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015. A: 1 – descolamento do epitélio lamelar; 2 – hiperplasia das células epiteliais; 3 – dilatação do seio venoso. B: 1 – hiperplasia das células de muco no ápice do filamento. C: 1 – Congestão vascular lamelar. D: 1 – fusão completa de todas as lamelas..... | 28 |
| Figura 5. Teste do Micronúcleo em eritrócitos de <i>Centropomus undecimalis</i> coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015. A. Eritrócito normal; B. Micronúcleo – seta; C. Notched – seta; D. Lobed – seta; E. Blebbed – seta; F. Célula binucleada. Coloração Rosenfield modificada. Aumento 1000x..... | 30 |
| Figura 6. Níveis de danos do DNA no Ensaio Cometa em eritrócitos de <i>Centropomus undecimalis</i> . A: Classe 0 (DNA intacto, nucleóide – seta); B: Classe 1 (DNA com baixo nível de danos); C: Classe 2 (DNA com nível médio de danos); D: Classe 3 (DNA com nível alto de danos, cauda do cometa __). Coloração com prata. Aumento 400x..... | 31 |

Lista de Tabelas

| | P |
|--|----|
| Tabela 1. Médias dos dados biométricos entre machos e fêmeas de <i>Centropomus undecimalis</i> coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área..... | 25 |
| Tabela 2. Frequência dos estágios gonadais entre machos e fêmeas de <i>Centropomus undecimalis</i> coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área..... | 25 |
| Tabela 3. Valores dos parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas no período chuvoso e seco de 2015 por área..... | 26 |
| Tabela 4. Concentração dos metais analisados nas amostras de água coletadas nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área..... | 26 |
| Tabela 5. Classificação das alterações histológicas branquiais de <i>Centropomus undecimalis</i> coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área..... | 28 |
| Tabela 6. Médias do IAH nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área..... | 29 |
| Tabela 7. Frequência da intensidade das alterações em brânquias de <i>Centropomus undecimalis</i> coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área..... | 29 |
| Tabela 8. Médias das frequências de Micronúcleos e Alterações Nucleares em eritrócitos de <i>Centropomus undecimalis</i> coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área..... | 30 |
| Tabela 9. Média das classes e dos escores de danos no DNA de eritrócitos de <i>Centropomus undecimalis</i> | 31 |

Lista de siglas e abreviaturas

AN: Alterações nucleares

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EC: Ensaio Cometa

IAH: Índice de alteração histológica

MN: Micronúcleo

S1: Bacia do rio Bacanga

S2: Estuário do Pau Deitado

SUMÁRIO

| | P |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 OBJETIVO GERAL..... | 13 |
| 2.1 Objetivos Específicos..... | 13 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 14 |
| 3.1 Ecossistemas estuarinos..... | 14 |
| 3.2 Peixe como bioindicador de contaminação ambiental..... | 15 |
| 3.3 Biomarcadores de contaminação ambiental..... | 16 |
| 3.3.1Biomarcadores Histopatológicos..... | 17 |
| 3.3.2Biomarcadores Genotóxicos..... | 18 |
| 3.3.2.1 <i>Teste do Micronúcleo</i> | 18 |
| 3.3.2.2 <i>Ensaio Cometa</i> | 19 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 20 |
| 4.1 Área de estudo..... | 20 |
| 4.2 Coleta dos peixes..... | 21 |
| 4.3 Análise da água..... | 22 |
| 4.3.1 <i>Físico-química</i> | 22 |
| 4.3.2 <i>Metais</i> | 22 |
| 4.4 Análise histopatológica das brânquias..... | 23 |
| 4.5 Análise genotóxica em eritrócitos..... | 23 |
| 4.5.1 <i>Teste do Micronúcleo</i> | 23 |
| 4.5.2 <i>Ensaio Cometa</i> | 24 |
| 4.6 Análise Estatística..... | 24 |
| 5 RESULTADOS..... | 25 |
| 5.1 Análise da água..... | 26 |
| 5.2 Histopatologia das brânquias..... | 27 |
| 5.3 Análises genotóxicas | 29 |
| 5.3.1 <i>Teste do Micronúcleo</i> | 29 |
| 5.3.2 <i>Ensaio Cometa</i> | 30 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 31 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 38 |
| REFERÊNCIAS..... | 39 |

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes de água salobra ocorrem principalmente em estuários e lagunas. Os estuários são ecossistemas costeiros e ambientes de transição entre os oceanos e rios. São importantes pela diversidade biológica e por propiciar alimentação, abrigo e área para reprodução de diversas espécies. São excelentes locais para atividade pesqueira e portuária (SANTOS et al., 2006).

Os sistemas estuarinos atualmente sofrem com a urbanização em suas margens, consequências deste processo como o lançamento de efluentes domésticos em seus corpos d'água tem diminuído a qualidade ambiental desses ecossistemas. Nessas áreas observa-se uma carência nas condições sanitárias de abastecimento de água, coleta de lixo, tratamento e disposição de esgotos.

Diante das constantes agressões ao meio ambiente, cresce o interesse de elaborar programas de monitoramento e recuperação de áreas degradadas. Neste trabalho, foram investigadas dois ambientes estuarinos na Ilha do Maranhão, com o intuito de avaliar a qualidade ambiental desses locais, a pesquisa utilizou parâmetros biológicos como ferramenta na avaliação de contaminação ambiental. Utilizaram-se os peixes como bioindicadores e alterações histológicas e genotóxicas como biomarcadores na avaliação da qualidade ambiental das áreas analisadas.

Sabe-se que, o monitoramento ambiental por meio de organismos expostos a poluentes, chamados atualmente como bioindicadores utilizando testes em sistemas biológicos, denominados de biomarcadores apresenta-se como ferramenta promissora para avaliar a qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos.

Dessa forma, o uso de parâmetros biológicos nesta pesquisa pode fornecer um diagnóstico seguro sobre a saúde das espécies de peixes locais e da qualidade da água, como os robalos são muito consumidos em ambas as áreas, faz-se necessário saber se os peixes estão saudáveis ou não. Os dados gerados na pesquisa podem ainda subsidiar programas de recuperação e gestão ambiental nas áreas, já que as áreas analisadas sofrem com a poluição.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar lesões branquiais e genotóxicas em exemplares de *Centropomus undecimalis* (Pisces, Centropomidae) como biomarcadores de contaminação aquática em ambientes costeiros salobros na Ilha do Maranhão, Brasil.

2.1 Objetivos Específicos

- Analisar a intensidade das lesões branquiais nos exemplares de peixes por meio do Índice de Alteração Histológica;
- Detectar lesões genotóxicas em eritrócitos dos peixes por meio do Ensaio Cometa e o Teste do Micronúcleo;
- Identificar os biomarcadores mais adequados para o emprego da espécie em monitoramento ambiental.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ecossistemas estuarinos

A Zona Costeira constitui uma região de transição ecológica, desempenhando importante papel no desenvolvimento e reprodução de várias espécies e nas trocas genéticas que ocorrem entre os ecossistemas terrestres e marinhos (MMA, 2010).

A área marinha adjacente à costa é constituída por águas quentes, nas costas nordeste e norte, e por águas frias, no litoral sul e sudeste, dando suporte a uma grande variedade de ecossistemas que incluem dunas, praias, banhados e áreas alagadas, estuários, restingas, manguezais, costões rochosos, lagunas e marismas, os quais abrigam inúmeras espécies de flora e fauna, muitas das quais endêmicas e várias ameaçadas de extinção (MMA, 2002a, 2002b).

Os estuários, principais áreas de estudo desta pesquisa, são ambientes de corpos d'água que ocupam a região de transição entre os oceanos e os rios. Por ser um sistema aberto na relação mar e rio, a zona estuarina é tida como elo de ligação para os animais, atendendo suas necessidades como alimentação, crescimento, reprodução e proteção (SANTOS et al., 2006).

Na faixa litorânea da Ilha do Maranhão muitos estuários sofrem com os mais variados impactos ambientais, principalmente com o processo de urbanização. Como as grandes cidades estão localizadas na faixa litorânea, os estuários são locais propícios para especulação imobiliária, degradando a qualidade ambiental desses ecossistemas como a liberação de efluentes urbanos e lixo nos rios que deságuam nas áreas interligadas ao sistema estuarino.

Os sistemas estuarinos e as áreas de manguezal, de modo especial, são aqueles com maiores riscos, tanto biológicos quanto socioeconômicos, e são regiões onde as medidas de manejo, quando bem estudadas e planejadas, resultam em significativa melhoria ambiental (ARAÚJO et al., 2011).

Nesse contexto, o estudo das respostas biológicas de peixes tem sido considerado como promissoras ferramentas para avaliar a qualidade ambiental e identificar possíveis poluentes capazes de causar danos à saúde humana e às espécies em ambientes impactados.

O uso sistemático das respostas de organismos vivos, seja ele como um todo ou, através de um determinado tecido, para avaliar mudanças ocorridas no ambiente,

geralmente causadas por ações humanas é definido como biomonitoramento (MATTHEWS et al., 1982; SILVA et al., 2003).

O biomonitoramento utilizando respostas biológicas como indicadores de degradação ambiental é vantajoso, pois os organismos integram as condições ambientais durante toda a sua vida, e podem responder com especificidade em relação a certos tipos de impacto, já que inúmeras espécies são comprovadamente sensíveis a um tipo de poluente, mas tolerantes a outros.

3.2 Peixe como bioindicador de contaminação ambiental

O termo bioindicador refere-se às espécies sentinelas que são utilizadas como primeiros indicadores de efeito da contaminação de seu habitat (ADAMS, 2002).

Os peixes são excelentes organismos sentinelas no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos, pois estão diretamente expostos aos agressores deste compartimento ambiental, reagindo sensivelmente a quaisquer alterações no meio (LEMOS et al., 2007). Apesar da dificuldade em se estabelecer ligações diretas entre efeitos ecológicos e a saúde humana, o uso de espécies da fauna nativa como sentinelas de problemas ambientais é a base conceitual para esta conexão (SILVA et al., 2003).

Ao escolher um bioindicador, devem ser observadas algumas características importantes como: abundância no ambiente, tamanho relativamente grande, longo ciclo de vida, adaptação a ensaios laboratoriais, dentre outros (AKAISHI et. al, 2004; JOHNSON et al., 1993).

No presente estudo utilizaram-se espécies do gênero *Centropomus* (Pisces, Centropomidae) conhecidas popularmente como robalo. A espécie *Centropomus undecimalis* foi escolhida devido a seus espécimes serem passíveis de acumular contaminantes, pois são carnívoros e por serem representativos nas áreas de estudo nos dois períodos sazonais durante o ano.

Os robalos ou camurins são peixes marinhos de águas costeiras que adentram os estuários e rios de água doce nas diferentes fases de seu ciclo de vida. Habitam, portanto, as principais bacias hidrográficas de sua área de ocorrência nos seus cursos inferiores (GILMORE et al., 1983; ALVAREZ-LAJONCHERE et al., 1982).

Na costa brasileira existe 4 espécies catalogadas: *Centropomus undecimalis*, *Centropomus parallelus*, *Centropomus ensiferus* e *Centropomus pectinatus*. Dentre estas, *C. undecimalis* e *C. parallelus* são espécies comercialmente importantes no Brasil.

Os peixes robalos são espécies eurihalinas, podendo ser encontradas tanto no mar como nas águas salobras estuarinas, lagunas, desembocaduras de rios e lagoas de água doce, com acesso temporário ou permanente. Sua adaptação a diferentes habitats e salinidade os caracterizam como peixes rústicos e gregários que aceitam bem o cativeiro; carnívoros e vorazes alimentam-se de peixes, crustáceos e moluscos (MUHLIA-MELO et al., 1995).

3.3 Biomarcadores de contaminação ambiental

Biomarcadores são respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DEPLEDGE, 1994). Os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: de exposição, efeito ou suscetibilidade (JESUS; CARVALHO, 2008).

Os biomarcadores de exposição são alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a um poluente (JESUS; CARVALHO, 2008), podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna (RUDIGER, 1999; WHO, 1993).

Os biomarcadores de efeito, não fornecem informações sobre sua natureza, mas são característicos da ocorrência de um estresse que pode ser reversível. São caracterizados pela indução de mecanismos de defesa celular, que se iniciam sempre como uma resposta adaptativa em nível molecular/bioquímico. No entanto, se esse mecanismo falhar ou se sua capacidade de resposta for ultrapassada, poderão ser desencadeadas alterações fisiológicas ou histológicas, podendo ser irreversíveis, dependendo da capacidade do sistema ou órgão em responder ao estressor (WINZER et al., 2001).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processo que causa variações de respostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (BARRETT et al., 1997), são predominantemente genéticos, embora a patologia, alterações fisiológicas, medicamentos e exposição a outros agentes ambientais também possam alterar a suscetibilidade individual (RUDIGER, 1999; WHO, 1993).

Neste trabalho, utilizaram-se biomarcadores de efeito, as alterações branquiais e alterações genotóxicas detectadas pelo Teste do Micronúcleo e biomarcador de exposição por meio do Ensaio Cometa.

Diante disso, a utilização de biomarcadores de contaminação em peixes nas áreas de estudo poderá auxiliar em programas de monitoramento ambiental pelos gestores locais, já que metodologias baseadas em parâmetros biológicos apresentam muitas vantagens, tais como alta sensibilidade, rapidez e baixo custo.

3.3.1 Biomarcadores Histopatológicos

O exame histopatológico é reconhecido cada vez mais como uma ferramenta valiosa para a avaliação do campo de poluentes ambientais em peixes (HEALTH, 1995; THE et al., 1997). Atualmente os biomarcadores histopatológicos vêm sendo utilizados para documentar e quantificar tanto a exposição quanto o efeito dos poluentes (WINKALER et al., 2001; PACHECO; SANTOS, 2002; VEIGA et al., 2002; MELETTI et al., 2003).

As alterações histológicas em órgãos de peixes são biomarcadores de efeito da exposição aos estressores do meio ambiente (HINTON et al., 1992). Essas alterações histológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões nas células, tecidos ou órgãos (HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON et al., 1992).

As alterações teciduais em brânquias de peixes têm sido muito utilizadas em estudos de biomonitoramento de ambientes aquáticos, devido às brânquias serem um órgão chave a exposição de poluentes.

A grande superfície do epitélio respiratório branquial e a alta taxa de perfusão facilitam a entrada de poluentes neste tecido e por estar em contato direto com o meio externo é altamente suscetível às alterações ambientais (HINTON; LAURÉN, 1990; POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Os efeitos dos poluentes sobre a estrutura branquial têm sido muito estudados em peixes expostos a testes em laboratório ou coletados em ambientes naturais poluídos. No Maranhão vários estudos validaram alterações branquiais em peixes como excelentes biomarcadores de contaminação aquática (CARVALHO-NETA et al., 2012; PINHEIRO-SOUSA et al., 2013; CANTANHÊDE et al., 2014; PEREIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2014).

3.3.2 Biomarcadores Genotóxicos

Os biomarcadores genotóxicos avaliam os efeitos de poluentes mutagênicos no material genético dos organismos (KENDALL et al., 2001). Esses efeitos induzem alterações estruturais nos cromossomos ou nas sequências de pares de bases (AL-SABTI; METCALFE, 1995), assim como, modificações químicas ou físicas no DNA (AKCHA et al., 2004).

O emprego de parâmetros genotóxicos, principalmente em organismos aquáticos como forma de avaliação da qualidade hídrica, permite avaliar o efeito dos poluentes no meio, bem como alterações de seu potencial tóxico ou genotóxico após interação com o ambiente (JESUS; CARVALHO, 2008).

A avaliação de genotoxicidade em ambientes aquáticos poluídos utilizando peixes como biomonitores, vem sendo amplamente utilizada em monitoramento ambiental. Estes estudos têm demonstrado a sensibilidade desses organismos na detecção de efeitos adversos provocados por contribuições antrópicas diversas (ANDRADE et al., 2004; LEMOS et al., 2007).

Os estudos sobre ensaios de genotoxicidade utilizando peixes indicam que estes podem ser utilizados para o estabelecimento de um modelo adequado de monitoramento de genotoxicidade de ambientes aquáticos e da qualidade das águas devido a sua capacidade de metabolizar xenobióticos e acumular poluentes (CHAUDHARY et al., 2006).

Atualmente o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa têm sido muito utilizados para avaliar danos ao material genético causados por substâncias xenobióticas nos organismos. Essas técnicas apresentam grande sensibilidade, simplicidade e rapidez de resposta em estudos de genotoxicidade.

3.3.2.1 *Teste do Micronúcleo*

O Teste do Micronúcleo inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos (SCHIMID, 1976) tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos e aneugênicos, requerendo proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003).

Micronúcleos são formados a partir da condensação dos cromossomos acêntricos (fragmentos de cromossomos) e/ou cromossomos inteiros que não migraram para os polos dos fusos mitóticos na mitose celular. A formação do micronúcleo completa-se na telófase com o envolvimento do material genético por uma membrana nuclear (FENECH; MORLEY, 1985a, 1985b)

A frequência de micronúcleos vem sendo usada como indicação rápida e sensível tanto de aberrações devido a quebras, como de perdas que levam a anormalidades cromossômicas numéricas (HEDDLE et al., 1991; MATEUCA et al., 2006). O objetivo do teste do micronúcleo é a avaliação do potencial mutagênico que as substâncias têm de causar danos cromossômicos estruturais e/ou numérico em células em estágio de divisão. Esses danos cromossômicos, geralmente estão associados com o aparecimento e/ou progressão de tumores, e com efeitos reprodutivos adversos (RIBEIRO et al., 2003), o que torna importante sua detecção precoce.

3.3.2.2 *Ensaio Cometa*

O Ensaio Cometa (eletroforese em gel de células individuais) é amplamente utilizado para testar agentes genotóxicos de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, indução de danos e reparo no DNA, no biomonitoramento de populações expostas, bem como em aplicações clínicas (WHITE; RASMUSSEN, 1998; HARTMANN et al., 2003).

O Ensaio Cometa é um método de eletroforese em microgel rápido e eficiente quando usada para a detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA em células individuais, usando microscopia (SINGH et al., 1988; FAIRBAIRN, et al., 1995).

Várias são as metodologias empregadas para avaliar a extensão do dano ocasionado ao DNA. Uma das medidas utilizadas nesta avaliação é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão das caudas formadas pelo DNA em migração. Esta análise tanto pode ser feita visualmente como através de programas computacionais especiais. Outros padrões e técnicas de medida de dano também podem ser utilizados (FERRARO et al., 2004).

Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão presentes no DNA, podendo ser quebras de fita simples, duplas, *crosslinks*,

sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis, alterações detectadas na técnica alcalina (SILVA, 2007).

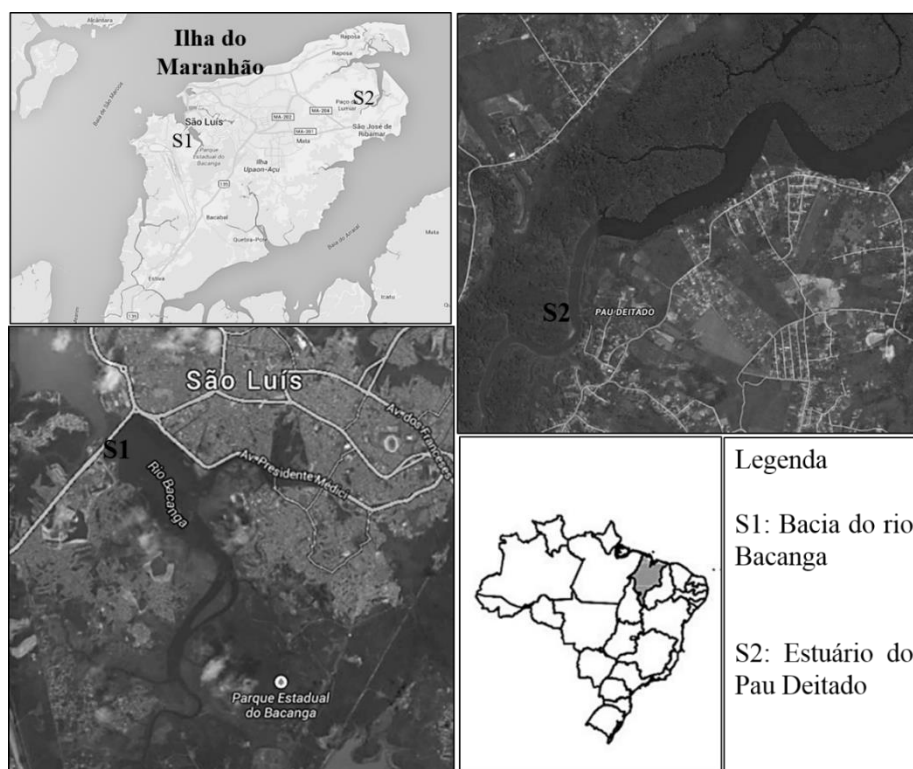
A simplicidade e sensibilidade do Ensaio Cometa fazem dele um sistema adequado de teste para biomonitoramento em níveis crônicos de exposição, podendo ser utilizado em inúmeras análises onde se podem avaliar células viáveis (BELPAEME et al., 1998). Além das vantagens e do relativo baixo custo, o Ensaio Cometa difere de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo, assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas (COLLINS et al., 1997; RIBEIRO et al., 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada em dois estuários da Ilha do Maranhão: a bacia do rio Bacanga (S1) e o estuário do Pau Deitado (S2) (Fig. 1).

Figura 1. Localização das áreas de estudo Bacia do rio Bacanga e estuário do Pau Deitado, Ilha do Maranhão, Brasil.



A bacia do rio Bacanga, localizada na porção noroeste da Ilha, é uma das maiores áreas verdes do Estado do Maranhão e importante pelo conjunto de suas bacias e diversidade ecológica, o que levou o Poder Público a criar o Parque Estadual do Bacanga (MARANHÃO, Decreto Estadual nº7545/1980). A bacia abriga ainda a Área de Proteção ambiental (APA) do Maracanã criada pelo Decreto Estadual nº 12.103/1991(MARANHÃO, 1991).

A intensa urbanização na margem do rio Bacanga tem alterado a dinâmica do local, afetando a biodiversidade e a qualidade do corpo hídrico por meio de lançamentos de esgotos domésticos e lixo.

O estuário do Pau Deitado, localizado na localidade do Pau Deitado, Município de Paço do Lumiar – MA, deságua na baía de Curupu e apresenta uma extensa área de manguezais. Está localizado distante do centro urbano, porém apresenta ocupação em sua margem, como bares e residências.

4.2 Coleta dos peixes

Espécimes de *C. undecilamis*, popularmente conhecidos como robalos (Fig. 2) foram coletados em 2015 no período chuvoso, nos meses de Abril e Maio, e no período seco, nos meses de Setembro a Novembro em ambas as áreas de estudo, bacia do rio Bacanga (2°32'53" S e 44°18'15" W) e no estuário do Pau Deitado (2°31'49" S e 44°5'23" W).

Os exemplares de peixes foram capturados por pesca artesanal com o uso de tarrafa. Em campo foram medidos os comprimentos total (LT) e padrão (LP) dos peixes. No laboratório de Morfofisiologia Animal do Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão, foi determinado o sexo e estágio gonadal (EG) segundo Vazzoler (1996). O EG foi classificado em: I ou imaturo, II ou em maturação, III ou em maturação avançada e IV ou maduro.

Figura 2. Exemplo de peixe do gênero *Centropomus*, coletado na bacia do rio Bacanga, São Luís, Maranhão



4.3 Análise da água

As amostras de água foram coletadas em frascos plásticos e armazenadas em caixa isotérmica com gelo para as análises. Os parâmetros foram comparados com a resolução n° 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2005).

4.3.1 Físico-química

Os parâmetros analisados foram temperatura, pH, oxigênio dissolvido e salinidade, obtidos *in situ* pelo multiparâmetro HANNA com GPS HI 9828.

4.3.2 Metais

Os metais analisados foram: zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe), alumínio (Al), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) detectados através da técnica de espectrometria de absorção atômica, no Laboratório de Solos da Universidade Estadual do Maranhão.

4.4 Análise histopatológica das brânquias

O arco branquial direito dos peixes foi retirado e fixado em formaldeído a 10%. No laboratório de Morfofisiologia Animal do Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão, o segundo arco branquial foi descalcificado em ácido nítrico a 10% por seis horas e em seguida o material foi desidratado em série crescente de álcoois (70%, 80%, 90%), diafanizado em xilol, impregnado e incluso em parafina. Os cortes transversais para a confecção das lâminas foi de 5µm de espessura e as lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (LUNA, 1968) para posterior leitura e análise das lesões branquiais.

As alterações histológicas foram avaliadas semiquantitativamente para cada peixe pelo cálculo do Índice de Alteração Histológica (IAH) baseado na severidade de cada lesão e classificadas em fases progressivas de danos nos tecidos através da fórmula: $IAH = 1 \times \sum I + 10 \times \sum II + 100 \times \sum III$, em que: *I* refere-se às alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; *II* às alterações de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e *III* às alterações de estágio III, muito severas e irreversíveis. O valor do IAH foi dividido em cinco categorias: 0-10 = indica funcionamento normal do órgão; 11-20 = indica alteração leve do órgão; 21-50 = indica alteração moderada do órgão; 51-100 = indica alteração severa no órgão; >100 = indica alteração irreparável no órgão (POLEKSIC; MITROVIC – TUTUNDZIC, 1994).

4.5 Análise genotóxica em eritrócitos

4.5.1 *Teste do Micronúcleo*

O sangue dos peixes foi coletado com o auxílio de seringa do tipo insulina através de punção branquial do arco esquerdo. Em seguida, realizou-se em lâminas o esfregaço sanguíneo. No laboratório, as lâminas secaram por 24 horas e foram coradas com Rosenfield modificado (RANZAINI-PAIVA et al., 2013).

Foram analisadas 2.000 células por peixe em microscópio óptico para a contagem dos micronúcleos e detecção de anormalidades nucleares (AN) segundo Fenech et al. (2003).

4.5.2 Ensaio Cometa

A análise genotóxica foi realizada somente no período chuvoso, a metodologia utilizada do Ensaio Cometa (EC) foi a técnica alcalina descrita por Singh et al. (1988), com algumas adaptações.

No campo, o sangue dos peixes foi coletado por punção branquial com auxílio de seringas tipo insulina (1mL) e o material armazenado em tubo eppendorf com heparina. No laboratório de Patologia Molecular do curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, foi misturado 1µl de sangue com 100µl de soro bovino, da suspensão, 10µl foi misturado com 150µl de agarose *low melting* 0,75%. Deste material, colocou-se 75µl sobre a lâmina de pré-cobertura (agarose normal 1,5%) e as lâminas foram armazenadas na geladeira por um período médio de 30min. Posteriormente as lâminas (sem lamínulas) foram imersas em cubeta de vidro com solução de lise gelada por 24h. A solução de lise é uma solução detergente contendo altas concentrações de sais, que promovem a desintegração das membranas celulares. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão alcalino (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH ~13) gelado e mantidas por 20 min e o material correu na eletroforese (25 V, 300 mA) por 15 min. Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e a desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão TRIS (NH₂.C(CH₂OH)₃) por 15 min para a remoção de sais e detergentes, fixadas por 10min e coradas com nitrato de prata. Da confecção das lâminas até a eletroforese os procedimentos foram realizados no escuro.

Para a avaliação dos danos do DNA, foram analisados aleatoriamente 100 nucleoides por peixe com o uso de microscópio óptico (400x). Os nucleoides foram classificados em classes de 0 a 3, segundo o grau de danos no DNA (KOBAYASHI et al., 1995). Para cada peixe foi calculado o escore de danos: soma do total de células com danos por classe vezes o valor da mesma ($S_1 \times 1 + S_2 \times 2 + S_3 \times 3$).

4.6 Análise Estatística

Os dados de MN entre os períodos sazonais e entre as áreas e os scores das classes de danos no DNA foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, Método de

Dun, com o uso do software BioEstat 2.0. O resultado é considerado positivo se observado diferença significativa de no mínimo $p \leq 0,05$ entre os dados analisados.

5 RESULTADOS

Dos exemplares de robalos amostrados, 23 exemplares foram coletados na barragem da bacia do rio Bacanga, sendo 14 e 9 nos períodos chuvoso e seco respectivamente. No estuário do Pau Deitado, 16 exemplares foram capturados, dos quais 6 no período chuvoso e 10 na estiagem. Dos peixes, o número de machos foi igual ao número de fêmeas em ambas as áreas no período de chuva, enquanto que na estiagem houve um maior número de machos coletados (Tab. 1).

Tabela 1. Médias dos dados biométricos entre machos e fêmeas de *Centropomus undecimalis* coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área.

| cm | S1 | | | | S2 | | | |
|----|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Chuvoso | | Seco | | Chuvoso | | Seco | |
| | Machos n=7 | Fêmeas n=7 | Machos n=7 | Fêmeas n=2 | Machos n=3 | Fêmeas n=3 | Machos n=6 | Fêmeas n=4 |
| LT | 15,57 | 15,57 | 21,57 | 22,25 | 23 | 20,33 | 17,25 | 24,37 |
| LP | 12,93 | 12,78 | 17,93 | 18,25 | 18,67 | 16,67 | 14,67 | 20,37 |

n: número de indivíduos; LT: comprimento total; LP: comprimento padrão; S1: Barragem da bacia do rio Bacanga; S2: Estuário do Pau Deitado.

A maioria dos exemplares para ambos os sexos estava no estágio inicial de maturação gonadal no período chuvoso nas duas áreas. Na estiagem, os peixes amostrados da bacia do rio Bacanga, tanto machos quanto fêmeas apresentaram maior frequência de indivíduos no estágio I, já no estuário do Pau Deitado, a maioria dos machos eram imaturos, enquanto que a maioria das fêmeas estavam em maturação gonadal (Tab. 2).

Tabela 2. Frequência dos estágios gonadais entre machos e fêmeas de *Centropomus undecimalis* coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área.

| | Frequência (%) | | | | | | | |
|-------|----------------|---------|-----|----|-----|------|-----|----|
| | | Chuvoso | | | | Seco | | |
| | I | II | III | IV | I | II | III | IV |
| S1 | | | | | | | | |
| Macho | 100 | 0 | 0 | 0 | 57 | 29 | 14 | 0 |
| Fêmea | 100 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| S2 | | | | | | | | |
| Macho | 100 | 0 | 0 | 0 | 83 | 17 | 0 | 0 |
| Fêmea | 75 | 0 | 25 | 0 | 25 | 75 | 0 | 0 |

S1: Barragem da bacia do rio Bacanga; S2: Estuário do Pau Deitado; I: imaturo; II: em maturação; III: maturação avançada; IV: maduro.

5.1 Análise da água

Os resultados das análises físico-químicas das amostras estão apresentados na Tabela 3. Dos parâmetros, a concentração de oxigênio dissolvido em todas as coletas nas duas áreas de estudo foi abaixo do valor estabelecido pela resolução CONAMA 357/2005. Outro parâmetro que estava em desacordo com a resolução foi o pH, mas somente no período chuvoso da Bacia do rio Bacanga.

Tabela 3. Valores dos parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas no período chuvoso e seco de 2015 por área.

| Parâmetro | Chuvoso | | Seco | | Resolução CONAMA 357/2005 |
|----------------------------|---------|------|------|------|------------------------------|
| | S1 | S2 | S1 | S2 | |
| Oxigênio dissolvido (mg/L) | 2,7* | 3,9* | 4,5* | 2,9* | ≥ 5 mg/L |
| pH | 6,44* | 6,85 | 8,39 | 7,8 | 6,5 a 8,5 |
| Temperatura (°C) | 27,9 | 28,2 | 28,2 | 28,4 | < 40 °C |
| Salinidade (ppt) | 32 | 34 | 33,5 | 40,5 | - |

S1: Barragem da bacia do rio Bacanga; S2: Estuário do Pau Deitado; *valores abaixo do permitido pela resolução, água salobra, classe I.

Quanto à análise de metais, dos elementos analisados, na bacia do rio Bacanga o mercúrio e o chumbo estavam com valores acima do permitido pela resolução, tanto na chuva quanto na estiagem. No estuário do Pau Deitado a maioria dos elementos estava em desacordo com a resolução em ambos os períodos (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração dos metais analisados nas amostras de água coletadas nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área.

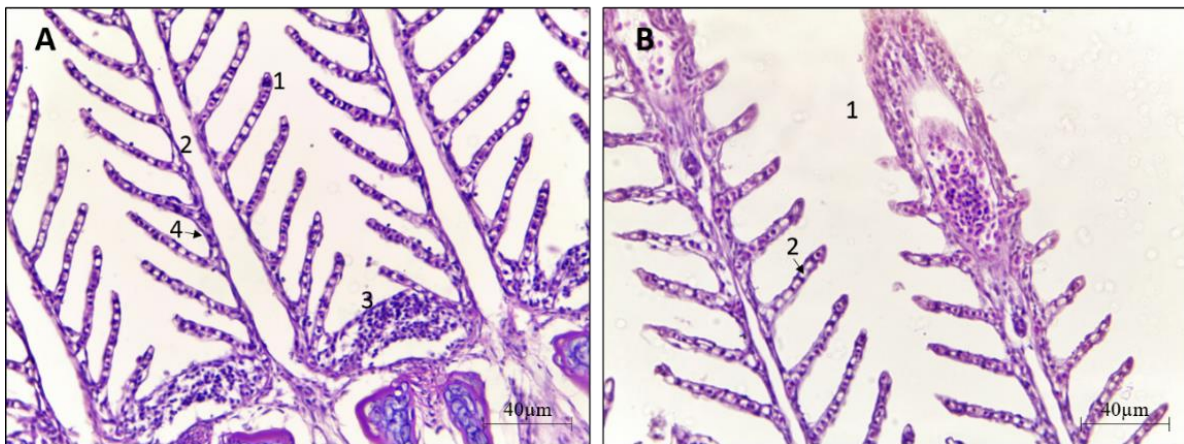
| Resolução CONAMA 357/2005 | Zinco (Zn) mg/L | Cobre (Cu) mg/L | Ferro (Fe) mg/L | Alumínio (Al) mg/L | Cádmio (Cd) mg/L | Mercúrio (Hg) mg/L | Chumbo (Pb) mg/L |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| | 0,09 | 0,005 | 0,3 | 0,1 | 0,005 | 0,0002 | 0,01 |
| | Chuvoso | | | | | | |
| S1 | 0,0091 | nd | 0,1204 | nd | 0,0041 | 0,0632* | 0,9018* |
| S2 | nd | nd | 0,5435* | 0,4639* | 0,0029 | 0,0663* | 1,0281* |
| | Seco | | | | | | |
| S1 | nd | nd | 0,1047 | nd | 0,0021 | 0,0463* | 0,7762* |
| S2 | nd | nd | 0,0480 | 0,3059* | 4,7353* | 0,0094* | 1,0277* |

nd: não detectado; S1: Barragem da bacia do rio Bacanga; S2: Estuário do Pau Deitado; *valores acima do permitido pela resolução, água salobra, classe I.

5.2 Histopatologia das brânquias

A estrutura branquial de *C. undecimalis* possui o mesmo padrão dos peixes teleósteos, cada arco branquial tem uma estrutura cartilaginosa e possui uma fileira dupla de filamentos branquiais que se subdividem em lamelas, onde ocorre o processo de trocas gasosas. Os filamentos branquiais possuem um epitélio estratificado, constituído por diversos tipos de células, como as células de muco e de cloro; já o epitélio de revestimento das lamelas é constituído por uma única camada de células pavimentosas, cuja lâmina basal está apoiada no sistema de células pilares (Fig. 3).

Figura 3. Estrutura branquial normal de *Centropomus undecimalis* coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015. A: 1 – lamela secundária; 2 – seio venoso; 3 – epitélio basal; 4 – epitélio filamentar. B: 1 – ápice do filamento; 2 – sistema de células pilares.



As alterações histológicas encontradas nos exemplares de robalos estudados foram: descolamento do epitélio de revestimento da lamela secundária, hiperplasia das células epiteliais, fusão completa ou incompleta das lamelas, proliferação das células de muco principalmente no ápice do filamento, alterações vasculares como congestão do sistema de células pilares, dilatação do seio venoso e aneurisma (Fig. 4, Tab. 5).

Figura 4. Alterações histológicas em brânquias de *Centropomus undecimalis* coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015. A: 1 – descolamento do epitélio lamelar; 2 – hiperplasia das células epiteliais; 3 – dilatação do seio venoso. B: 1 – hiperplasia das células de muco no ápice do filamento. C: 1 – Congestão vascular lamelar. D: 1 – fusão completa de todas as lamelas.

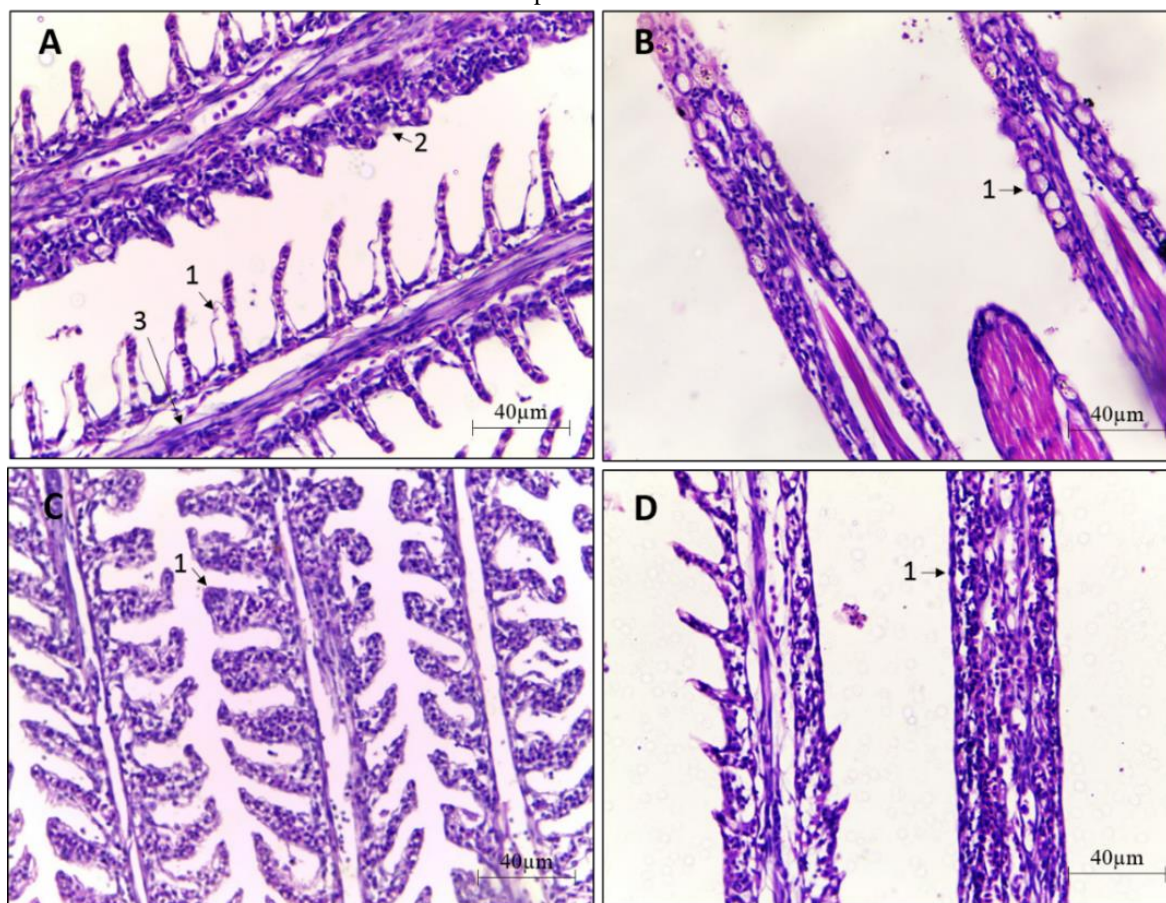


Tabela 5. Classificação das alterações histológicas branquiais de *Centropomus undecimalis* coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área.

| Estágio | Alterações | Frequência (%) | | | |
|-------------------|---|--|---------|---------|----------|
| | | Chuvoso | | Seco | |
| | | S1(n=14) | S2(n=6) | S1(n=9) | S2(n=10) |
| I | Congestão vascular | 100 | 100 | 77,78 | 100 |
| | Deslocamento do epitélio das lamelas secundárias | 92,86 | 83,3 | 33,3 | 20 |
| | Desorganização das lamelas secundárias | 35,71 | 16,67 | 0 | 0 |
| | Hiperplasia ou hipertrofia das células epiteliais | 100 | 100 | 100 | 80 |
| | Fusão incompleta de várias lamelas secundárias | 14,29 | 0 | 0 | 0 |
| | Fusão completa de várias lamelas secundárias | 100 | 100 | 88,89 | 70 |
| | Dilatação do seio venoso | 85,71 | 66,67 | 88,89 | 100 |
| | Presença de parasito | 35,71 | 16,67 | 11,1 | 10 |
| | Hiperplasia ou hipertrofia das células de muco | 42,86 | 83,3 | 44,4 | 70 |
| | II | Rompimento do sistema de células pilares | 92,86 | 66,67 | 88,89 |
| Aneurisma lamelar | | 21,43 | 33,3 | 22,2 | 40 |

S1: Barragem da bacia do rio Bacanga; S2: Estuário do Pau Deitado; n: número de indivíduos.

Das alterações de estágio I, na bacia do rio Bacanga todos os peixes apresentaram hiperplasia das células epiteliais em ambos os períodos sazonais, enquanto que no estuário do Pau Deitado, a lesão comum foi congestão vascular das lamelas. Quanto às alterações de estágio II, o rompimento do sistema de células pilares foi mais frequente na barragem da bacia do rio Bacanga e no estuário do Pau Deitado, a hiperplasia das células de muco predominou.

Na avaliação da frequência da intensidade das alterações branquiais a média dos valores do Índice de Alteração Histológica por área está representada na Tabela 6, indicando lesões moderadas nas brânquias dos peixes amostrados.

| Tabela 6. Médias do IAH nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área. | | |
|---|---------|-------|
| | IAH | |
| | Chuvoso | Seco |
| S1 | 21,36 | 19,11 |
| S2 | 23,17 | 21,5 |

IAH: Índice de Alteração Histológica; S1: Barragem da bacia do rio Bacanga; S2: Estuário do Pau Deitado.

Quanto às categorias, a maioria dos peixes em ambas as áreas apresentaram alterações leves a moderadas (Tab. 7).

| Tabela 7. Frequência da intensidade das alterações em brânquias de <i>Centropomus undecimalis</i> coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área. | | | | |
|---|----------------|---------|---------|----------|
| Categorias do IAH | Frequência (%) | | | |
| | Chuvoso | | Seco | |
| | S1(n=14) | S2(n=6) | S1(n=9) | S2(n=10) |
| Sem alterações | 0 | 0 | 11,1 | 0 |
| Alterações leves | 42,9 | 50 | 44,4 | 50 |
| Alterações moderadas | 57,1 | 50 | 44,4 | 50 |
| Alterações Severas | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Alterações Irreversíveis | 0 | 0 | 0 | 0 |

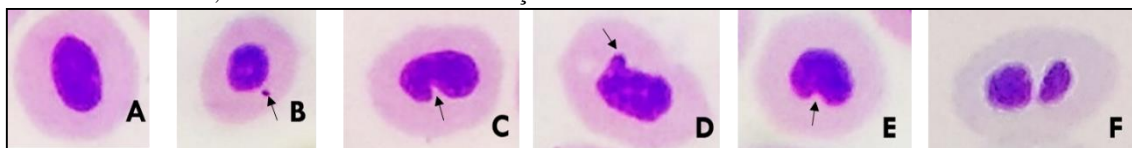
n: número de indivíduos; S1: Barragem da bacia do rio Bacanga; S2: Estuário do Pau Deitado; IAH: Índice de Alteração Histológica.

5.3 Análises genotóxicas

5.3.1 Teste do Micronúcleo

Nos esfregaços sanguíneos dos exemplares de *C. undecimalis* observou-se micronúcleo (MN) e alterações nucleares (AN) dos tipos: Notched, Lobed, Blebbed e célula binucleada (Fig. 5).

Figura 5. Teste do Micronúcleo em eritrócitos de *Centropomus undecimalis* coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015. A. Eritrócito normal; B. Micronúcleo – seta; C. Notched – seta; D. Lobed – seta; E. Blebbed – seta; F. Célula binucleada. Coloração Rosenfield modificada. Aumento 1000x



Na Tabela 8 constam as médias da frequência de MN e de AN observados nos eritrócitos dos peixes amostrados. Os valores para o MN apresentaram diferenças significativas entre as duas localidades no período chuvoso, mostrando que a bacia do rio Bacanga é mais impactada. Na comparação da frequência de MN por período sazonal por área, a bacia do rio Bacanga apresentou diferença significativa nos resultados, sendo os maiores danos encontrados na chuva. Em relação às AN, na bacia do rio Bacanga a maior frequência nos peixes amostrados foi durante as chuvas, enquanto que no estuário do Pau Deitado foi na estiagem.

Tabela 8. Médias das frequências de Micronúcleos e Alterações Nucleares em eritrócitos de *Centropomus undecimalis* coletados nos períodos chuvoso e seco de 2015 por área.

| | Chuvoso | |
|-----------|--------------------------|------------|
| | MN/DP | AN/DP |
| S1 (n=14) | 3,43 ^{ac} ±1,87 | 14,64±8,02 |
| S2 (n=6) | 0,66 ^b ±0,82 | 4,16±5,49 |
| | | Seco |
| S1 (n=9) | 1,56 ^d ± 1,33 | 7,11± 7,13 |
| S2 (n=10) | 0,7± 1,06 | 7± 8,27 |

n: número de indivíduos; MN: micronúcleo, AN: alterações nucleares; DP: desvio padrão; S1: Barragem da bacia do rio Bacanga; S2: Estuário do Pau Deitado; ^{abcd} $p < 0,05$.

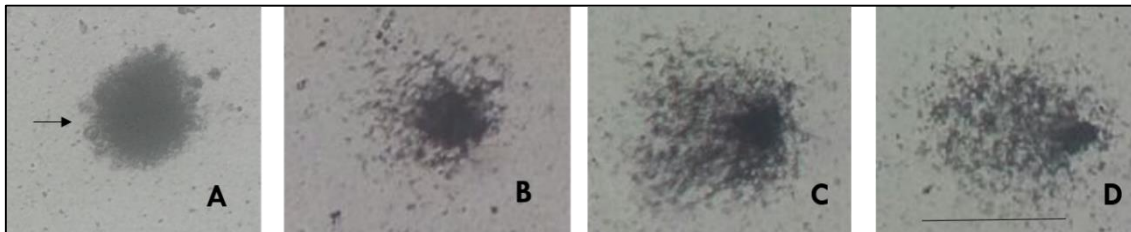
^{ab} – comparação entre as duas áreas no período chuvoso.

^{cd} – comparação entre os períodos sazonais na bacia do rio Bacanga.

5.3.2 Ensaio Cometa

A Figura 6 mostra os níveis de lesões analisados no DNA fragmentado dos eritrócitos dos exemplares de robalo.

Figura 6. Níveis de danos do DNA no Ensaio Cometa em eritrócitos de *Centropomus undecimalis*. A: Classe 0 (DNA intacto, nucleóide – seta); B: Classe 1 (DNA com baixo nível de danos); C: Classe 2 (DNA com nível médio de danos); D: Classe 3 (DNA com nível alto de danos, cauda do cometa ___). Coloração com prata. Aumento 400x



Os valores médios dos escores de danos no DNA apresentaram diferenças significativas em que os maiores danos foram encontrados nos exemplares da bacia do rio Bacanga (Tab. 9).

Tabela 9. Média das classes e dos escores de danos no DNA de eritrócitos de *Centropomus undecimalis*.

| Área | Amostras (n) | Classes de danos | | | | T | Score |
|------|--------------|------------------|-------|-------|-------|------------|---------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| S1 | 14 | 4,71 | 10,93 | 20,29 | 63,36 | 94,57±4,73 | 241,57±42,9* |
| S2 | 6 | 6,67 | 24 | 37,83 | 31,5 | 93,3±10,17 | 194,16±40,38* |
| S3 | 6 | 3,67 | 18,5 | 26,67 | 51,17 | 96,33±3,01 | 225,33±28,7* |

T: soma de células com danos; S1: área contaminada; S2: área controle; * $p < 0.05$.

6 DISCUSSÃO

A proporção sexual varia ao longo do ciclo de vida em função de eventos que atuam de modo distinto sobre os indivíduos de cada sexo (VAZZOLER, 1996). Os robalos são organismos hermafroditas protândricos (TAYLOR et al., 2000), assim espera-se encontrar uma proporção maior de indivíduos machos nos tamanhos menores, a proporção de fêmeas aumenta nos tamanhos maiores. Por isso, a maioria dos robalos amostrados foi machos em ambas as áreas. A proporção de machos maior que a de fêmeas numa população de jovens é estratégia reprodutiva de hermafroditas protândricos (TAYLOR et al., 2000; PERERA-GARCÍA et al., 2011).

Em relação ao uso dos biomarcadores, as lesões histológicas em brânquias são muito utilizadas em estudos de avaliação da qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos, tanto em ambientes naturais (NOGUEIRA et al., 2008; FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011; NOGUEIRA et al., 2011; SANTOS-FILHO et al., 2014) quanto em ensaios toxicológicos (BRESEGHELO et al., 2004). Esses biomarcadores vêm sendo utilizados em peixes no Maranhão para avaliar a qualidade da água de ambientes naturais e de

pisciculturas (CARVALHO-NETA et al., 2012; PINHEIRO-SOUSA et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2014).

Cantanhêde et al., (2014), foram os primeiros autores a aplicar esses biomarcadores em espécies de *C. undecimalis* ao avaliar a poluição de um ambiente estuarino em São Luís – MA, considerado área de proteção ambiental.

Já o teste do Micronúcleo é bastante empregado em biomonitoramento ecotoxicológico principalmente, por detectar alterações em células após a divisão. O mecanismo de formação dos micronúcleos depende da ocorrência da divisão celular após a exposição ao agente genotóxico. O tempo necessário para a ocorrência da divisão celular é dependente do tipo de tecido, da espécie que está sendo utilizada e das condições ambientais (AL-SABTI; METCALFE, 1995). O presente trabalho é o primeiro a utilizar o teste em peixes de *Centropomus* no litoral maranhense.

Kirschbaum et al. (2009) avaliando a citogenotoxicidade de dois estuários em São Paulo associou as alterações nucleares encontradas em *Centropomus parallelus* à exposição de contaminantes.

Outro resultado semelhante foi de Souza et al. (2013), em que analisaram dois estuários no Espírito Santo afetados por ações antropogênicas utilizando também *C. parallelus*. Os pesquisadores relataram os níveis de metais da água e sedimento e sua influência sobre biomarcadores genético, bioquímico e morfológico.

Em relação à técnica do Ensaio Cometa, esta é uma metodologia adequada para o monitoramento da genotoxicidade de ambiente aquático. Dentre as inúmeras aplicações do ensaio do cometa, a eficiência da técnica para a detecção do potencial genotóxico de contaminantes aquáticos tem sido descrita por muitos autores (BÜCKER et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2007; SCALON et al., 2010).

Di Paolo (2006) aplicou o Ensaio Cometa em eritrócitos de *Centropomus parallelus* para avaliar o potencial genotóxico da β -naftoflavona, o teste mostrou maiores danos nos grupos expostos in vitro à substância comparada ao grupo controle.

Os resultados para os biomarcadores aqui obtidos demonstram que as espécies de *C. undecimalis* podem ser utilizadas com sucesso como organismos sentinelas. Muitos peixes do gênero *Centropomus* são carnívoros, os peixes carnívoros podem acumular metais em seus tecidos, visto que, os maiores teores de metais são encontrados em peixes que estão no topo da cadeia trófica (CUI et al., 2011; KEHRIG et al., 2009).

Organismos pertencentes ao topo da cadeia alimentar são comumente utilizados na avaliação da contaminação ambiental por metais por possuírem intrínseca relação com toda

a cadeia inferior, indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes no nível de cadeia, além de efeitos diretos no nível do indivíduo (DÓREA et al., 2004; DURRIEU et al., 2005; KEHRING et al., 2009; CUI et al., 2011).

Através dos resultados, pôde-se perceber que os biomarcadores analisados são boas ferramentas na avaliação da qualidade ambiental das áreas estudadas. Quanto aos parâmetros físico-químicos, a baixa concentração de oxigênio dissolvido em ambas as áreas pode estar relacionada ao aumento da quantidade de matéria orgânica no local, pois propicia a multiplicação de micro-organismos no local, aumentando o consumo de oxigênio.

O oxigênio dissolvido é um dos parâmetros mais significativos para expressar a qualidade da água de um ambiente aquático (BRASIL, 2006), sendo considerado um elemento vital à vida dos peixes, insetos, plâncton, bactérias e plantas aquáticas (OSTRENSKY; BOEGER, 1998; MASSER et al., 1993). A solubilidade do oxigênio na água depende de distintos fatores ambientais como a temperatura, pressão atmosférica e salinidade (SIPAÚBA-TAVARES, 1994) e, a necessidade de oxigênio varia de acordo com a espécie e seu estágio de vida (OSTRENSKY; BOEGER, 1998).

Em relação às análises de metais da água, essas mostraram que ambas as áreas apresentaram mercúrio e chumbo nos dois períodos sazonais, estes com valores acima do permitido pela resolução CONAMA 357/2005. Esses resultados da água registram o impacto antrópico existente nas áreas de estudo, que são continuamente alvo do lançamento de efluentes domésticos e lixo, principalmente a bacia do rio Bacanga por estar circundada de bairros periféricos.

Os metais possuem características atômicas peculiares, dando-lhes elevada resistência à degradação química, física e biológica no sistema aquático. Isto os leva a persistirem no ambiente aquático por vários anos, mesmo depois da proibição de sua utilização ou despejo nos cursos d'água (MORAES; JORDÃO, 2002; IKEM et al., 2003).

Ao persistir no sistema aquático, o metal tem sua concentração gradualmente aumentada, o que facilita sua maior concentração na água e absorção pelos organismos (RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; ARAI et al., 2007). Como muitos metais nas áreas de estudo apresentaram concentrações acima das previstas nas normas vigentes, os organismos desses locais podem responder à exposição dessas substâncias.

Dos metais, arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), níquel (Ni), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), são os principais elementos nos estudos de contaminação em peixes (LIMA JR. et al., 2002; CANLI; ATLI, 2003;

IKEM et al., 2003; COSTA; HARTZ, 2009; PEREIRA et al., 2010; CUI et al., 2011; GOMES; SATO, 2011; MUTO et al., 2011; YI et al., 2011; YI; ZANG, 2012).

O mercúrio, encontrado em todas as amostras de água com valores acima do permitido pela resolução, pode contaminar a água e o sedimento (HYLANDER et al., 2000), organismos bentônicos e peixes (YOKOO et al., 2001; WEECH et al., 2004). Alterações e interações, químicas e biológicas no ambiente aquático podem determinar a ionização do mercúrio e viabilizar a formação de metilmercúrio (HYLANDER et al., 2000; RAVICHANDRAN, 2004). O metilmercúrio, além de ser biotóxico, tem elevado potencial de bioacumulação nos tecidos (SOUZA LIMA et al., 2000); e biomagnificação nos organismos através das cadeias alimentares (WEECH et al., 2004), além de ser preocupante no âmbito da saúde pública.

O mercúrio é um elemento comprovadamente cancerígeno (BANERJEE; BHATTACHARYA, 1995), mutagênico e teratogênico (PORTO et al., 2004). Nos peixes, níveis elevados induzem à morte.

O chumbo, também encontrado em altas concentrações, não apresenta efeitos benéficos ou nutricionais para os organismos, sendo extremamente tóxico (BILANDZIC et al., 2011; ERSOY; CELIK, 2010). Em altas concentrações nos peixes o chumbo causa déficits comportamentais, além de redução do crescimento, desenvolvimento, mudanças no metabolismo e aumento na formação de muco (CESTARI et al., 2004; FERRARO et al., 2004; MARTINEZ et al., 2004; SCHMITT et al., 2007).

Os organismos aquáticos por acumularem os contaminantes do ambiente, têm sido utilizados em larga escala em estudos de segurança alimentar (TÜRKMEN et al., 2009). Estes organismos são capazes de concentrar metais pesados em níveis superiores aos encontrados na água, sendo assim, responsáveis por grande parte da dinâmica destes poluentes no ambiente marinho (SMITH, GUENTZEL, 2010).

Os dados gerados nesta pesquisa servem de alerta à saúde pública, pois em todas as áreas de estudo os peixes do gênero *Centropomus* são comercializados. Os robalos são muito usados no cultivo comercial, pois se adaptam ao cativeiro e alimentação à base de ração (CERQUEIRA; MACCHIAVELLO, 1994; BORBA; CERQUEIRA, 1998).

Sendo os robalos carnívoros, podem afetar a saúde do homem através do seu consumo, já que são passíveis de acumularem metais (YOKOO et al., 2001; MERGLER, 2002). Como a mais importante via de exposição dos seres humanos aos metais pesados é ingestão de peixes contaminados (LEBEL et al., 1997; TAO et al., 2012), os danos encontrados no robalos são preocupantes no âmbito da saúde pública.

A detecção de danos à saúde e ao meio ambiente avaliada pelos efeitos genotóxicos em potencial são considerados pré-requisitos para o desenvolvimento de diversas doenças, por exemplo, o câncer (RIBEIRO et al., 2003). Diversos metais têm demonstrado possuir atividade carcinogênica mediante sua ingestão em quantidades excedentes ao permitido, neste caso o cromo, chumbo e mercúrio são os principais (CLARKSON, 1990, 1997; ROWAN et al., 1995).

No caso dos peixes, a intoxicação por metais provoca uma série de distúrbios, tais como: baixa fertilidade, diminuição das defesas imunológicas, redução da taxa de crescimento e patologias que podem levar à morte do indivíduo (MENESES, 2008; QUEIROZ, 2006). As respostas biológicas dos peixes à exposição de algum contaminante podem ser avaliadas através de alterações histológicas e genotóxicas, utilizadas nesta pesquisa.

Nas brânquias dos peixes, lesões histológicas foram encontradas em ambas as áreas. Essas alterações podem estar associadas à exposição de contaminantes, pois os metais que estão suspensos e dissolvidos na água podem ser absorvidos pelos peixes por meio de difusão pelas brânquias que é um potencial local de absorção dos elementos metálicos (MIRANDA, 2006; MUTO et al., 2011; KEHRING et al., 2011).

A exposição a estressores ambientais podem alterar a morfologia normal das brânquias, causando lesões que podem implicar nas funções do órgão, visto que as células do epitélio branquial respondem direta ou indiretamente aos fatores ambientais e a alterações internas do organismo (LUPI et. al, 2007).

Para a análise histológica, a pesquisa utilizou as alterações branquiais devido ao epitélio respiratório branquial estar em contato direto com o meio externo, possuir uma grande área de superfície e ser altamente muito sensível às alterações ambientais.

No presente estudo, a hiperplasia das células epiteliais, encontrada em praticamente todos os indivíduos de ambas as áreas, é caracterizada pelo aumento das funções das células e tecido, provocado pela alteração das atividades fisiológicas destes (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). O aumento das células do epitélio filamentar e lamelar pode causar fusão completa de várias lamelas. A fusão das lamelas respiratórias diminui o fluxo de água no tecido podendo dificultar as trocas gasosas do órgão.

A maioria das brânquias dos peixes apresentou o deslocamento do epitélio respiratório no período chuvoso, lesão de estágio I. O levantamento do epitélio lamelar é considerado como o primeiro sinal de patologia branquial e caracteriza-se pela elevação de uma lâmina contínua do epitélio de revestimento das lamelas para longe do sistema de

células pilares, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue (THOPHON et al., 2003).

Com a elevação epitelial do tecido branquial, o peixe aumenta a sua taxa de respiração, compensando a entrada baixa de oxigênio (FERNANDES; MAZON, 2003). De acordo com Winkaler et al. (2001), estes tipos de lesões histológicas indicam que o peixe está respondendo aos efeitos de agentes tóxicos presentes na água e no sedimento.

O levantamento do epitélio lamelar e a proliferação do epitélio filamentar e lamelar, observados nas brânquias de *Centropomus*., são alterações histológicas que funcionam como mecanismos de defesa, pois diminuem a área de superfície das brânquias e aumentam a barreira de difusão ao poluente (ERKMEN; KOLANKAYA, 2000); no entanto, prejudica o processo de trocas gasosas do órgão.

As alterações de estágio I são consideradas lesões leves, pois permitem a recuperação da estrutura e da função dos tecidos branquiais em caso de melhoria das condições ambientais. Mas tais alterações pode progredir para o segundo estágio sob condições ambientais inalteradas e exposição dos peixes em longo prazo a poluentes e contaminantes (POLEKSIC; MITROVIC – TUTUNDZIC, 1994).

As alterações de estágio II são mais severas e comprometem a função da brânquia; em caso da melhoria da qualidade da água, essas lesões podem ser reparáveis, mas, se o nível de poluição aumentar, pode progredir para o terceiro estágio.

O aneurisma, alteração de estágio II encontrada nos exemplares dos peixes analisados principalmente do estuário do Pau Deitado, geralmente resulta do colapso do sistema de células pilares, que prejudica a integridade vascular com a liberação de grande quantidade de sangue, empurrando o epitélio lamelar para fora (HINTON; LAURÉN, 1990), o que pode causar a ruptura do epitélio e conseqüentemente hemorragia.

Stentiford et al. (2003) observaram aumento da frequência de aneurismas em exemplares de peixes capturados em áreas contaminadas. Os autores observaram que estas lesões podem ser associadas com a presença de substâncias tóxicas.

Os exemplares de peixes analisados na pesquisa também apresentaram proliferação das células de muco entre as lamelas secundárias. A proliferação e hipersecreção das células mucosas nas brânquias em situações de estresse podem ser compreendidas como um mecanismo de defesa em função de uma resposta defensiva crônica, entretanto, podem comprometer a função branquial dependendo da severidade do processo (LEONARDO et al., 2001; FRACÁCIO et al., 2003).

A secreção de muco por estas células podem ser estimuladas por metais como cádmio, chumbo, zinco e cobre (MELETTI et al., 2003). O chumbo foi detectado em alta concentração nas amostras de água de ambas as áreas, o que pode ter induzido a proliferação das células de muco nas brânquias dos exemplares estudados.

De acordo com o Índice de Alteração Histológica, os peixes de ambas as áreas apresentaram lesões leves a moderadas, sendo os maiores valores do índice do período chuvoso. No entanto, se persistirem no ambiente, estas lesões podem progredir para lesões severas comprometendo a saúde dos peixes. Os tipos de lesões observadas neste estudo indicam ainda que os peixes estão respondendo aos efeitos de agentes tóxicos presentes na água.

Nos eritrócitos dos robalos, lesões no material genético também foram detectadas, essas alterações indicam que os peixes estão expostos a substâncias tóxicas ou genotóxicas no meio (JESUS; CARVALHO, 2008).

Na análise do Teste do Micronúcleo, os exemplares de peixes da bacia do rio Bacanga apresentaram nos eritrócitos uma maior frequência de micronúcleo no período chuvoso e danos no DNA, resultados significativos, as anormalidades nucleares também foram mais frequentes neste período. Os resultados também foram significativos quando comparados a frequência de micronúcleo por área no período chuvoso.

Quanto ao Ensaio Cometa, os danos no DNA dos robalos mostraram que a bacia do rio Bacanga foi a área mais impactada, conforme a análise estatística. Na bacia do rio Bacanga, a maioria dos peixes apresentaram ainda danos de classe III, DNA com níveis mais alto de danos. Esses resultados podem estar associados à exposição de substâncias tóxicas presentes na água.

Os metais em alta concentração tornam-se tóxico aos organismos. Eles atuam em ciclos redox, produzindo espécies reativas de oxigênio (STOHS; BAGCHI, 1995), o estresse oxidativo afeta diversas rotas metabólicas, incluindo aquelas envolvidas no reparo de danos no DNA, conhecidas como efeitos genotóxicos (PRÁ et al., 2006).

Em estudo de toxicidade, Oliveira et al (2014) avaliaram a toxicidade aguda do cobre (Cu) em juvenis de robalos *C. parallelus*, os resultados da pesquisa mostraram que as concentrações subletais de Cu induziram a danos no DNA dos peixes, detectados pelo Ensaio Cometa.

Os resultados para os biomarcadores foram mais frequentes durante as chuvas. Isso pode ser explicado pelo elevado fluxo de água devido a pluviosidade, pois ocasiona a maior diluição dos rejeitos, proporcionando maiores taxas de biodisponibilidade dos metais na

coluna d'água no período das chuvas (BAMBIC et al., 2006; SILVA et al., 2009; PIZARRO et al., 2010).

Mesmo com detecção de metais pesados na água do estuário do Pau Deitado em ambos os períodos sazonais, os peixes desta área apresentaram menos danos genotóxicos. Nesse sentido, é importante observar que apesar da contaminação por metal, este ponto está longe dos centros urbanos apresenta vegetação bem preservada. Sabe-se que os manguezais são ricos em matéria orgânica e sedimentos, e que fatores como material particulado e a presença de grande quantidade de matéria orgânica equilibram a concentração de metais no meio (OBASOHAN, 2008; KPEE ET AL., 2009).

7 CONCLUSÃO

Dos biomarcadores analisados, tanto os genotóxicos quanto o histológico mostraram-se como boas ferramentas na avaliação da qualidade ambiental dos ecossistemas estuarinos utilizando a espécie *Centropomus undecimalis*.

As informações geradas sobre os biomarcadores utilizados na espécie serve como subsídios para elaboração e/ou aplicação de modelos de avaliação da saúde e implementação de políticas de recuperação ambiental de ambientes aquáticos costeiros. Além de poder avaliar a saúde das populações de peixes comerciais.

REFERÊNCIAS

ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **Americas Fishers Society**, v. 3, p. 104-112, 2002.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo**. Guaíba: AGROPECUÁRIA, 1998.

MASSER, M. P.; CICHRA, E.; GILBERT, R. J. Fee-fishing ponds: management of foodfish and water quality. **Southern Regional Aquaculture Center**, v. 480, p. 1-8, 1993.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. São Paulo: FUNEP, 1994.

AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C. G.; STJEAN, S.; COUTERNAY, S. C. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Atyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water-soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.

AKCHA, F.; LEDAY, G.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. **Mutation Research**, v. 552, p. 197-207, 2004.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135, 1995.

ALVAREZ-LAJONCHERE, L.; BÁEZ HIDALGO, M.; GOTERA, G. Estudio de la biología pesquera del robalo de ley, *Centropomus undecimalis* (Bloch) (Pisces, Centropomidae) en Tunas de Zaza, Cuba. **Revista Investigaciones Marinas**, v.3, p.159-200, 1982.

ANDRADE, V. M., SILVA, J., SILVA, F. R., HEUSER, V. D., DIAS, J. F., YONEAMA, M. L. & FREITAS, T. R., Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p. 459-68, 2004.

ARAÚJO, A. M.; MINEIRO, A. L. B.; CANTALICE, J. R. B. Estimativa do potencial de sedimentação e erosão: caso Manguezal do Pina, Recife (PE). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 133-140, 2011.

BARRETT, J. C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D.; GOLDSTEIN, B. D. Twelfth Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. **Environmental Health Perspective**, v.105, n. 4, p. 699-737, 1997.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, n. 415, p. 167- 184, 1998.

CANTANHÊDE. S. M; MEDEIROS. A. M.; FERREIRA. F. S.; FERREIRA. J. R. C.; ALVES. L. M. C.; CUTRIM. M. V. J.; SANTOS. D. M. S.; Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís – MA. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 593-601, 2014.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; TORRES-JR, A. R.; ABREU-SILVA, A. L. Biomarkers in Catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, p. 1314–1327, 2012.

CHAUDHARY, R.; PANDEY, S.; KUSHWAHA, B.; GAUR, K.; NAGPURE, N. Fish micronucleus assay: a sensitive tool for ecogenotoxicity studies. **Journal of Ecophysiology and Occupational Health**, v. 6, p. 143-147, 2006.

COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**. v. 375. p. 183-193, 1997.

DEPLEDGE, M. H. Genotype toxicity implications for individuals and populations. **Environmental Health Perspective**, v. 102, p. 101-104, 1994.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29-36, 1985b.

FENECH, M.; MORLEY A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**, n. 43, p. 233- 246, 1985a.

FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of trybutyltin 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**, v. 27, p.103-107, 2004.

GILMORE, R.G.; DONOHOE, J.; COOKE, D.W. Observations on the distribution and biology of east-central Florida populations of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Florida Science**, v. 46, n. 3/4, p. 313-336, 1983.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

RANZANI-PAIVA, M. J. T; PÁDUA, S. B; TAVARES-DIAS M; EGAMI, M.I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: EdUEM; 2013. 135 p.

HEALTH, A. C. **Water Pollution and Fish Physiology**. Boca Raton: LEWIS PUBLISHERS, 1995.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. P.; VAPARYS, P. H.; MACGREGOR, J. I. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, p. 277-291, 1991.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. (Eds.). **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: LEWIS PUBLISHERS, 1992. p. 155-196.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: S. M. ADAMS (Ed.) **Biological Indicators of Stress in Fish**. Bethesda, Maryland: AMERICAN FISHERIES SOCIETY SYMPOSIUM, 1990. p. 51-66.

JESUS, T. B de; CARVALHO, C. E. V de. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

JOHNSON, R. K.; WIEDERHOLM, T.; ROSENBERG, D. M. Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. (Eds.) **Freshwater**

Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates. New York: CHAPMAN & HALL,1993.

KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COBB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T.; HOOPER, M. J.; MARTIN, C. F.; McMURRY, S. T.; PATINO, R.; SMITH, E. E.; THEODORAKIS, C. W. Environmental Ecotoxicology. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons.** 6th ed. New York: MCGRAW-HILL, 2001. p. 236.

LEMONS, C. T.; RODEL, P. M.; TERRA, N. T.; OLIVEIRA, N. C. D.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 391-401, 2007.

MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P. V., DECORDER, I. & KIRSCH VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Facets of environmental nuclear toxicology**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

MATTHEWS, R. A.; BUIKEMA, A. L.; CAIRNS, J. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships and indices. **Water Research**, v. 16, p. 129-139, 1982.

MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. (Eds.). **Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi – Guaçú.** São Paulo: SÃO CARLOS, 2003. p. 149-180.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade das zonas costeiras e marinhas.** Brasília: FUNDAÇÃO BIO RIO, SECTAM, IDEMA, SNE, 2002a. 72 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Biodiversidade Brasileira**: avaliação e identificação de áreas prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. Série Biodiversidade, n. 5. Brasília: MMA, 2002b. 404 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil**. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Gerência de Biodiversidade Aquática e Recursos Pesqueiros. Brasília: MMA, SBF, GBA, 2010. 148 p.

MUHLIA-MELO, A.; ARVIZU-MARTÍNEZ, J.; RODRÍGUEZ-ROMERO, J.; GUERRERO-TORTOLERO, D.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, F. J.; MUHLIA-ALMAZÁN, A. **Sinopsis de información biológica, pesquera y acuacultural a cerca de los robalos del género *Centropomus* en México**. Programa de Evaluación de Recursos Naturales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C. Volumen Especial. S. C. La Paz: CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NORESTE, 1995. 52 p.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 3, p. 331-347, 2002.

PEREIRA, D. P.; SANTOS, D. M. S.; CARVALHO NETA, A. V.; CRUZ, C. F.; CARVALHO NETA, R. N. F. Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na Laguna da Jansen, São Luís, MA (Brasil). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, p. 1213-1221, 2014.

PINHEIRO-SOUSA, D. B.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes), to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 305-312, 2013.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fishi gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. (Eds.). **Sblethal and**

chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: FISHING NEWS BOOKS, 1994. p. 339-352.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.** Canoas – RS: ULBRA, 2003. 356p.

RUDIGER, H. W. Biomonitoring in occupational medicine. In: MARQUART, H.; SCHAFFER S. G; McCLELLAN R.; WELSCH F. (Eds.). **Toxicology.** San Diego: ACADEMIC PRESS, 1999. p. 1027-1039.

SANTOS, C. H. dos A. dos; LOURENÇO, J. A.; BRAGA NETO, F. H. F.; COSTA, O. R.; IGARASHI, M. A. Características dos ecossistemas estuarinos brasileiros e as atividades antrópicas. In: IV Semana do Meio Ambiente da UFC. **Anais.** Fortaleza: UFC, 2006, v. Único. p. 71-85.

SANTOS, D. M. S.; MELO, M. R. S.; MENDES, D. C. S.; ROCHA, I. K. B. S.; SILVA, J. P. L.; CANTANHÊDE, M. C.; MELETTI, P. C. Histological Changes in Gills of Two Fish Species as Indicators of Water Quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 12927-12937, 2014.

SCHIMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLAENDER, A. (Ed.) **Principles and Methods for their detection.** Vol. 4. New York: PLENUM PRESS, 1976. p. 31-53.

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**, v. 2, n. 2, p. 30-33, 2007.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: ALCANCE, 2003. 424p.

SINGH, N. P.; McCOY. M. T.; TICE, R. R.; CCHEEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 1, n. 175, p. 184-191, 1988.

THE, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 51-70, 1997.

VEIGA, M. L.; RODRIGUES, E. L.; PACHECO, F. J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 171-175, 2002.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, n. 410, p. 223-236, 1998.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.

WINZER, K.; WINSTON, G. W.; BECKER, W. et al. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 7 p. 143-145, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace**. Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993.

ARAI, T.; OHJI, M.; HIRATA, T. Trace metal deposition in teleost fish otolith as an environmental indicator. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 179, p. 255–263, 2007.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135, 1995.

BAMBIC, D. G.; ALPERS, C. N.; GREEN, P. G.; FANELLI, E.; SILK, W. K. Seasonal and spatial patterns of metals at a restored copper mine site. I. Stream copper and zinc. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 774-782, 2006.

BANERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Histopathological changes induced by chronic nonlethal of elsan, mercury, and ammonia in the small intestine of *Channa punctatus* (Bloch). **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v.31, p.62-68, 1995.

BILANDZIC, N.; DOKIC, M.; SEDA, M. Metal content determination in four fish species from the Adriatic Sea. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1005-1010, 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Brasília: DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2005.

BRESEGHELO, L.; CARDOSO, M. P.; BORGES-DE-OLIVEIRA, R.; COSTA, M. F.; BARRETO, J. C. B.; SABOIA-MORAIS, S. M. T. S.; YAMADA, A. T. Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe guaru (*Poecilia vivipara*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p. 274-280, 2004.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 465-473, 2003.

CANLI, M.; ATLI, G. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. **Environmental Pollution**, v. 121, p. 129–136, 2003.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; TORRES-JR, A. R.; ABREU-SILVA, A. L. Biomarkers in Catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, p. 1314–1327, 2012.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 270-274, 2004.

COSTA, S. C.; HARTZ, S. M. Evaluation of trace metals (cadmium, chromium, copper and zinc) in tissues of a commercially important fish (*Leporinus obtusidens*) from Guaíba Lake, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 241-250, 2009.

CUI, B.; ZHANG, Q.; ZHANG, K.; LIU, X.; ZHANG, H. Analyzing trophic transfer of heavy metals for food webs in the newly-formed wetlands of the Yellow River Delta, China. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 1297-1306, 2011.

DÓREA, J. G.; BARBOSA, A.; SOUZADE, J.; FADINI, P.; JARDIM, W. F. Piranhas (*Serrasamus* spp.) as markers of mercury bioaccumulation in amazon ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.59, p.57-63, 2004.

DURRIEU, G.; MAURY-BRACHET, R.; BOUDOU, A. Goldmining and mercury contamination of piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 3, p. 237-352, 2005.

ERSOY, B.; CELIK, M. The essential and toxic elements in tissues of six commercial demersal fish from Eastern Mediterranean Sea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1377-1382, 2010.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 418-425, 2000.

FENECH, M.; CHENG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the

cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FERNANDES, M. N.; MAZON, F. 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds). **Fish adaptations**. Enfield: Science Publishers, 2003, p. 203-231.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. O.; CESTARI, M. A. M. 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**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A. T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian Journal Biology**, v. 71, n. 1, p. 179-188, 2011.

FRACÁCIO R.; VERANI N. F.; ESPÍNDOLA E. L. G.; ROCHA O.; RIGOLIN-SÁ O.; ANDRADE C. A. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Piscis, Ciprinidae) exposed to the toxic sediments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 685-695, 2003.

GOMES, M. V. T.; SATO, Y. Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do Rio São Francisco à jusante da represa de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2011.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: S. M. ADAMS (Ed.) **Biological Indicators of Stress in Fish**. Bethesda, Maryland: AMERICAN FISHERIES SOCIETY SYMPOSIUM, 1990. p. 51-66.

HYLANDER, L. D.; MEILI, M.; OLIVEIRA, L. J.; CASTRO E SILVA, E.; GUIMARÃES, J. R. D.; ARAUJO, D. M.; NEVES, R.P.; STACHIW, R.; BARROS, A.

R.; SILVA, G. D. Relationship of mercury with aluminum, iron, and manganese oxyhydroxides in sediments from the Alto Pantanal, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 260, p. 97-107, 2000.

IKEM, A.; EGIEBOR, N. O.; NYAVOR, K. Trace elements in water, fish and sediment from Tuskegee Lake, Southeastern USA. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 149, p. 51–75, 2003.

JESUS, T. B de; CARVALHO, C. E. V de. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

KEHRING, H. A.; MALM, O.; PALERMO, E. F. A.; SEIXAS, T. G.; BAETA, A. P.; MOREIRA, I. Bioconcentração e biomagnificação de metilmercúrio na baía de Guanabara, Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 377-384, 2011.

KEHRING, H. A.; FERNANDES, K. W. G.; MALM, O.; SEIXAS, T. G.; DI BENEDITO, A. P. M.; SOUZA, C. M. M. Transferência trófica de mercúrio e selênio na costa norte do Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1822-1828, 2009.

KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COBB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T.; HOOPER, M. J.; MARTIN, C. F.; McMURRY, S. T.; PATINO, R.; SMITH, E. E.; THEODORAKIS, C. W. Environmental Ecotoxicology. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 6th ed. New York: MCGRAW-HILL, 2001. p. 236.

KIRSCHBAUM, A. A.; SERIANI, R.; PEREIRA, C. D. S.; ASSUNÇÃO, A.; ABESSA, D. M. S.; ROTUNDO, M. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 151-154, 2009.

KPEE, F.; OZIOMA, E.; IHUNWO, L. Seasonal variation of Cd, Ni, Cu and Pb in catfish, sediment and water samples from Ipo Stream in Ikwerre District of Rivers State,

Nigeria. **Journal of Applied Sciences & Environmental Management**, v. 13, n. 2, p. 63-67, 2009.

LEMOS, C. T.; RODEL, P. M.; TERRA, N. T.; OLIVEIRA, N. C. D.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 391-401, 2007.

LEONARDO, J. M. L. O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; NATALI, M. R. M.; VOLSKI, T.; CAVICHIOLO, F. Histologia das brânquias de larvas de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 863-870, 2001.

LIMA JUNIOR, R. G. S.; ARAÚJO, F. G.; MAIA, M. F.; PINTO, A. S. S. B. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research Section**, v. 89, p. 171-179, 2002.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of Armed Forces Institute of Pathology**. New York: MC GRAW-HILL BOOK COMPANY, 1968.

LUPI, C.; NHACARINI, N. I.; MAZON, A. F.; SÁ, O. R. Avaliação da poluição ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Fafibe on line**, n. 3, p. 1-6, 2007.

MARANHÃO. **Decreto nº 7.545 de 07 de março de 1980**. Cria o Parque Estadual do Bacanga e dá outras providências. São Luís: D.O.E, de 21.03.1980, Ano LXXIII, n. 56.

MARANHÃO. **Decreto 12.103 de 01 de outubro de 1991**. Cria, no Estado do Maranhão, a Área de Proteção Ambiental da Região do Maracanã, com limites que especifica e dá outras providências. São Luís: D.O.E, de 01.10.1991, Ano LXXXV, n. 189.

MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, p. 797-807, 2004.

MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. (Eds.). **Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi – Guaçu**. São Paulo: SÃO CARLOS, 2003. p. 149-180.

MENESES, T. S. Fauna, pesca e contaminação por metais pesados em pescado no litoral de Sergipe. **Dissertação**, Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2008. 115f.

MIRANDA, A. L. C. Bioacumulação de poluentes organopersistentes (pops) em traíra (*Hoplias malabaricus*) e seus efeitos *in vitro* em células do sistema imune de carpa (*Cyprinus carpio*). **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 66f. 2006.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.

MUTO, E. Y.; SOARES, L. S. H.; SARKIS, J. E. S.; HORTELLANI, M. A.; PETTI, M. A. V.; CORBISIER, T. N. Biomagnificação de mercúrio na teia trófica marinha da baixada Santista (SP). **Oceanografia e Políticas Públicas**, v. 43, p. 12-17, 2011.

NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C.; SUMAYA C.; SÁ, O. R. Avaliação da qualidade da água no reservatório UHE Furnas - MG, utilizando as brânquias de *Pimelodus maculatus* (LACÈPÈDE, 1803) como biomarcador de poluição ambiental. **Ciência et Praxis**, v. 1, n. 1, p. 15-20, 2008.

NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C.; VIEIRA, R. C. A.; RIGOLIN-SÁ, O. Utilização das brânquias de *Pimelodus maculatus* (Lacèpède, 1803) (Siluriformes; Pimelodidae) como biomarcador de poluição no reservatório da UHE Marechal Mascarenhas de Moraes, Minas Gerais, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 24, n. 3, p.51-58, 2011.

OBASOHAN, E. E. Bioaccumulation of chromium, copper, manganese, nickel and lead in a freshwater cichlid, *Hemichromis fasciatus* from Ogba River in Benin City, Nigeria. **African Journal of General Agriculture**, v. 4, n. 3, p. 141-152, 2008.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.53, n.3, p. 331-347, 2002.

PEREIRA, D. P.; SANTOS, D. M. S.; CARVALHO NETA, A. V.; CRUZ, C. F.; CARVALHO NETA, R. N. F. Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na Laguna da Jansen, São Luís, MA (Brasil). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, p. 1213-1221, 2014.

PEREIRA, P.; PABLO, H.; PACHECO, M.; VALE, C. The relevance of temporal and organ specific factors on metals accumulation and biochemical effects in feral fish (*Liza aurata*) under a moderate contamination scenario. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 805–816, 2010.

PINHEIRO-SOUSA, D. B.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes), to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 305-312, 2013.

PIZARRO, J.; VERGARA, P. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; VALENZUELA, A. M. Heavy metals in northern Chilean rivers: spatial variation and temporal trends. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, p. 747-754, 2010.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. (Eds.). **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: FISHING NEWS BOOKS, 1994. p. 339-352.

PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species.

Environmental Research, 2004. Disponível em: www.sciencedirect.com Acesso: 06/12/2015.

PRÁ, D.; GUECHEVA T.; FRANK, S. I. R.; KNAKIEVI, C. Z. T.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Toxicidade e genotoxicidade do sulfeto de cobre em planárias de água doce e camundongos. **Journal Brazilian Ecotoxicology**, v.2, p. 171 – 176, 2006.

QUEIROZ, M. T. A. Bioacumulação de metais pesados no Rio Piracicaba, Minas Gerais, aplicando a análise por ativação Neutrônica Instrumental. **Dissertação**, Mestrado em Engenharia Industrial, Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, Coronel Fabriciano, 2006.

RAVICHANDRAN, M. Interactions between mercury and dissolved organic matter – a review. **Chemosphere**, v. 55, p. 319-331, 2004.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: EdUEM; 2013. 135 p.

RODRIGUES, L. S.; DUARTE, R. M.; VAL, A. L. Determinação da sensibilidade ao cobre para a espécie de peixe amazônica *Paracheirodon axelrodi*, schultz 1956. **Anais, Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu: SOCIEDADE DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2005. p. 3-5.

RODRIGUES, M. L. K.; FORMOSO, M. L. L. Heavy metals in recent sediments and bottom-fish under the influence of tanneries in south Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 176, p. 307–327, 2006.

SANTOS, C. H. A.; LOURENÇO, J. A.; BRAGA NETO, F. H. F.; COSTA, O. R.; IGARASHI, M. A. Características dos ecossistemas estuarinos brasileiros e as atividades Antrópicas. In: IV Semana do Meio Ambiente da UFC. **Anais**. Fortaleza: UFC, v. Único. p. 71-85, 2006.

SANTOS, D. M. S.; MELO, M. R. S.; MENDES, D. C. S.; ROCHA, I. K. B. S.; SILVA, J. P. L.; CANTANHÊDE, M. C.; MELETTI, P. C. Histological Changes in

Gills of Two Fish Species as Indicators of Water Quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 12927-12937, 2014.

SANTOS-FILHO, F. M.; REZENDE, K. F. O.; EMERENCIANO, A. K.; MOREIRA, L. M.; VILA, V. B.; BORGES, R. M.; PRESSINOTTI, L. N. Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **Atas de Saúde Ambiental**, v. 2, n. 1, p. 9-22, 2014.

SCHMITT, C. J.; BRUMBAUGH, W. G.; MAY, T. W. Accumulation of metals in fish from lead-zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 14-30, 2007.

SILVA, D. S.; LUCOTTE, M.; PAQUET, S.; DAVISON, R. Influence of ecological factors and of land use on mercury levels in fish in the Tapajós River basin, Amazon. **Environmental Research**, v. 109, p. 432-446, 2009.

SOUZA, I. C.; DUARTE, I. A. N. D.; PIMENTEL, N. Q.; ROCHA, L. D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; AZEVEDO, V. C.; PEREIRA, C. D. S.; MONFERRÁN, M. V.; MILANEZ, C. R. D.; MATSUMOTO, S. T.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**, v. 180, p. 136-144, 2013.

SOUZA LIMA, A. P.; MÜLER, R. C. S.; SARKIS, J. E. de S.; ALVES, C. N.; BENTES, DE SOUZA, A. P. L.; MULLER, R. C. S.; SARKIS, J. E. S.; ÁLVES, C. N.; BENTES, M. H. S.; BRABO, E.; SANTOS, E. O. Mercury contamination in fish from Santarém, Pará, Brazil. **Environmental Research**, v. 83, p. 117-122, 2000.

STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, p. 137-159, 2003.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 2, p. 321-336, 1995.

VEIGA, M. L.; RODRIGUES, E. L.; PACHECO, F. J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 171-175, 2002.

WEECH, S. A.; SCHEUHAMMER, A. M.; ELLIOTT, J. E.; CHENG, K.M. **Environmental Pollution**, v. 131, p. 275-286, 2004.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.

TAKASHIMA F.; HIBIYA T. **An atlas of fish histology**. Normal and pathological features. 2th ed. Tokyo: KODANSHA LTD, 1995.

TAYLOR, R. G.; WHITTINGTON J. A.; GRIER H. J.; CRABTREE R. E. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in the common snook, *Centropomus undecimalis*, from South Florida waters. **Fishery Bulletin**, v. 98, n. 3, p. 612-624, 2000.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK P.; SAHAPHONG S.; JARITKHUAN S. Histological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v.121, p.307-320, 2003.

VAZZOLER, A. E. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá-PR: EDUEM/SBI/CNPQ/NUPELIA, 1996. 169p.

YI, Y.; YANG, Z.; ZHANG, S. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2575-2585, 2011.

YI, Y.; ZHANG, S. Heavy metal (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) concentrations in seven fish species in relation to fish size and location along the Yangtze River. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 3989-3996, 2012.

YOKOO, E. M.; VALENTE, J. G.; SICHIERI, R.; SILVA, E. C. Validation and calibration of mercury intake through self-referred fish consumption in riverine populations in Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Environmental Research**, v. 86, p. 88-93, 2001.

ANDRADE, V. M.; SILVA, J.; SILVA, F. R.; HEUSER, V. D.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L.; FREITAS, T. R. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p. 459-68, 2004.

BILANDZIC, N.; DOKIC, M.; SEDA, M. Metal content determination in four fish species from the Adriatic Sea. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1005-1010, 2011.

BORBA, M. R.; CERQUEIRA, V. R. Atrativos sintéticos na adaptação da larva do robalo (*Centropomus parallelus*) ao alimento formulado. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA, SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA. **Anais**. Recife: ABRAq, v.2, p.117-123, 1998.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Brasília: DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2005.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

CERQUEIRA, V. R.; MACHIAVELLO, J. A. G. Comparação do crescimento de juvenis do robalo (*Centropomus undecimalis*) alimentados com uma dieta experimental e uma dieta comercial para truta. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS. **Anais**. Peruíbe, SP, 1994.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 270-274, 2004.

CLARKSON, T. W. Human health risks from methylmercury in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, p. 957-961, 1990.

CLARKSON, T. W. The Toxicology of Mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 34, n. 3, p. 369-403, 1997.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, v. 3, n. 12, p. 24-26, 2000.

DI PAOLO, CAROLINA. Aplicação do ensaio cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona. **Dissertação**. Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, 2006.

ERSOY, B.; CELIK, M. The essential and toxic elements in tissues of six commercial demersal fish from Eastern Mediterranean Sea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1377-1382, 2010.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. O.; CESTARI, M. A. M. 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**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gell electrophoresis. **MMS Communications**, v. 3, p. 103-115, 1995.

LARSON, K. A.; WEINCEK, J. M., Mercury removal from aqueous streams utilizing micro emulsion liquid membranes. **Environmental Progress**, v. 11, n. 2, p. 456-464, 1994.

LEBEL, J.; ROULET, M.; MERGLER, D.; LUCOTFE, M.; LARRIBE, F. Fish diet and mercury exposure in a riparian Amazonian population. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 97, p. 31-44, 1997.

LEMOS, C. T.; RODEL, P. M.; TERRA, N. T.; OLIVEIRA, N. C. D.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 391-401, 2007.

MACIEL-FILHO A.A.; GÓES-JÚNIOR C.D.; CÂNCIO J.A.; HELLER L.; MOARES L.R.S.; CARNEIRO M.L.; COSTA S.S. Interfaces da gestão de recursos hídricos e saúde pública, 2003. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/PDF/interfaces.pdf> Acesso em 01/12/2015.

MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, p. 797-807, 2004.

MERGLER, D. Review of neurobehavioral deficits and river fish consumption from the Tapajós (Brazil) and St. Lawrence (Canada). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 2, p. 93-99, 2002.

OLIVEIRA, B. L.; FERNANDES, L. F. L.; BIANCHINI, A.; CHIPPARI- GOMES, A. R.; SILVA, B. F.; BRANDÃO, G. P.; GOMES, A. L. C. Acute copper toxicity in juvenile fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) in sea water. **Neotropical Ichthyology**, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ni/2014nahead/1679-6225-ni-1982-0224-20140040.pdf>
Acesso: 10/12/2015.

PAOLIELLO, M. M. B. CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos**. Salvador: CADERNO DE REFERÊNCIA AMBIENTAL, v. 1, 2001. 144p.

PAX-Y-MIÑO, C.; DÁVALOS, M. V.; SÁNCHEZ, M. E.; ARÉVALO, M.; LEONE, P. E. Shoul gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence base on the comet assay. **Mutation Research**, v. 516, p. 57-61, 2002.

PEREIRA, C. D. S.; ABESSA, D. M. S.; ZARONI, L. P.; GASPARR, M. R.; BAINY, A. C. D.; BICEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; FURLEY, T. H.; SOUZA, E. C. P. M de. Integrated assessment of multi-level biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião – Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p. 462-469, 2007.

PERERA-GARCÍA, M. A.; MENDOZA-CARRANZA, M.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M.; HUERTA-ORTÍZ, M.; PÉREZ-SÁNCHEZ, E. Reproductive biology of common snook *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) in two tropical habitats. **Revista de Biología Tropical**, v. 59, n. 2, p. 669-681, 2011.

PRÁ, D.; GUECHEVA, T.; FRANK, S. I. R.; KNAKIEVI, C. Z. T.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Toxicidade e genotoxicidade do sulfeto de cobre em planárias de água doce e camundongos. **Journal Brazilian Ecotoxicology**, v.2, p. 171-176, 2006.

REIS, A. B.; SANTANA, D. M. G.; AZEVEDO, J. F.; MERLINI, L. S.; ARAÚJO, E. J. A. Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 303-311, 2009.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas – RS. Editora da ULBRA, 2003. 356p.

ROWAN, J. S.; BARNES, S. J. A.; HETHERINGTON, S. L.; LAMBERS, B.; PARSONS, F. Geomorphology and pollution: the environmental impacts of lead mining, Leadhills, Scotland. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 51, p. 57-65, 1995.

SCALON, M. C. S. A.; RECHENMACHER, C. B.; SIEBEL, A. M. B.; KAYSER, M. L. C.; RODRIGUES, M. T. C.; MALUF, S. W. D.; RODRIGUES, M. A. S. E.; SILVA, L. B. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Brazilian Journal Biology**, v. 70, n. 4, p. 1217-1222, 2010.

SCHMITT, C. J.; BRUMBAUGH, W. G.; MAY, T. W. Accumulation of metals in fish from lead-zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 14-30, 2007.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; CCHEEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 1, n. 175, p. 184-191, 1988.

SMITH, K. L.; GUENTZEL, J. L. Mercury concentrations and omega-3 fatty acids in fish and shrimp: preferential consumption for maximum health benefits. **Marine Pollution Bulletin**, n. 60, p. 1615-1618, 2010.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. IV Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em petróleo e Gás. **Anais**. Campinas, SP: ABPG-PDPETRO, p. 21-24, 2007.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 2, p. 321-336, 1995.

TAO, Y.; YUAN, Z.; XIAONA, H.; WEI, M. Distribution and bioaccumulation of heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels and potential health risk assessment from Taihu lake, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 81, p. 55–64, 2012.

TAYLOR, R. G.; WHITTINGTON J. A.; GRIER H. J.; CRABTREE R. E. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in the common snook, *Centropomus undecimalis*, from South Florida waters. **Fishery Bulletin**, v. 98, n. 3, p. 612-624, 2000.

TURKMEN, M.; TURKMEN, A.; TEPE, Y.; TORE, Y.; ATES, A. Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean Seas. **Food Chemistry**, v. 113, p. 233-237, 2009.

VAZZOLER, A. E. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá-PR: EDUEM/SBI/CNPQ/NUPELIA, 1996. 169p.

YOKOO, E. M.; VALENTE, J. G.; SICHIERI,R.; SILVA, E. C. Validation and calibration of mercury intake through self-referred fish consumption in riverine populations in Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Environmental Research**, v. 86, p. 88-93, 2001.