



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA-UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO



Genotoxicidade em peixes da Baía de Todos os Santos - BA como indicadores de poluição

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Sheila Tamine Cruz



Jequié – BA
2017

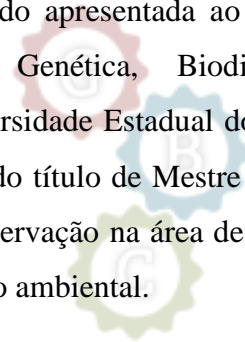
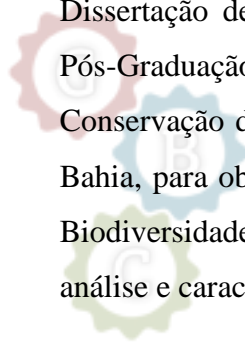
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Sheila Tamine Cruz

Genotoxicidade em peixes da Baía de Todos os Santos BA como indicadores de poluição

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação na área de concentração análise e caracterização ambiental.

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Roberto A. de Mello Affonso

Coorientadores:

Prof. Dr. André Luiz da Cruz

Prof^a. Dr^a. Caroline Garcia

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Jequié – BA

2017

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



C955g Cruz, Sheila Tamine.

Genotoxicidade em peixes da Baía de Todos os Santos BA como indicadores de poluição
Sheila Tamine Cruz.- Jequié, 2017.
61f.

(Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto A. de Mello Affonso e coorientação dos Prof. Dr. André Luiz da Cruz e Prof^a. Dr^a. Caroline Garcia)

1. Bioindicador 2. Estuário 3. Genética toxicológica 4. Poluição I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título

CDD – 571.95

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual nº 9.666 de 05.05.2006
**Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e
Conservação PPGBC**



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE DO(A) CANDIDATO(A) **SHEILA TAMINE CRUZ** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO.

Aos vinte e oito dias do mês de agosto de dois mil e dezessete, às nove horas na sala 11 do Pavilhão Prof. Manoel Sarmento - UESB, *Campus* de Jequié-BA, reuniu-se em sessão pública, a banca examinadora composta por: Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso, *DSc.*, orientador, UESB / Jequié-BA, André Luis da Cruz, *DSc.*, UFBA/Salvador -BA e Caroline Garcia, *DSc.*, UESB / Jequié-BA para a Defesa de Dissertação intitulada: “**Genotoxicidade em peixes da Baía de Todos os Santos - BA como indicadores de poluição**”, de **Sheila Tamine Cruz**. Em sessão pública, o(a) candidato(a) foi arguido(a) oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

- APROVADO
 APROVADO COM RESTRIÇÕES (as exigências que constam na folha complementar anexa devem ser atendidas em até 30 (trinta) dias)
 NÃO APROVADO

De acordo com o capítulo XXII do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, o candidato no prazo de 30 dias prorrogáveis por mais 30 dias deve entregar as cópias da versão final exigidas pelo Regimento do PPGBC à secretaria como condição para a expedição do diploma.

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca:

Jequié, 28 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso / UESB/Jequié

Prof. Dr. André Luis da Cruz – UFBA/Salvador

Profa. Dra. Caroline Garcia – UESB / Jequié



Campus de Jequié - Avenida José Moreira Sobrinho s/n, Jequiezinho
Jequié-BA. CEP 45.208-091
Telefone: (0**73) 3528-9725 E-mail: ppggbc@uesb.edu.br

Genética,

vação

Genética,

vação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

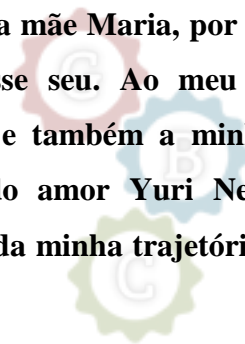
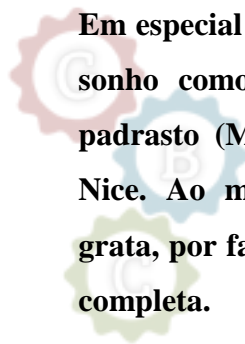


Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dedicatória



Em especial a minha mãe Maria, por abraçar meu sonho como se fosse seu. Ao meu pai (Rui) e padrasto (Manuel) e também a minha madrasta Nice. Ao meu lindo amor Yuri Negrão. Muito grata, por fazerem da minha trajetória ainda mais completa.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



AGRADECIMENTOS

A Deus, príncipe da paz, sem tua presença não teria chegado até aqui, glórias te dou por tudo que tu és, incrivelmente Deus.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

A minha mãe, minha amiga, em todas as circunstâncias. Ao meu pai Rui, minha madrastra Nice e padrasto Manuel. As minhas irmãs, Naiara e Karine, aos meus irmãos Luis, Elvis e Glauber. E a toda minha família. Sem vocês minha trajetória não teria sentido, minha base indispensável.

Ao meu noivo, Yuri Negrão que foi essencial pra que todo esse projeto desse certo, muito grata por tamanha paciência e companheirismo. A distância só fortaleceu nossa cumplicidade e amor.

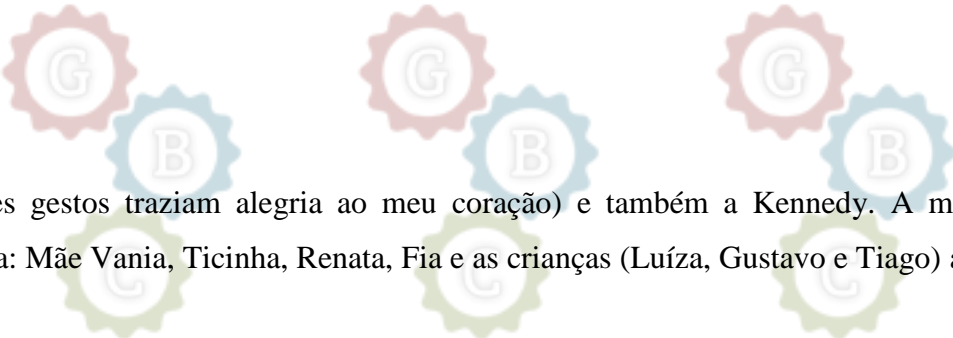
À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e também ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, por oportunizar-me vivenciar novos desafios.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso por ter me acolhido nesse projeto. Pessoa diferenciada, que sempre surpreende com seu jeito simples de ser. Saiba que seus ensinamentos fazem grande diferença em nossas vidas.

Aos meus coorientadores: Prof Dr. Caroline Garcia e o Prof. Dr. André Cruz por abraçarem esse projeto e por serem ótimos profissionais.

Aos meus amigos, em especial, a João e Luzy que foram presentes de forma incrivelmente linda, sem vocês a caminhada teria sido mais árdua. E também a Darley e George pelo acolhimento nos dias de coleta e a minha afilhada Maisa, como seus abraços e mimos foram motivadores.

A Victor, Polly, Maira, Marina e Jack, todos vocês foram também sensacionais. A bispa Ivana e a irmã Sueli, mulheres de oração e grandes amigas. A minha sogra Chica, a vovó (Marieta), as minhas cunhadas (Ciane e Pâmella) e aos meus sobrinhos Gabriel e Rafael (que com



simples gestos traziam alegria ao meu coração) e também a Kennedy. A minha segunda família: Mãe Vania, Ticinha, Renata, Fia e as crianças (Luíza, Gustavo e Tiago) amo vocês.

Ao Cardume (Laboratório Citogenética), quantos aprendizados, risos e alegrias compartilhadas.

A Jaqueline, Marcos Rezende, Lorena e o Professor Paulo Carneiro, pelo auxílio nas análises estatísticas.

E a todos os colaboradores nos dias de coletas: Ramon, Jamile, Márcia, Vanderlan, Heigon, Bernardo, Túlio, Yuri, Polly, Manuca, Darley, Maisa e Jhon (motorista). Aos pescadores, Romário, Rogério, Isaac, seu Nilton e Ulisses que foram anjos, pessoas dotadas de tamanha humildade.



BIOGRAFIA

Sheila Tamine Cruz, filha de Maria do Perpetuo Socorro Pereira Cruz e Rui Souza da Cruz, nasceu em Valença, Bahia, Brasil, em 1987. Sua formação inicial perpassou pela Escola Municipal Lomanto Junior, todo seu Ensino Fundamental foi na Escola Estadual João Leonardo da Silva e Ensino Médio no Centro Federal de Educação Tecnológica (antigo CEFET, hoje atual IFBA).

Em 2010, foi aprovada no vestibular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) para o curso de Ciências Biológicas. Durante sua trajetória acadêmica, participou do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à docência (PIBID), no Projeto de Educação Inclusiva que teve como objetivo oferecer uma formação complementar ao licenciando. Tal conhecimento adquirido foi enfatizado na perspectiva de desenvolver práticas metodológicas específicas aos alunos com algum tipo de deficiência (visual, intelectual, física) em uma abordagem inclusiva na escola regular. Ao final do curso acadêmico, desenvolveu um trabalho monográfico intitulado de Conhecimentos sobre a automedicação por estudantes de licenciaturas da UESB e a contribuição desses no exercício profissional.

Em 2014, participou do curso de Pós-Graduação e Qualificação Profissional (IPROFIT) em Gestão e Educação Ambiental na área de meio ambiente. Ainda neste ano, foi aprovada no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética Biodiversidade e Conservação da UESB, onde desenvolveu pesquisa na área de Análise e Caracterização Ambiental.





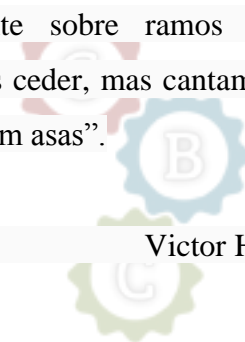
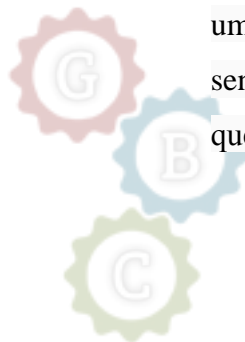
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

“Seja como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre ramos muito leves, sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas”.

Victor Hugo



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



RESUMO

O acúmulo de poluentes aquáticos no sedimento potencializa a contaminação de espécies bentônicas ou demersais que vivem em íntima associação com o substrato, colocando-as como bioindicadoras em potencial da contaminação ambiental. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de alterações genotóxicas em três espécies de peixes bentônicos, em diferentes áreas da BTS (Aratu, Ribeira, Paraguaçu e Jaguaripe), com impactos de moderados a acentuados, a fim de fornecer um panorama sobre a poluição destes ecossistemas. As espécies escolhidas para tais estudos foram *Sphoeroides testudineus*, *Bathygobius soporator* e *Ogcocephalus vespertilio*. Foi realizado o teste de micronúcleo pisco e as alterações nucleares investigadas foram: micronúcleos, binúcleos, broto nuclear, entalhes e núcleos lobados. Os dados foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância a 5%, além da Análise de Componentes Principais (ACP) e do Heatmap. Todas as alterações nucleares foram frequentes nas espécies supracitadas. Adicionalmente, a ocorrência de entalhes, lóbulos e broto nuclear foi mais informativo que a análise tradicional de micronúcleos para avaliar efeitos de toxicidade em organismos aquáticos, ainda que a incidência de MN tenha sido significativa em *B. soporator*. Considerando todas as espécies *S. testudineus*, *B. soporator* e *O. vespertilio*, as maiores frequências totais de AMN (alteração morfológica nuclear), foram encontradas nas Baías de Aratu e Ribeira, enquanto que Paraguaçu e Jaguaripe apresentaram as menores frequências totais. Tais resultados podem ser corroborados pelos agrupamentos do cluster do Heatmap em ambas as espécies. De fato, as AMNs tiveram maior relação com as localidades de maior impacto (Aratu + Ribeira) conforme verificado nas Análises de Componentes Principais (ACP). Os dados em *O. vespertilio* apresentaram pouca relação com as variáveis genotóxicas e as menores frequências de AMN. Assim, os níveis de AMN encontrados em *S. testudineus* e *B. soporator* na região de Aratu e Ribeira parecem estar relacionados ao passivo químico, às atividades portuárias, industriais e ao lançamento de efluentes de esgoto doméstico sem tratamento adequado. De acordo com essa proposta, vários estudos na BTS revelaram alta incidência de xenobióticos altamente tóxicos, como os metais, principalmente nas localidades de Aratu e Ribeira. Concluimos que as espécies estudadas, em particular *S. testudineus* e *B. soporator*, mostraram-se mais sensíveis à contaminação ambiental quando comparadas a *O. vespertilio*. O hábito alimentar das espécies escolhidas e sua associação com o substrato também parece favorecer os processos de exposição e biomagnificação de contaminantes ambientais, que juntamente com sua abundância em estuários brasileiros, colocam *S. testudineus* e *B. soporator* como excelente modelo para estudos ecotoxicológicos.

Palavras-chave: Bioindicador; Estuário; Genética toxicológica e Poluição.



ABSTRACT

The accumulation of aquatic pollutants in the sediment favors the contamination of benthic or demersal species that live in close association with the substrate, placing them as potential bioindicators of environmental contamination. Therefore, the goal of this work was to evaluate the occurrence of genotoxic changes in three benthic fish species in different areas of BTS (Aratu, Ribeira, Paraguaçu and Jaguaripe), with moderate to severe impacts, in order to provide an overview of the pollution of these ecosystems. The species chosen for this study were *Sphoeroides testudineus*, *Bathygobius soporator* and *Ogcocephalus vespertilio*. The fish micronucleus test was performed and the nuclear alterations investigated were: micronuclei, binuclei, nuclear bud, notches and lobed nuclei. The data were compared using the Kruskal-Wallis test and Student-Newman-Keuls test at significance level of 5%, in addition to Principal Component Analysis (PCA) and Heatmap. All nuclear alterations were frequent in the abovementioned species. In addition, the occurrence of notches, lobes and nuclear bud was more informative than the traditional micronuclei analysis to evaluate toxicity effects in aquatic organisms, although the incidence of MN was significant in *B. soporator*. Considering all species *S. testudineus*, *B. soporator* and *O. vespertilio*, the highest total frequencies of AMN (nuclear morphological alteration) were found in the Aratu and Ribeira Bays, while Paraguaçu and Jaguaripe had the lowest total frequencies. These results were corroborated by the groupings of the Heatmap cluster in both species. In fact, the AMNs were more closely related to the mostly impacted locations (Aratu + Ribeira), as revealed by Principal Component Analysis (PCA). The results in *O. vespertilio* could not be related to the genotoxic variables. Thus, the AMN levels found in *S. testudineus* and *B. soporator* in the region of Aratu and Ribeira seem to be related to chemical contamination caused by port and industrial activities, as well as by untreated domestic sewage effluents. Accordingly, several studies in BTS revealed high incidence of potentially toxic xenobiotics, especially in Aratu and Ribeira. We conclude that the selected species, *S. testudineus* and *B. soporator* in particular, were more sensitive to environmental contamination when compared to *O. vespertilio*. The feeding habits of the selected species and their association with the substrate also seems to favor the processes of exposure and biomagnification of environmental contaminants, which, together with their abundance in Brazilian estuaries, place *S. testudineus* and *B. soporator* as an excellent model for ecotoxicological studies.

KEYWORDS: Bioindicator; Estuary; Toxicological genetics e Pollution.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localidades amostradas na Baía de Todos os Santos, Bahia: Baía da Ribeira (amarelo), Baía de Aratu (vermelho), estuário do rio Paraguaçu (marrom), estuário do rio Jaguaripe (preto). 30
- Figura 2. Pontos de coleta de espécimes para estudos genotóxicos: Baía de Aratu (A); Baía da Ribeira (B); Estuário do rio Paraguaçu (C); Estuário do rio Jaguaripe (D). 30
- Figura 3. Representação das espécies estudadas em estuários da Baía de Todos os Santos. *Ogcocephalus vespertilio* (a); *Sphoeroides testudineus* (b) e *Bathygobius soporator* (c). 32
- Figura 4. Alterações morfológicas nucleares (AMN) em eritrócitos das espécies estudadas: (A) hemácia normal (B) micronúcleo; (C) núcleo entalhado; (D) célula binucleada; (E) broto nuclear; (F) núcleo lobado. 34
- Figura 5. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares encontrada em espécimes de *S. testudineus* avaliados nos sítios estudados (pontos) da BTS. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados. 37
- Figura 6. Heatmap e cluster em amostras de *S. testudineus* para todas as localidades (Aratu, Ribeira, Jaguaripe e Paraguaçu). MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: entalhes; LB: lóbulos. 38
- Figura 7. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares encontradas em espécimes de *B. soporator*, avaliadas nas localidades estudadas (pontos) da BTS. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados. 39
- Figura 8. Heatmap e cluster em amostras de *B. soporator* para todas as localidades (Aratu, Ribeira, Jaguaripe e Paraguaçu). MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: entalhes; LB: lóbulos. 40
- Figura 9. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares observadas em eritrócitos de *O. vespertilio* para as localidades de Aratu, Ribeira, Paraguaçu e Jaguaripe na BTS. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados. 41
- Figura 10. Heatmap e cluster em amostras de *O. vespertilio* para todas as localidades (Aratu, Ribeira, Jaguaripe e Paraguaçu). MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: entalhes; LB: lóbulos. 42

Figura 11. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares encontradas em espécimes de *Bathygobius soporator*, *Sphoeroides testudineus* e *Ogcocephalus vespertilio* para a localidade de Aratu. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados. 43

Figura 12. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares encontradas em espécimes de *Bathygobius soporator*, *Sphoeroides testudineus* e *Ogcocephalus vespertilio* para a localidade de Ribeira. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados. 44

Figura 13. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares encontrada em espécimes de *S. testudineus*, *B. soporator* e *O. vespertilio* para a localidade do estuário do rio Paraguaçu. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados. 45

Figura 14. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares encontrada em espécimes de *S. testudineus*, *B. soporator*, e *O. vespertilio* para a localidade do estuário do rio Jaguaripe. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados. 45



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Total de peixes analisados por espécie/ ponto coletado ao longo da BTS.	32
Tabela 2. Frequências de alterações morfológicas nucleares em <i>S. testudineus</i> , <i>B. soporator</i> e <i>O. vespertilio</i> por ponto coletado na Baía de Todos os Santos.	35
Tabela 3. Teste de Kruskal-Wallis e de Student-Newman-Keuls por espécie/comparando todas as localidades (Aratu, Ribeira, Paraguaçu e Jaguaripe) da BTS estudadas.	36
Tabela 4. Teste de Kruskal-Wallis e de Student-Newman-Keuls por ponto (Aratu, Ribeira, Paraguaçu e Jaguaripe) da BTS comparando todas as espécies (<i>S. testudineus</i> , <i>B. soporator</i> e <i>O. vespertilio</i>).	36



LISTA DE SIGLAS

ACP- Análise do Componente Principal

AMN- Alterações Morfológicas Nucleares

BL- Broto nuclear

BN- Binúcleo

BTS- Baía de Todos os Santos

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA -*Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EN- Entalhe

HPAs- Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IBIO- Instituto de Biologia

LB- Lóbulos

MN – Micronúcleo

MXR- Resistência multixenobiótica

PEL- Nível provável de efeito

POPs- Poluentes orgânicos persistentes

TEL- Nível limite de efeito

UFBA- Universidade Federal da Bahia



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Poluição na Baía de Todos os Santos	19
2.2. Ecossistemas aquáticos: poluição por metais	20
2.3. Ictiofauna como bioindicadores da poluição aquática.....	22
2.4. Alterações morfológicas nucleares associadas à genotoxicidade em peixes.....	24
2.5. Estudos genotóxicos em peixes	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2. Objetivos específicos:.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. Área de estudo	29
4.2. Espécies estudadas.....	31
4.3. Análises genotoxicológicas	32
4.4. Análises estatísticas	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Análises genotoxicológicas	34
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos têm sido alvos de inúmeras ações antropogênicas, advindas dos efluentes industriais, domésticos, da agricultura, das atividades portuárias, dentre outras. Essas atividades não apenas comprometem a qualidade da água, como podem ser refletidas negativamente na biota aquática. Assim, tais atividades liberam compostos tóxicos que podem ficar retidos nos sedimentos e bioacumular em organismos, podendo ser passados ao longo da cadeia trófica pelo processo de biomagnificação.

Entre os diversos tipos de xenobióticos, os metais traços correspondem a um dos poluentes mais comumente presentes no meio aquático. Embora muitos elementos só possuam efeitos tóxicos em altas quantidades, outros apresentam toxicidade mesmo em pequenas concentrações. A presença e abundância desses elementos químicos costuma ser diferenciadas entre localidades a depender do tempo, natureza e intensidade das atividades antrópicas regionais.

Muitos trabalhos têm buscado entender a influência desses e de outros compostos xenobiontes no meio aquático sobre o genoma dos organismos. Para tal, muitos animais podem ser usados como bioindicadores, com destaque para os peixes. Esse grupo de vertebrados é adequado para estudos genotóxicos, pois representam um recurso abundante com resultados comparáveis aos demais eucariotos e por constituírem parte da dieta humana. Assim, eles fornecem dados úteis tanto sobre os riscos à biodiversidade em áreas poluídas como para a saúde pública constituindo bioindicadores adequados da qualidade ambiental.

Desde então, para compreender o efeito dos xenobiontes nesses organismos aquáticos, muitas técnicas foram desenvolvidas. Entre eles, o teste de micronúcleo constitui uma ferramenta bastante usual, simples, rápida e que permite detectar alterações na morfologia nuclear atribuído a algum dano genotóxico. Assim, este estudo foi executado em diferentes regiões estuarinas da Baía de Todos os Santos (BTS), que compõe um dos maiores sistemas estuarinos do Brasil, localizada no recôncavo baiano. Devido a sua riqueza natural e ocupação humana intensiva do seu entorno, a BTS é uma área com enorme importância ambiental e econômica (Hatje & Andrade, 2009).

Considerando a importância ambiental e socio-econômica da BTS associada ao alto impacto ambiental a qual tem sido sujeita, torna a região prioritária para estudos ecotoxicológicos. Do mesmo modo, o uso de espécies bentônicas para avaliação de efeitos genotóxicos podem fornecer informações sobre os prováveis efeitos de contaminantes presentes nos sedimentos. Um delineamento experimental refinado, tal qual, ampla

amostragem, uso de espécies distintas são imprescindíveis para o biomonitoramento da Baía de Todos os Santos. Dados dessa natureza trazem implicações para a biodiversidade marinha e para a saúde daqueles que usufruem dos recursos pesqueiros da região. A partir desses resultados, ações mitigatórias e de controle da poluição podem ser sugeridas e efetivamente implantadas, caso os efeitos nocivos sejam apresentados.

Assim, as espécies consideradas nesse estudo foram registradas na BTS e incluem grupos de diferentes ordens, níveis tróficos, porte e ocupação de habitat a fim de testar qual deles reflete melhor as alterações ambientais. Para tanto, a finalidade deste estudo foi verificar os efeitos genotóxicos em peixes frente às condições ambientais como ferramenta preditiva de poluição ambiental.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Poluição na Baía de Todos os Santos

A BTS é um dos maiores sistemas estuarinos do Brasil (1.233 km²), localizada entre a latitude de 12°50'S e a longitude de 38°38'W no recôncavo baiano. Várias cidades estão situadas nas bordas da baía com destaque para Salvador, capital da Bahia com cerca de 3 milhões de habitantes. Devido a sua riqueza natural, extensões de recifes de corais, estuários e manguezais, juntamente a sua facilidade de acesso, a BTS é uma área com enorme importância ambiental e econômica (Hatje & Andrade, 2009).

Além desses aspectos, a BTS é considerada uma das vias mais navegáveis do país (Leão & Dominguez, 2000). Das baías presentes na costa leste do Brasil, a BTS é a que dispõe de terminais portuários de grande porte, bem como canais de navegações internos e profundos que favorecem o desenvolvimento urbano nesta localidade (Hatje & Andrade, 2009). Nesses ecossistemas, a BTS recebe afluentes advindos dos rios Paraguaçu, Subaé e Jaguaripe (Hatje & Barros, 2012).

Desde o século XVI, a região tem sido alvo de ações antrópicas a partir da pesca, ocupação humana e cultivos agrícolas. Com o passar dos séculos e com o desenvolvimento tecnológico, inúmeras atividades econômicas foram implantadas no recôncavo baiano (Araujo, 2000; Hatje & Andrade, 2009). Essas mudanças se intensificaram em meados do século XX, como por exemplo, a construção da Refinaria de Petróleo Landulpho Alves (Oliveira, 1997). A partir da década de 60 houve um aumento de indústrias em torno da BTS, e, ainda a construção da barragem do rio Paraguaçu que diminuiu a vazão de água para a BTS (Brito, 1997). Atualmente, as refinarias de petróleo bem como diversas indústrias (petroquímica, químicas, metalúrgicas, mecânicas, automobilísticas, farmacêuticas, fertilizantes e alimentícias) estão entre os empreendimentos mais encontrados na região (Hatje & Andrade, 2009). Com todas essas atividades antropogênicas os resíduos no sedimento aumentaram e a qualidade ambiental diminuiu (Rocha *et al.*, 2016).

Essas atividades são potenciais fornecedores de contaminantes para as águas e a biota da BTS (Hatje & Andrade, 2009) bem como liberam uma gama de poluentes, tal como os metais, e tem como consequência a bioacumulação pela biota aquática. Assim, uma exposição a altas concentrações desses poluentes podem ocasionar efeitos adversos significativos aos organismos bentônicos ou pelágicos (Hatje & Andrade, 2009).

Dentre outras fontes emissoras de poluição os processos de drenagem agrícola, os esgotos domésticos, os derrames acidentais de resíduos químicos em rios e mares também tem

contribuído para a contaminação desses ecossistemas e das espécies que aí vivem (Arias *et al.*, 2007; Vinodhini & Narayanan, 2008; Camargo, 2009).

Na metade do século XX, por exemplo, a região norte da BTS sofreu impactos ambientais decorrentes do derramamento de petróleo (Celino & Queiroz, 2006). Hoje, essa é a área com maior comprometimento no ecossistema marinho, atribuído ao impacto das indústrias petrolíferas, bem como para a passagem das navegações (Hatje & Andrade, 2009).

A contaminação por xenobióticos, de fato, tem sido verificada em organismos aquáticos no litoral da Bahia (Migues *et al.*, 2013), mesmo em áreas menos impactadas como a Baía de Camamu (Hatje *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2011; Migues *et al.*, 2013). Todavia, ainda assim estas localidades tendem a apresentar menores concentrações de poluentes quando comparadas a estuários mais impactados como Subaé e a Baía de Aratu (Souza *et al.*, 2011).

Diante dos aspectos supracitados é importante que ocorra na BTS um monitoramento regular quanto aos lançamentos dos níveis dos xenobióticos e seus impactos na biota aquática (Santana *et al.*, 2017).

2.2. Ecossistemas aquáticos: poluição por metais

Os ecossistemas aquáticos sofrem impactos resultantes da contaminação por ação antropogênica em taxas mais rápidas que qualquer outro tipo de ambiente (Ferreira, 2005). Efluentes agrícolas, industriais e domésticos geralmente contêm uma ampla variedade de poluentes orgânicos e inorgânicos e sólidos suspensos que, quando lançados em corpos d'água, acabam sendo difundidos por bacias hidrográficas e estuários (Ferraro *et al.*, 2004).

Conseqüentemente, as águas superficiais e subterrâneas podem ser contaminadas por substâncias e misturas complexas provenientes de fontes poluentes pontuais (estações de tratamento de efluentes industriais e urbanos, redes de esgotos domésticos, mineradoras etc.) e não pontuais, como os escoamentos da agricultura, que podem conter fertilizantes químicos e agrotóxicos (Andrade *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008). Esses despejos variam quanto à sua composição a depender da densidade populacional e tipo de indústria ou atividade econômica predominante (Ferreira, 2005). Assim, muitas dessas atividades liberam uma gama de poluentes, como os metais, os quais podem comprometer a qualidade do ambiente natural (Tavares & Carvalho, 1992; Huamán-Pino, 2005; Porto, 2009; Aprile & Bouvy, 2010).

Os metais são elementos químicos que ocorrem naturalmente na natureza e desde a sua descoberta em épocas pré-históricas já haviam sido utilizados pelo homem (Sisino & Filho, 2013). Entre eles, os metais pesados são potencialmente tóxicos e caracterizados por alta

densidade em sua forma elementar (5g/cm^3) e número atômico acima de 22, sendo capazes de precipitar como sulfetos (Baird, 2002; Porto, 2009). Eles formam um grupo de aproximadamente 40 elementos naturalmente presentes no meio ambiente (Huamán-Pino, 2005). As diversas atividades antropogênicas e seus resíduos fazem com que estes elementos entrem em contato com os seres vivos e com o solo, água e ar em quantidades superiores às preexistentes (Huamán-Pino, 2005; Santos *et al.*, 2011).

Esses e outros metais são encontrados em ecossistemas aquáticos em pequenas concentrações (metais traço), usualmente de poucos ppm. Alguns como Cobalto (Co) e Níquel (Ni) são nutrientes essenciais para plantas e animais desde que estejam em pequenas concentrações, enquanto em níveis elevados tornam-se altamente tóxicos (Manahan, 2013). Em contrapartida, alguns metais, tais como o chumbo (Pb), cádmio (Cd) ou o mercúrio (Hg), estão entre os poluentes mais prejudiciais devido a sua relevante toxicidade para os seres humanos, o que os tornam importantes do ponto de vista ambiental e toxicológico (Manahan, 2013). Além do mais, tratam-se de elementos químicos que não possuem função biológica ou vital definida (Andrade *et al.*, 2004).

Certamente, os metais estão entre os grupos de poluentes mais preocupantes de ecossistemas aquáticos, uma vez que são modificadores ambientais persistentes e com potencial cumulativo (Reeve, 2002). Nas últimas décadas, um número crescente de estudos que tratam da determinação e quantificação destes poluentes em diferentes espécies da fauna aquática e costeira vem sendo publicado, uma vez que muitas possuem importância econômica e/ou servem para o consumo humano (Migues *et al.*, 2013; Jesus *et al.*, 2014).

Devido à capacidade de reagirem com ligantes e macromoléculas, esses elementos podem sofrer especiação no meio aquático, o que influenciará o seu comportamento geoquímico e biodisponibilidade (Scheffer *et al.*, 2007). Dessa forma, os metais podem bioacumular e biomagnificar-se, contaminando a cadeia alimentar, aumentando sua concentração gradativamente nos seres vivos nos níveis tróficos superiores e ampliando sua persistência no meio ambiente (Kumar *et al.*, 2012; Ogundiran & Ojo, 2012).

No caso da BTS, vários estudos demonstraram concentrações acima do considerado natural de metais traço (As, Cd, Pb, Zn, Hg, Mn, Co, Cu, Sb, dentre outros) no sedimento e biota (Hatje & Andrade, 2009; Rocha *et al.*, 2012).

De modo similar, outros sistemas estuarinos próximos à BTS, como a Baía de Camamu no sul da Bahia, também apresentaram concentrações elevadas de metais traço potencialmente tóxicos em camarões de importância comercial (Migues *et al.*, 2013). Esse resultado, além de

demonstrar a capacidade de difusão dos poluentes e a bioacumulação em organismos aquáticos, também serve como alerta à saúde pública por meio do consumo de substâncias nocivas nos tecidos desse importante produto pesqueiro.

Porém, apesar dos vários estudos já desenvolvidos e do claro estágio avançado de degradação ambiental de boa parte da BTS (Rocha *et al.*, 2012), existe uma lacuna no que diz respeito ao estudo dos efeitos ecotoxicológicos para populações e comunidades de organismos em regiões com grande impacto antrópico. O não conhecimento desses efeitos ainda pode colocar em risco a saúde humana, uma vez que estes aspectos precisam ser interpretados de forma integrada. Por essas razões, diversos países adotam mecanismos de avaliação dos ecossistemas utilizando parâmetros físicos, químicos e biológicos através de elementos ou sinais-chaves, denominados alvos ecológicos, que revelem os processos de controle e suas alterações (Ferreira, 2005; Hellou, 2011).

2.3. Ictiofauna como bioindicadores da poluição aquática

Diante da preocupação do homem com as questões ambientais e o progressivo aumento da contaminação química surge a ecotoxicologia (Sisinno & Filho, 2013). Proposta por René Truhaut em 1969, a ecotoxicologia constitui um ramo adicional da toxicologia que visa estudar os efeitos das substâncias danosas que impactam os ecossistemas. Em outra definição, a ecotoxicologia volta-se para o entendimento da relação dos efeitos dos contaminantes sobre os componentes do ecossistema por meio de técnicas e métodos laboratoriais e de campo (Sisinno & Filho, 2013). Em suma, esses estudos verificam o estado de um ecossistema, visando a sua sustentabilidade e ainda podem impedir a progressão da degradação ambiental ao destacar sintomas de exposição a agentes danosos (Hellou, 2011).

Para a realização de estudos ecotoxicológicos em ambientes aquáticos, muitos organismos são usados como bioindicadores para se entender a relação da causa/efeitos dos poluentes nesses ecossistemas (Silva *et al.*, 2003). Ainda que alguns elementos possam ter origem natural, o meio aquático constitui um importante receptáculo temporário ou final de contaminantes que podem vir do ar, solo e descargas de efluentes (Sisinno & Filho, 2013). Assim, a poluição de diferentes ambientes, mesmo terrestres, exerce forte impacto à biota aquática.

No caso dos peixes e outros animais aquáticos, a contaminação das espécies geralmente ocorre de três maneiras: pelo contato direto através da parede do corpo, ingestão de partículas contaminadas e através de superfícies respiratórias, como as brânquias (Geffard *et al.*, 2003).

Diante disso, muitos organismos são estudados para se avaliar a exposição, efeitos e susceptibilidade às substâncias tóxicas presentes na água (Amorim, 2003). Dentre eles, destacam-se como possíveis bioindicadores ambientais, macroinvertebrados bentônicos, anfíbios e os peixes (Silva *et al.*, 2003).

Compostos orgânicos e inorgânicos potencialmente tóxicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e metais) são liberados nos ambientes aquáticos por fontes naturais e/ou antropogênicas e tendem a ser adsorvidos por partículas em suspensão que, por sua vez, acumulam-se nos sedimentos (Readman *et al.*, 2002). Assim, as concentrações de contaminantes dos sedimentos tendem a apresentar níveis superiores àquelas da coluna de água (Araújo *et al.*, 2006). Nesse sentido, organismos bentônicos encontram-se em exposição direta aos contaminantes podendo sofrer os efeitos adversos desses compostos (Chapman & Anderson, 2005; Mozeto *et al.*, 2006). Portanto, a ocupação dos nichos entre o sedimento e a água e da água intersticial torna os organismos bentônicos peças-chave na dinâmica de disponibilização e dispersão de poluentes nos sedimentos (Snelgrove, 1998; Wild *et al.*, 2004).

Em particular, ao selecionar os peixes como bioindicadores, é igualmente importante definir qual tecido ou células devem ser investigadas no organismo modelo que sirvam como biomarcadores eficientes. Esse termo é definido como um indicador biológico que evidencia o efeito da exposição a um estressor, interpretado como um evento adaptativo não patogênico ou como uma séria alteração em um evento funcional, dependendo da toxicocinética e do mecanismo de ação do estressor (Decaprio, 1997).

De fato, muitos trabalhos de análise genotoxicológica têm utilizado eritrócitos de peixes para detectar mutações cromossômicas (Silva, *et al.*, 2003). Essas análises são justificadas por algumas particularidades desses organismos, pois eles passam toda a vida em meio aquático, permitindo uma avaliação biológica bastante eficiente de ondas tóxicas tanto agudas quanto intermitentes de lançamentos crônicos contínuos (De Pauw & Vanhooren, 1983).

Outra vantagem da ictiofauna é atribuída ao seu papel na alimentação humana, tendo em vista que os peixes constituem uma excelente fonte de proteína (Silva *et al.*, 2003) tanto para as comunidades ribeirinhas como para mercados consumidores distantes do ponto focal da poluição. Assim, a contaminação e a toxicidade por poluentes em peixes assumem um caráter relevante adicional à saúde pública (Abdel-Moneim *et al.*, 2012), pois esses recursos alimentares representam uma rota de exposição a compostos potencialmente tóxicos (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Em muitos países que utilizam peixes marinhos e moluscos na sua dieta

alimentar, estes se constituem frequentemente grandes acumuladores de altas concentrações de um agente genotóxico como o metil-mercúrio, colocando em risco a saúde tanto do ecossistema como da população humana (Silva *et al.*, 2003).

Adicionalmente, muitas espécies de peixes ocupam níveis tróficos distintos e podem mostrar os efeitos da biomagnificação e bioacumulação de um determinado poluente, especialmente aquelas de topo de cadeia alimentar (Jesus *et al.*, 2014). Assim, essas espécies podem ser usadas para estimar efeitos danosos de substâncias químicas em humanos, já que quanto mais elevado for o nível trófico afetado pela concentração de um contaminante maior o risco desse composto ser perigoso também para as pessoas (Silva *et al.*, 2003). Muitas vezes, o homem ocupa o topo da cadeia trófica por causa da biomagnificação, as pessoas podem acumular altos níveis de compostos tóxicos do meio ambiente (Baird, 2002; Tabari *et al.*, 2010).

Mesmo tendo tais organismos como referência, deve-se considerar também que a rota de entrada, duração e frequência da exposição aos xenobióticos, bem como diferenças genéticas e metabólicas intra e interespecíficas, fazem com que a biodisponibilidade de contaminantes varie nos tecidos e células (Al-Sabti, 2000; Amorim, 2003). Ou seja, uma exposição ambiental similar pode provocar respostas distintas entre os organismos.

2.4. Alterações morfológicas nucleares associadas à genotoxicidade em peixes

Nas últimas décadas tem crescido o interesse da comunidade científica em conhecer e controlar os agentes ambientais que comprometem a saúde humana bem como a sustentabilidade dos ecossistemas. Durante os anos 50 e 60, a genética e a ecologia uniram-se para desenvolver os primeiros testes rápidos de toxicidade, hoje amplamente utilizados em estudos ambientais na busca de substâncias químicas que afetam o genoma (Silva *et al.*, 2003).

Contudo, devido à complexidade das misturas originadas da contaminação aquática, a análise química da água, usualmente empregada pelos órgãos governamentais de controle de qualidade, pode não ser suficiente para descrever os efeitos adversos dessas misturas nos ambientes contaminados (Abdel-Moneim *et al.*, 2012). Em contrapartida, os testes de ecotoxicidade com biomonitores ou bioindicadores reduzem essa limitação, complementando o resultado das análises físico-químicas pela avaliação dos efeitos da presença de contaminantes nos seres vivos (Costa *et al.*, 2008).

Os peixes, assim como outros animais, possuem mecanismos metabólicos de

biotransformação de xenobióticos. Porém, a atividade clastogênica de um contaminante pode contribuir para doenças genéticas, teratogênese e carcinogênese (Al-Sabti, 2000). Peixes oriundos de corpos de água que recebem efluentes urbanos apresentam ocorrência crescente de danos ao DNA proporcional à quantidade de despejos na água (Andrade *et al.*, 2004). Quando esses danos genéticos ocorrem, reações destrutivas (apoptose) e efeitos indesejáveis se iniciam a nível celular, podendo ascender para o nível tecidual ou sistêmico (Erbe *et al.*, 2011). Desse modo, os biomarcadores genéticos são importantes para a avaliação do impacto de poluentes em organismos aquáticos, mesmo que estes sejam aparentemente saudáveis (Anbumani & Mohankumar, 2012).

Diversas são as técnicas laboratoriais empregadas em monitoramento de mutagenicidade, mas é importante destacar que sua utilização tem que atender não apenas ao objetivo do trabalho, mas perceber se as condições laboratoriais permitem desenvolver a técnica fielmente. Para isso, muitas vezes são utilizados estudos genotóxicos *in vitro* e *in vivo* (Silva *et al.*, 2003). Dentre outros, o teste de micronúcleo é um dos mais difundidos por apresentar algumas vantagens tais como sua simplicidade, baixo custo e sensibilidade rápida aos impactos ambientais (Heddle, 1973). Assim, a análise de células com micronúcleos e outras alterações na morfologia nuclear pode indicar uma resposta positiva da exposição de um organismo vivo a químicos genotóxicos que agem direta e/ou indiretamente (Al-Sabti, 2000; Arkhipchuk & Garanko, 2005).

O micronúcleo (MN) é um núcleo distinto e claramente menor que o núcleo celular principal, encontrado em qualquer tipo de célula e formado pela condensação de fragmentos de cromossomos ou por cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. O surgimento do micronúcleo implica em perda de cromátides ou cromossomos que podem ser deslocados durante a prófase ou anáfase (Heddle, 1973; Schiffmann & De Boni, 1991; Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Silva *et al.*, 2003). Os micronúcleos podem se formar como parte do processo natural, mas também após exposição a algum agente mutagênico, representando danos ao DNA (Heddle *et al.*, 1973).

Em peixes, o teste do micronúcleo é normalmente realizado em eritrócitos, por serem células continuamente renovadas com tempo médio de vida de aproximadamente 100 dias, indicando uma exposição aguda e que os efeitos da contaminação no organismo são relativamente contemporâneos ao período amostrado (Silva *et al.*, 2003; Strunjak-Perovic *et al.*, 2009; Anbumani & Mohankumar, 2012). Outras anormalidades também podem ser identificadas nos núcleos por esse teste, a exemplo da formação de entalhes, brotos nucleares,

núcleos lobados, vacúolos e binúcleos. No entanto, a ocorrência de tais alterações nucleares indica mudanças genômicas estruturais (Anbumani & Mohankumar, 2012; Çavas & Ergene-Gözükara, 2003). E tem sido relacionada à uma exposição ambiental potencialmente genotóxica como observado em eritrócitos de peixes marinhos por vários autores (StrunjakPerovic *et al.*, 2009; Barsienè *et al.*, 2015).

Assim, a análise de efeitos genotóxicos em peixes é adequada para avaliar a exposição a contaminantes capazes de promover alterações genéticas e as consequências do contato com tais substâncias, mesmo em concentrações relativamente baixas (Ansari *et al.*, 2011). Alguns desses aspectos são considerados a seguir.

2.5. Estudos genotóxicos em peixes

A análise genotóxica usual em ecotoxicologia para avaliar alterações da organização genômica e cromossômica (clastogenicidade) ou sequências de DNA (mutagenicidade) causadas por agentes tóxicos (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Porém, o grau de sensibilidade da genotoxicidade em peixes a xenobióticos depende de vários fatores com destaque para: comportamento da espécie (populações residentes ou de ampla dispersão), uso do habitat (bentônico ou pelágico) e posição na cadeia trófica (consumidores primários, secundários até predadores de topo) (Ergene *et al.*, 2007; Tabari *et al.*, 2010).

A despeito dessa variação, as análises de genotoxicidade em peixes são consideradas um indicador eficiente de poluição. Conforme observado em robalos do estuário da Cananéia e São Vicente em São Paulo (Kirschbaum *et al.*, 2009), esses animais apresentam correlação normalmente elevada e positiva com a contaminação ambiental. Os efeitos genotóxicos em peixes podem se manifestar pela presença de alterações nucleares, facilmente mensuráveis e de grande significado para a toxicidade dos organismos e comunidades.

Além do mais, as respostas genotóxicas e de mutagenicidade estão muito relacionadas à sensibilidade que esses organismos refletem aos poluentes mesmo em pequenas concentrações (Sanches-Galan *et al.*, 1998). Por exemplo, trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a doses relativamente baixas do composto genotóxico ciclofosfamida apresentaram um aumento da ocorrência de micronúcleo e das demais alterações nucleares (Ayllo'n & Garcia, 2000).

Em estudos similares, porém com peixes de água doce, todas as alterações nucleares foram encontradas simultaneamente e com maior frequência nos pontos mais próximos das áreas urbanas em rios da Bahia, nordeste do Brasil (Jesus *et al.*, 2016). Dessa forma, observa-

se que uma longa exposição desses animais aos poluentes geram danos genéticos correlacionados positivamente, tendo como resultado uma maior frequência de alterações nucleares (Osman *et al.*, 2010; Jesus *et al.*, 2016).

Em contrapartida, espécies aparentemente mais tolerantes à poluição ambiental como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) não revelaram efeitos nocivos (com a presença de alteração morfológica nuclear-AMN) dos contaminantes (Jesus *et al.*, 2016). Assim, a eficácia dos estudos genotóxicos para o biomonitoramento ambiental de ecossistemas aquáticos depende de escolha dos organismos para as análises, os quais devem ser representativos da área em estudo e suficientemente sensíveis a distúrbios ambientais (De Pauw & Vanhooren, 1983).



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de alterações genotóxicas em três espécies de peixes bentônicos (*B. soporator*, *S. testudineus* e *O. vespertilio*) que ocupam nichos diferenciados em áreas da BTS que sofrem efeitos antrópicos de moderados a acentuados e relacionar estes dados com a presença de xenobióticos a fim de fornecer um panorama sobre a poluição destes ecossistemas.

3.2. Objetivos específicos:

- 1 - Determinar a frequência de micronúcleos e outras alterações morfológicas nucleares em três espécies abundantes na Baía de Todos os Santos e com diferentes níveis tróficos;
- 2 - Avaliar quais espécies podem ser utilizadas como bioindicadoras de contaminação ambiental na Baía de Todos os Santos, relacionando aspectos ecológicos de cada espécie com níveis de danos ao DNA em cada localidade;

4. METODOLOGIA

4.1. Área de estudo

Os espécimes de peixes foram coletados em pontos da Baía de Todos os Santos, considerando diferentes cenários de vulnerabilidade ambiental. Esses pontos foram definidos em ordem decrescente de degradação (Figuras 1 e 2) e incluem:

(1) Baía da Ribeira ($12^{\circ}55'S$ $38^{\circ}30'O$) localidade com considerável degradação ambiental (CRA, 2001), seus impactos são decorrentes principalmente de passivo de esgoto orgânico doméstico muito severo, bem como das inúmeras atividades industriais (que liberam produtos químicos orgânicos e inorgânicos) e das petrolíferas (Hatje & Andrade, 2009);

(2) Baía de Aratu ($12^{\circ}48'S$ $38^{\circ}28'W$) desde a década de 60 que tal localidade sofre impactos decorrentes dos lançamentos de efluentes domésticos (Silva *et al.*, 2016) e industriais (Araujo, *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016), além desses, outras são frequentes, tais como, intensas atividades portuárias (Rocha *et al.*, 2012) e também com processo de dragagem (Rocha *et al.*, 2016);

(3) Estuário do rio Paraguaçu ($12^{\circ}32'08''S$ $39^{\circ}11'27''W$) conta com uma extensa área de manguezal (Pereira *et al.*, 2015), que fornece principal fonte de renda para as comunidades ribeirinhas e com acentuada pressão pesqueira (Barros *et al.*, 2008). Algumas atividades antropogênicas têm comprometido a qualidade desse sistema estuarino, que incluem atividades agrícolas, industriais, de mineração e as domésticas (CRA, 2004), apesar de tal aspecto, não apresenta contaminação grave aparente;

(4) Estuário do rio Jaguaripe ($13^{\circ}06'48''S$ $38^{\circ}53'44''W$) ambiente com menor influência antropogênica em relação aos anteriores, apresenta áreas de manguezais bem preservados (Hatje & Barros, 2012; Krul *et al.*, 2014) e geralmente em seus sedimentos possuem baixas concentrações de metais quando comparados a outros sistemas estuarinos da BTS (Hatje & Barros, 2012).

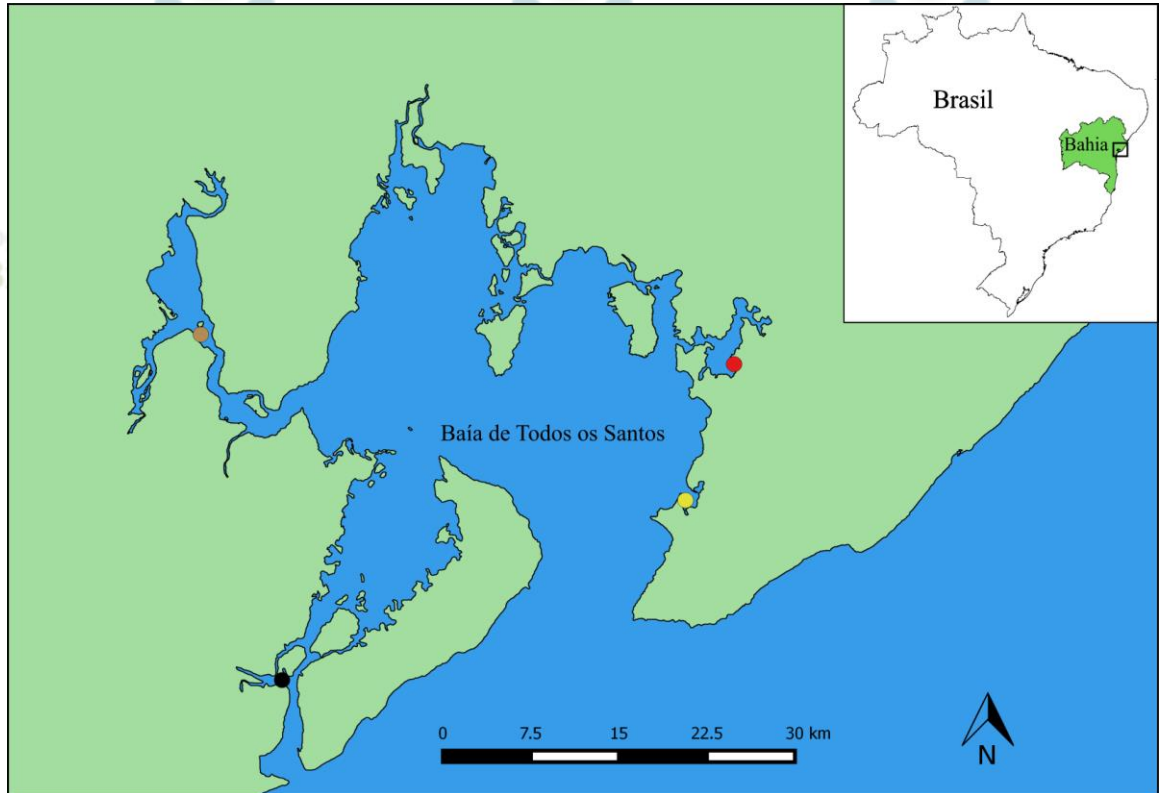


Figura 1. Localidades amostradas na Baía de Todos os Santos, Bahia: Baía da Ribeira (amarelo), Baía de Aratu (vermelho), estuário do rio Paraguaçu (marrom), estuário do rio Jaguaripe (preto).



Figura 2. Pontos de coleta de espécimes para estudos genotóxicos: Baía de Aratu (A); Baía da Ribeira (B); Estuário do rio Paraguaçu (C); Estuário do rio Jaguaripe (D).

4.2. Espécies estudadas

Foram estudadas três espécies de peixes bentônicos compreendendo diferentes famílias e ordens, diferindo entre si pelo uso do habitat, importância na pesca artesanal e nível trófico, como explicitado a seguir:

1) *Sphoeroides testudineus* (baiacu): Essa espécie é frequente em áreas estuarinas rasas e compõem boa parte da biomassa desses ecossistemas. Esse peixe da ordem Tetraodontiformes, família Tetraodontidae, é uma espécie carnívora se alimentando basicamente de invertebrados associados ao substrato e desempenha um papel trófico relevante em comunidades de peixes estuarino-residentes (Figueiredo & Menezes, 2000) (Figura 3b).

2) *Ogcocephalus vespertilio* (peixe-morcego): Representante da ordem Lophiiformes, família Ogcocephalidae, essa espécie tem ampla distribuição na costa brasileira, habitando desde águas rasas até grandes profundidades (mais de 100 m) (Cavalcanti & Lopes, 1998). É uma espécie bentônica que se desloca pelo substrato com auxílio das nadadeiras peitorais e pélvicas adaptadas, possuindo pouca capacidade natatória. É um peixe predador que se alimenta de invertebrados e pequenos peixes. Atingem até 28 cm (Figueiredo & Menezes, 1978) (Figura 3a).

3) *Bathygobius soporator* (maria-da-toca, amboré): Essa espécie de pequeno porte (até cerca de 15 cm) da família Gobiidae, ordem Perciformes, é extremamente tolerante a variações de salinidade e temperatura, habitando os ambientes estuarinos da costa americana tropical, tanto do oceano Atlântico como do Pacífico (Menezes & Figueiredo, 1985). São adaptados a substratos arenosos e rochosos, com as nadadeiras pélvicas unidas em forma de disco que ajudam na fixação dos espécimes, sendo abundantes em poças de maré. Não apresentam valor comercial e são onívoros, comportando-se como predadores oportunistas de pequenos crustáceos e larvas de peixes (Lopes & Oliveira-Silva, 1998) (Figura 3c).

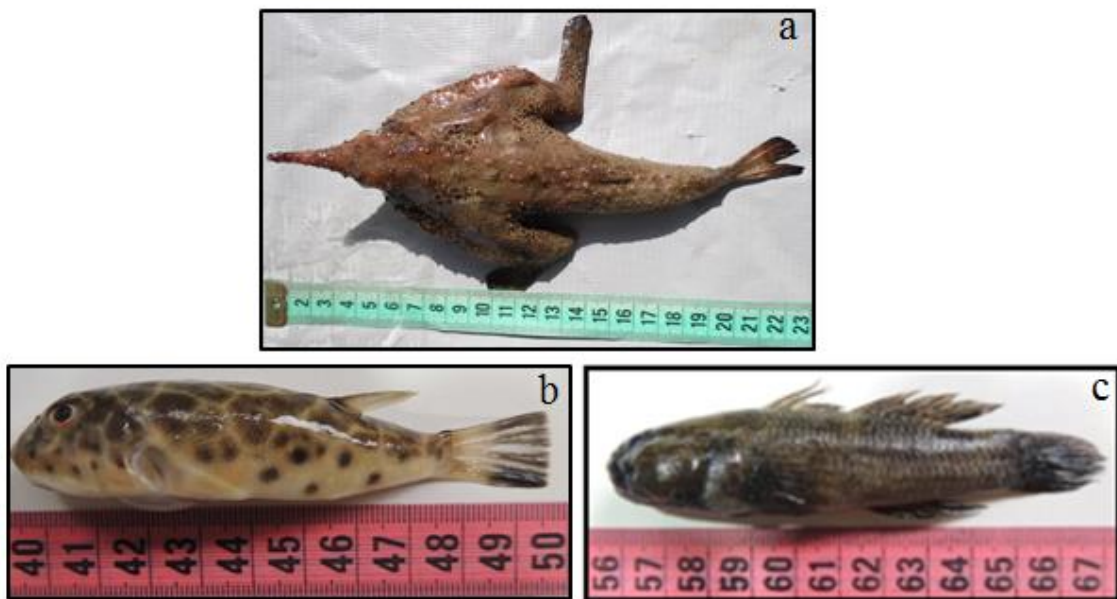
Foram realizadas 8 expedições para obtenção das espécies estudadas nas diferentes localidades da BTS (Baía de Aratu, Baía da Ribeira, estuários do rio Paraguaçu e Jaguaripe).

A amostragem total de indivíduos analisados por espécie para cada ponto coletado variou de 5 a 10 espécimes, com valor modal de 10 amostras por localidade (Tabela 1). Os espécimes foram coletados com diferentes petrechos de pesca (rede de arrasto, anzol e puçá).

Vale salientar que a coleta das espécies para todas as localidades atendeu ao CEUA, IBIO, UFBA, 23/2015 quanto aos aspectos éticos, que regulamenta pesquisas envolvendo seres vivos.

Tabela 1. Total de peixes analisados por espécie/ ponto coletado ao longo da BTS.

Espécies	Aratu	Ribeira	Paraguaçu	Jaguaripe	Total
<i>S. testudineus</i>	10	10	10	10	40
<i>B. soporator</i>	10	8	10	10	38
<i>O. vespertilio</i>	5	10	6	7	28
Total	25	28	26	27	106

**Figura 3.** Representação das espécies estudadas em estuários da Baía de Todos os Santos. *Ogcocephalus vespertilio* (a); *Sphoeroides testudineus* (b) e *Bathygobius soporator* (c).

4.3. Análises genotoxicológicas

As alterações genotoxicológicas foram avaliadas pelo teste do micronúcleo písceo para detecção de alterações morfológicas nucleares (AMN) tais como micronúcleo, núcleo lobado, vacúolos, binúcleos, lóbulos, bulbos e entalhes nucleares (Çavas, 2008). Para tal, amostras de sangue (0,5 – 1,0 mL) foram colhidas por punção da veia caudal de cada indivíduo logo após a coleta usando seringas descartáveis e heparina como anticoagulante.

O material coletado foi processado em campo, no entanto, uma gota de sangue foi colocada sobre lâmina previamente limpa e mantida em etanol 95% até o momento do uso. O esfregaço foi feito com arraste do sangue da lâmina com lamínula. Após secagem ao ar por cerca de 12 horas, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto durante 20 minutos.

As lâminas foram preparadas de acordo com o protocolo de Heddle (1973) e Schmid (1975), usando coloração com Giemsa a 10% por 20 minutos. Para cada indivíduo, foram

preparadas três lâminas para contagem e observação de 1.000 núcleos em cada, sob aumento de 1.000 vezes em microscópio ótico, totalizando 3.000 núcleos por indivíduo. Nesse processo, foi estabelecida a frequência de AMN. Cada tipo de alteração encontrada por espécie foi fotografada em fotomicroscópio de epifluorescência Olympus BX51, com sistema digital de captura de imagens (Image Pro Plus, Media Cybernetics). No entanto, os valores absolutos encontrados e as proporções (%) de cada AMN por espécie e por local de coleta foram discriminadas na Tabela 2.

4.4. Análises estatísticas

Por representarem dados não paramétricos (pois não representam distribuição normal dos dados), as frequências obtidas de micronúcleos e demais alterações nucleares foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls ao nível de significância de 5%, com o software BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). O objetivo desses testes foi verificar possíveis diferenças na ocorrência das alterações nucleares entre os peixes de mesma espécie nos diferentes pontos e entre os indivíduos de espécies diferentes coletados no mesmo local.

Outras análises foram realizadas para verificar quais alterações nucleares (micronúcleo, entalhes, binúcleos, brotos nucleares e núcleos lobados) nos eritrócitos das espécies estudadas melhor explicariam a presença das AMN por espécie e por localidade e entre as espécies nas diferentes localidades. Dessa forma, foi realizada a Análise de Componentes Principais (ACP) a partir da matriz de correlação e os gráficos biplot no software PAST v. 2.17c (Hammer *et al.*, 2001). Gráficos também foram desenvolvidos usando o pacote de Heatmap (BIBLIO) do software R, representando as distâncias euclidianas médias e o agrupamento (10000 simulações) através da ligação completa entre as localidades e para todas as espécies.

5. RESULTADOS

5.1. Análises genotoxicológicas

Todas as alterações morfológicas nucleares foram frequentes em eritrócitos de *Bathygobius saporator*, *Ogcochepalus vespertilio* e *Sphoeroides testudineus* (Figura 4).

Porém, as frequências de AMN diferiram entre indivíduos de cada espécie e dos diferentes pontos da BTS (Tabela 2).

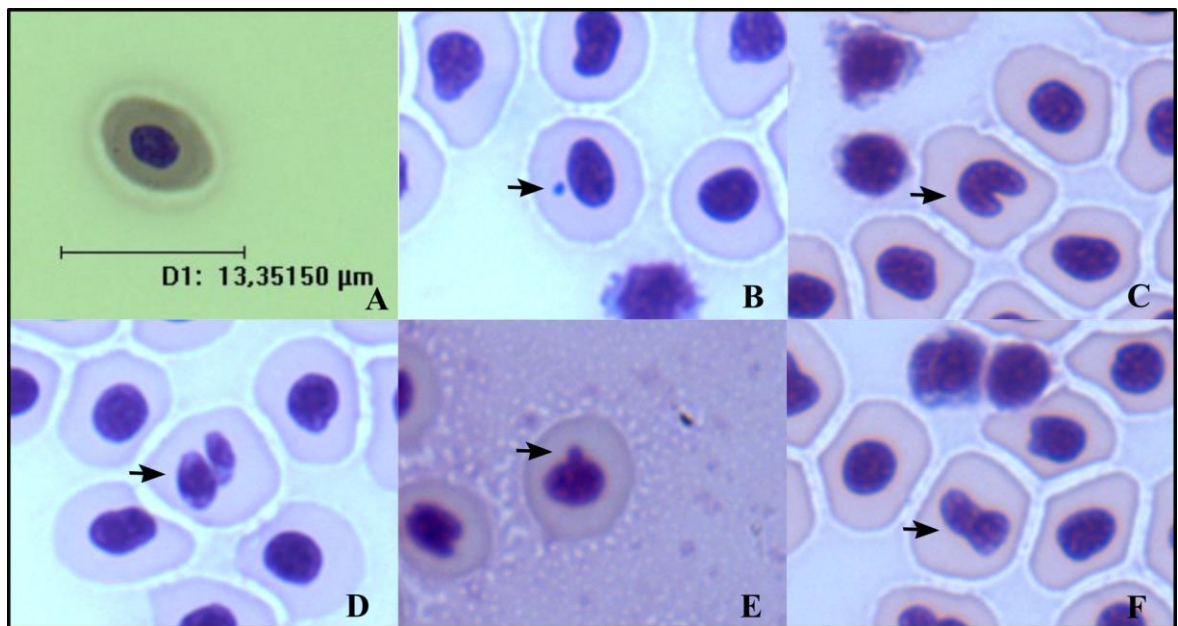


Figura 4. Alterações morfológicas nucleares (AMN) em eritrócitos das espécies estudadas: (A) hemácia normal (B) micronúcleo; (C) núcleo entalhado; (D) célula binucleada; (E) broto nuclear; (F) núcleo lobado.

Em exemplares de *S. testudineus* os maiores valores totais de AMNs foram encontradas em eritrócitos de espécimes coletados nas localidades de Aratu e Ribeira (1,9 e 1,8%, respectivamente) ao contrário das localidades de Paraguaçu e Jaguaripe (0,03 e 0,04 %, respectivamente). As AMNs mais representativas para todas as localidades foram brotos nucleares e entalhes (Tabela 2). De modo similar em *B. saporator*, as maiores frequências totais estão também atribuídas a Aratu (1,3%) e Ribeira (1,4%), enquanto que menores frequências são observadas em amostras dos estuários do rio Paraguaçu (0,7%) e Jaguaripe (0,8%). No geral as alterações mais predominantes para todas as localidades foram micronúcleos, entalhes, broto nuclear e núcleo lobado (Tabela 2). Em contrapartida em *O. vespertilio* foi a espécie que apresentou as menores frequências de AMN para todas as localidades em relação às demais espécies selecionadas. No entanto, a maior frequência total observada foi para a localidade de Ribeira (0,3%), diferindo das demais localidades Aratu

(0,04%), Paraguaçu (0,03%) e Jaguaripe (0,03%), com frequências inferiores. Em geral as alterações nucleares mais representativas para todas as localidades foram broto nuclear, entalhe e núcleos lobados (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências de alterações morfológicas nucleares em *S. testudineus*, *B. saporator* e *O. vespertilio* por ponto coletado na Baía de Todos os Santos.

	Aratu		Ribeira		Paraguaçu		Jaguaripe		
	Na	Fr (%)	Na	Fr (%)	Na	Fr (%)	Na	Fr (%)	
<i>S. testudineus</i>	Micronúcleo	41	7,03%	40	7,42%	06	6,25%	9	6,77%
	Binúcleo	09	1,54%	02	0,37%	0	0%	0	0%
	Broto nuclear	204	35,0%	52	9,65%	25	26,0%	38	28,5%
	Entalhes	251	43,0%	383	71,0%	55	57,2%	76	57,15%
	Lobadas	78	13,3%	62	11,5%	10	10,4%	10	7,51%
	Total AMN/%	583/30000 (1,9%)		539/30000 (1,8%)		96/30000 (0,03%)		133/30000 (0,04%)	
<i>B. saporator</i>	Micronúcleo	109	28,7%	44	13,4%	04	1,75%	21	8,43%
	Binúcleo	08	2,11%	02	0,61%	01	0,44%	0	0%
	Broto nuclear	42	11,0%	64	19,5%	19	8,33%	43	17,2%
	Entalhes	122	32,2%	190	57,9%	177	77,6%	165	66,2%
	Lobadas	98	25,8%	28	8,54%	27	11,8%	20	8,03%
	Total AMN/%	379/ 30000 (1,3%)		328/28000 (1,4%)		228/30000 (0,7%)		249/30000 (0,8%)	
<i>O. vespertilio</i>	Micronúcleo	06	8,96%	07	6,86%	05	8,07%	10	15,16%
	Binúcleo	07	10,4%	0	0%	0	0%	0	0%
	Broto nuclear	24	35,8%	31	30,4%	18	29,0%	20	30,3%
	Entalhes	19	28,3%	50	49,0%	26	41,9%	28	42,4%
	Lobadas	11	16,4%	14	13,7%	13	20,9%	08	12,2%
	Total AMN/%	67/15000 (0,04%)		102/ 30000 (0,3%)		62/18000 (0,03%)		66/21000 (0,03%)	

Nota: Na (número absoluto de cada AMN); Fr (%) (Frequencia de cada AMN); AMN (alteração morfológica nuclear); *S. testudineus* (30000 núcleos analisados todas as localidades); *B.saporator* (30000 núcleos, exceção Ribeira (28000)); *O. vespertilio* (30000 núcleos, exceção Aratu (15000); Paraguaçu (18000) e Jaguaripe (21000)).

Os testes de Kruskal-Wallis e de Student-Newman-Keuls revelaram diferenças significativas ($p < 0,01$) na ocorrência de AMN apenas em eritrócitos de *S. testudineus* (Tabela 3), considerando as localidades de maior impacto (Aratu e Ribeira) em relação as de menor impacto (Paraguaçu e Jaguaripe). Em contrapartida, as frequências de alterações nucleares

não foram significativamente diferentes entre as localidades em *B. saporator* e *O. vespertilio*. Quanto às frequências de AMN entre indivíduos de espécies distintas, mas coletadas no mesmo ponto amostral, também são importantes para inferir quais espécies e/ou alterações podem melhor responder ao impacto da qualidade ambiental (Tabela 4). No entanto, em amostras das localidades da Baía de Aratu e Ribeira, mostraram diferenças significativas para as espécies de *S. testudineus* e *B. saporator* em relação a *O. vespertilio*. Em contrapartida, para os estuários do rio Paraguaçu e Jaguaripe *B. saporator* mostrou diferenças nas frequências de AMN (alterações morfológicas nucleares) entre *S. testudineus* e *O. vespertilio*, respectivamente.

Tabela 3. Teste de Kruskal-Wallis e de Student-Newman-Keuls por espécie/comparando todas as localidades (Aratu, Ribeira, Paraguaçu e Jaguaripe) da BTS estudadas.

Espécies	Localidades			
	Aratu	Ribeira	Paraguaçu	Jaguaripe
<i>S. testudineus</i>	0.01 ^a	0.01 ^b	(a,b)	(a,b)
<i>B. saporator</i>	n/s	n/s	n/s	n/s
<i>O. vespertilio</i>	n/s	n/s	n/s	n/s

Nota: (a,b) significativo ($p < 0.05$); n/s= não significativo $p > 0.05$

Tabela 4. Teste de Kruskal-Wallis e de Student-Newman-Keuls por ponto (Aratu, Ribeira, Paraguaçu e Jaguaripe) da BTS comparando todas as espécies (*S. testudineus*, *B. saporator* e *O. vespertilio*).

Localidades	Espécies		
	<i>S. testudineus</i>	<i>B. saporator</i>	<i>O. vespertilio</i>
Aratu	0.01 ^a	0.05 ^b	(a,b)
Ribeira	0.01 ^c	0.01 ^d	(c,d)
Paraguaçu	0.05 ^e	0.05 ^e	n/s
Jaguaripe	0.05 ^f	n/s	0.05 ^f

Nota: (a,b,c,d,f) significativo $p < 0.05$; n/s= não significativo $p > 0.05$

As análises de Componentes Principais e do Heatmap seguem comparativamente visando cada espécie (*S. testudineus*, *B. saporator* e *O. vespertilio*) em função de todas as localidades estudadas da BTS (Aratu, Ribeira, Paraguaçu e Jaguaripe) a fim de verificar as possíveis relações entre tais localidades, considerando a variação nos níveis de alterações nucleares encontradas nessas espécies.

No entanto, a Análise de Componentes Principais (ACP) gerada para *S. testudineus* em relação a todos os pontos (Aratu, Ribeira, Paraguaçu e Jaguaripe) indicou a existência de dois componentes principais que explicaram 99,90% da variação total entre as localidades (Figura 5). No primeiro componente (CP1), que explicou 81,97% da variância, encontram-se os

binúcleos foram verificados em amostras de Aratu, enquanto indivíduos da Ribeira apresentaram maior incidência de entalhes. Em geral, níveis mais alto de alterações nucleares estavam relacionados às amostras da Baía de Aratu (Figura 6).

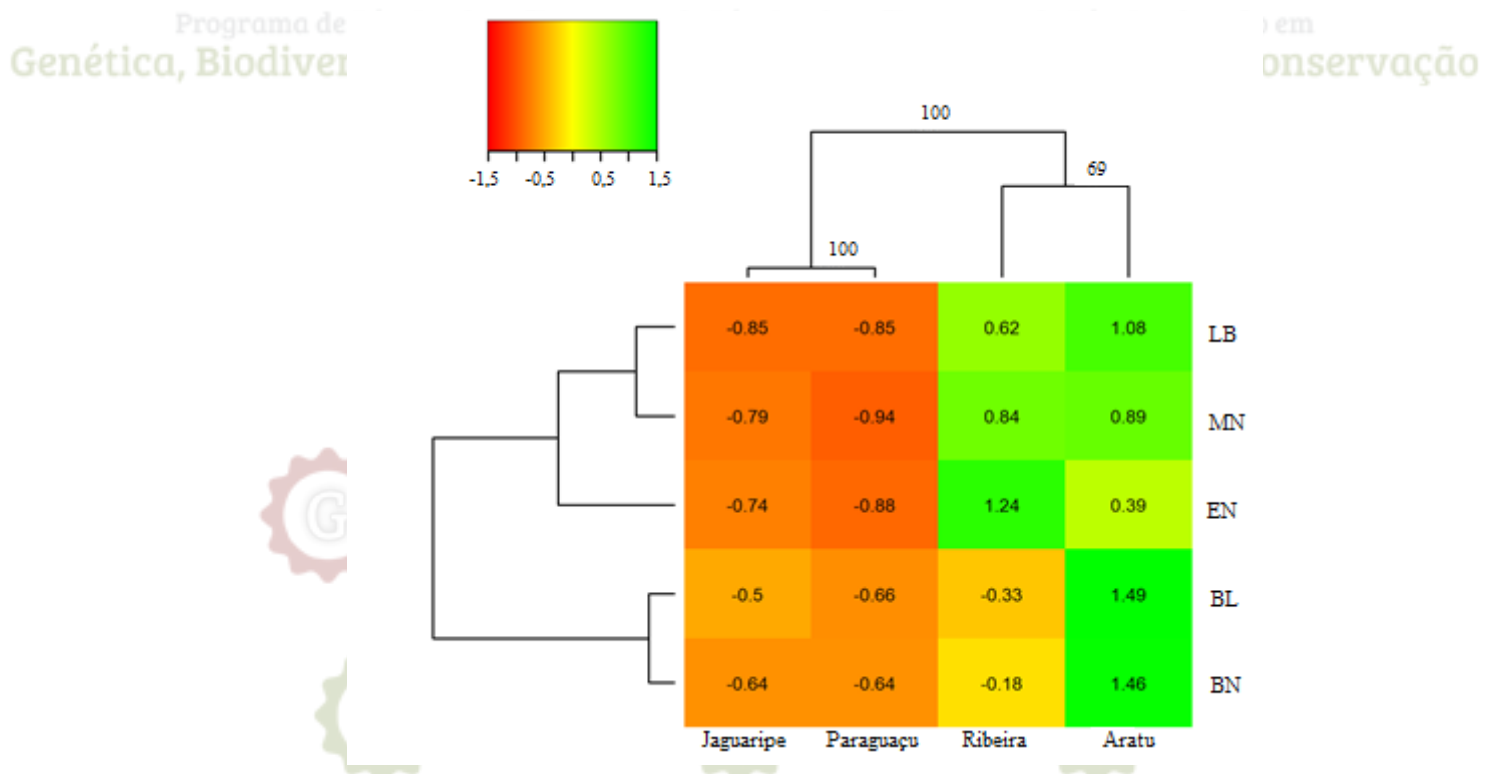


Figura 6. Heatmap e cluster em amostras de *S. testudineus* para todas as localidades (Aratu, Ribeira, Jaguaripe e Paraguaçu). MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: entalhes; LB: lóbulos.

Em *B. sporator*, os dois primeiros componentes explicaram 97,32% da variação total (Figura 7). Assim, para o eixo positivo do CP1, o qual explicou 65,39% da variância, houve a separação da Baía de Aratu em relação às demais localidades, atribuído principalmente a maior contribuição de núcleos lobados. Dentre outras alterações mais influentes para tal variação, destacam-se micronúcleos e binúcleos. Negativamente associadas a este eixo estão Paraguaçu e Jaguaripe que se agrupam entre si com maior proximidade e também com menor associação com as variáveis. Houve maior separação da Baía da Ribeira ainda neste eixo o que pode ser correlacionado à presença de brotos nucleares e núcleos entalhados. Por outro lado, o segundo componente principal (PC2) explicou 31,93% da variação, separando no lado positivo do eixo as amostras da Baía da Ribeira das demais localidades, em função da maior incidência de brotos nucleares. Houve maior separação de Aratu no eixo negativo desse componente, enquanto as amostras de Paraguaçu e Jaguaripe mostraram-se mais associadas (Figura 7).

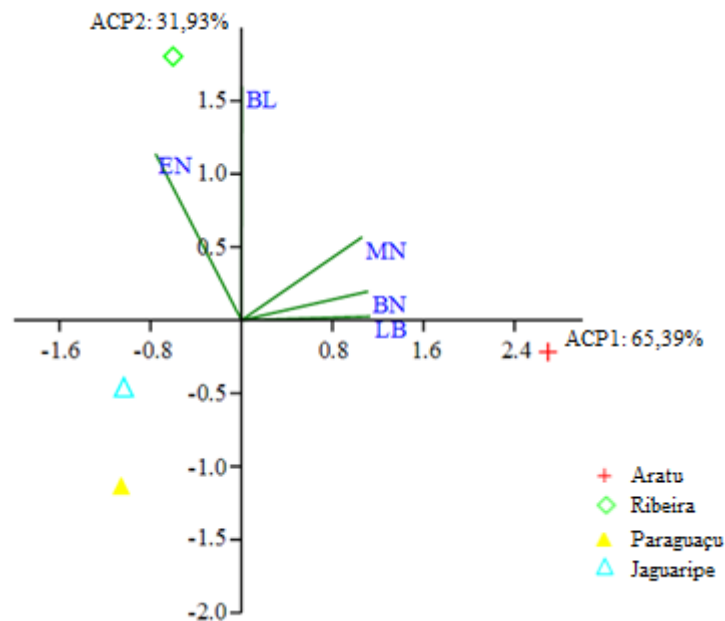


Figura 7. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares encontradas em espécimes de *B. soropator*, avaliadas nas localidades estudadas (pontos) da BTS. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados.

Quanto ao Heatmap gerado a partir dos dados de *B. soropator* evidenciou um agrupamento distinto e fortemente apoiado (100% de *bootstrap*), representado pela amostra de Aratu (Figura 8). A maior distância dos peixes dessa localidade em relação aos demais se deve principalmente pelos altos índices de núcleos lobados, binúcleos e micronúcleos associados em espécimes de Aratu. Em contrapartida, os agrupamentos formados por espécimes de Ribeira + (Jaguaripe + Paraguaçu) foram pouco apoiados (87% e 72%, respectivamente) e relacionados aos menores valores para núcleos lobados, binúcleos e micronúcleos. A amostra de Ribeira para essa espécie foi alocada à parte, diferindo das demais devido aos altos índices de entalhes e brotos nucleares (Figura 8).

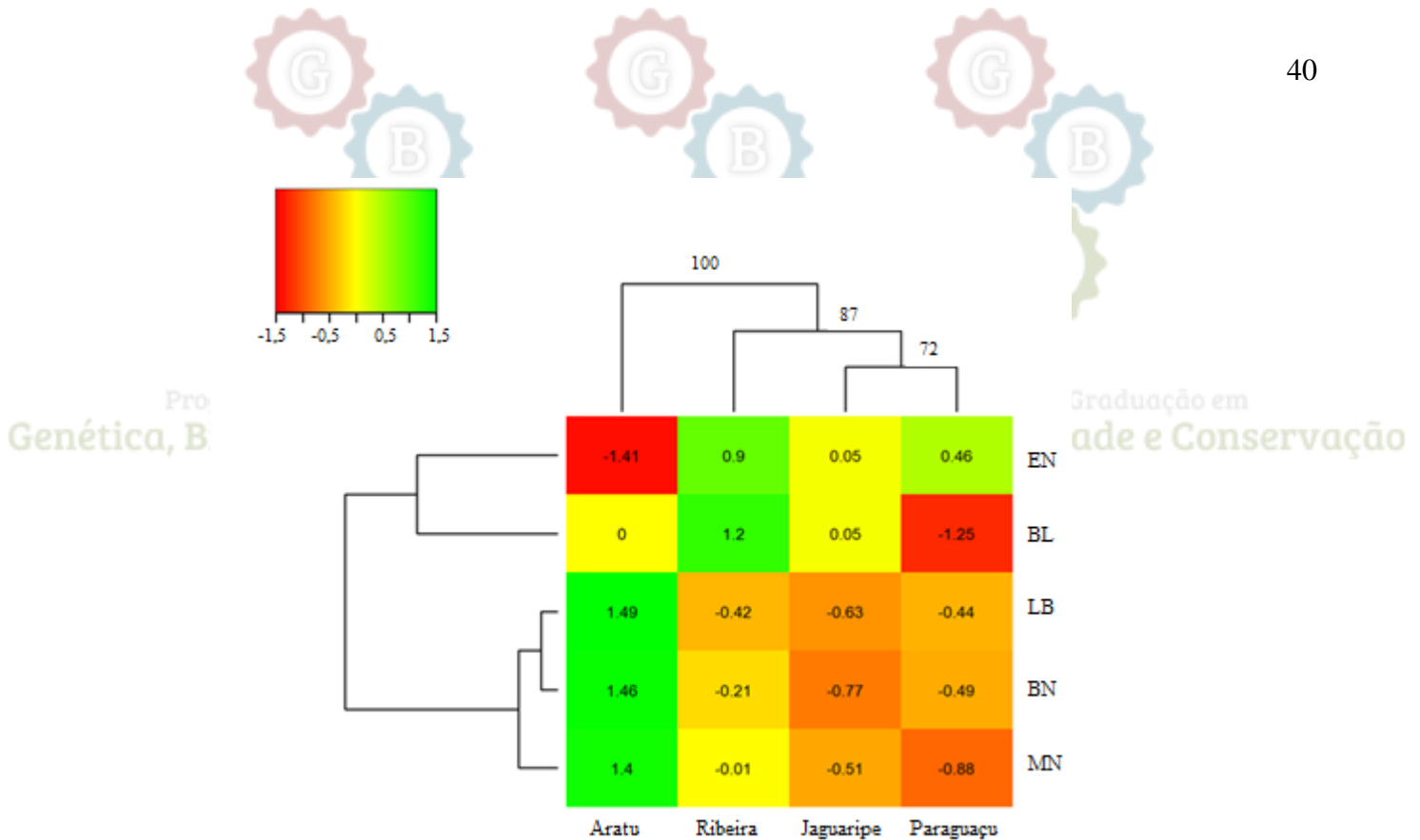


Figura 8. Heatmap e cluster em amostras de *B. soporator* para todas as localidades (Aratu, Ribeira, Jaguaripe e Paraguaçu). MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: entalhes; LB: lóbulos.

A ACP em amostras de *O. vespertilio* revelou a existência de dois componentes que explicaram 91,18% da variância total (Figura 9). O primeiro componente (CP1) explicou 61,07% da variância e apresenta a separação de indivíduos de Aratu (atribuído a maior contribuição de núcleos binucleados e brotos nucleares), positivamente relacionado ao eixo, das demais localidades e com maior correlação com as alterações genotóxicas. Negativamente ao eixo, o estuário de rio Paraguaçu estava mais associado à Baía da Ribeira quanto à frequência de entalhes. As amostras do estuário do rio Jaguaripe foram mais distanciadas dos demais e com menor relação com as variáveis. O CP2 explicou 30,11% da variação, relacionando as amostras da Ribeira e Paraguaçu no eixo positivo devido à predominância de núcleos entalhados e lobados. Ainda nesse eixo, Aratu encontra-se à parte e brotos e binúcleos são os que melhor se relacionam para tal localidade. Negativamente ao eixo, está a amostra de Jaguaripe e com maior correlação com micronúcleos (Figura 9).

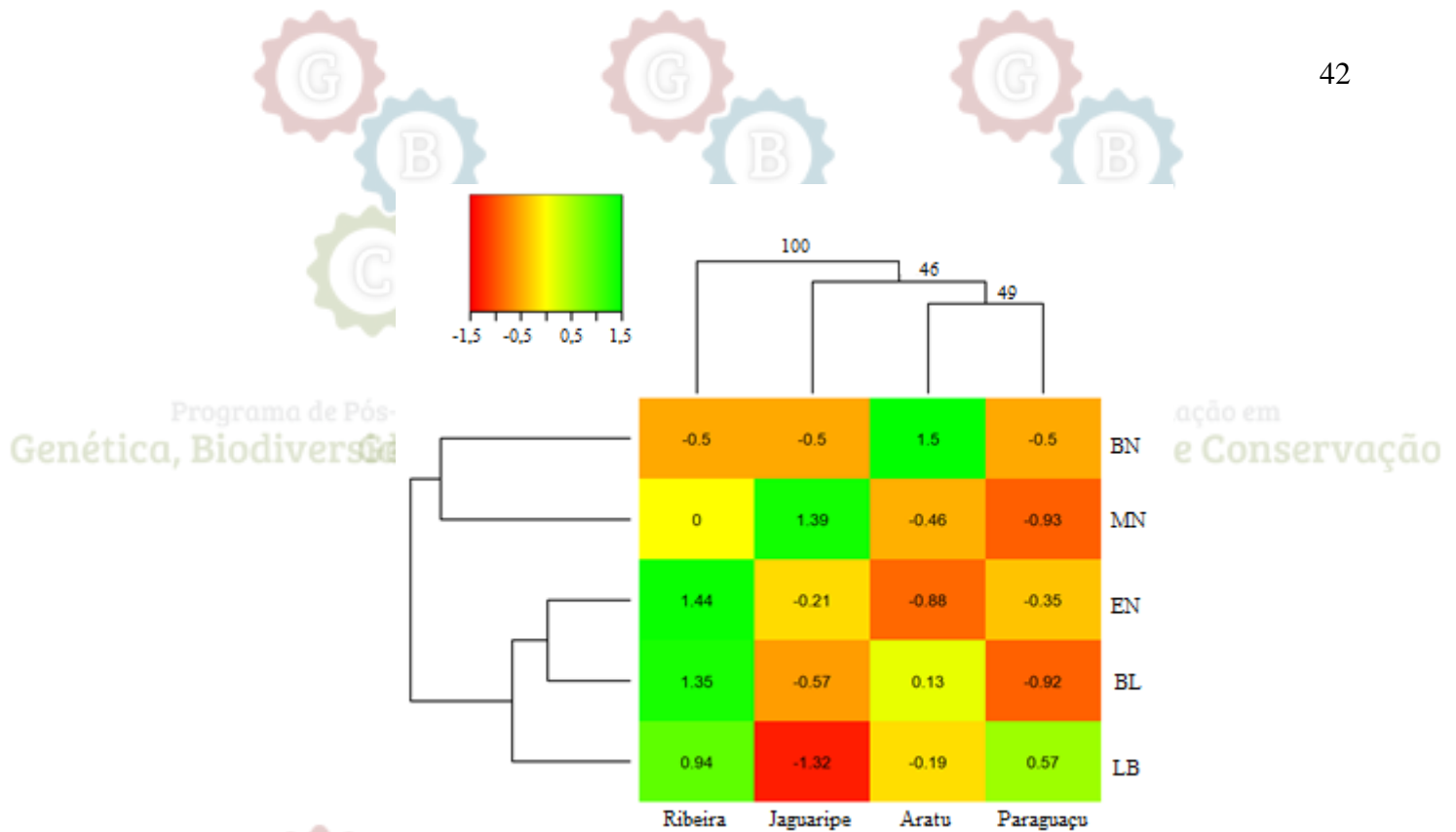


Figura 10. Heatmap e cluster em amostras de *O. vespertilio* para todas as localidades (Aratu, Ribeira, Jaguaripe e Paraguaçu). MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: entalhes; LB: lóbulos.

Também foram realizadas análises de componentes principais entre as espécies coletadas no mesmo ponto a fim de verificar a ocorrência das alterações que melhor explicam o impacto ambiental nesses estuários e quais espécies tem maior correlação com as variáveis.

Em Aratu, a ACP indicou a existência de dois componentes principais que explicaram 99,99% da variância total (Figura 11). No primeiro componente (CP1), que explicou 66,11% da variância, núcleos lobados corresponderam à alteração nuclear de maior contribuição para separar (*S. testudineus* + *B. soporator*) de *O. vespertilio*. No geral, para este componente, as alterações que apresentaram correlação positiva foram broto nuclear e entalhes, ambas mais relacionadas com a espécie *S. testudineus*, enquanto micronúcleos tiveram maior relação com *B. soporator* neste eixo. Por outro lado, núcleos binucleados se relacionaram negativamente com as demais variáveis, estando mais associados a *O. vespertilio*. O segundo componente (CP2) explicou 33,88% da variância e, dentre as variáveis que o compuseram, entalhes, broto nuclear e binúcleos estiveram relacionados positivamente entre si e correlacionados com a espécie *S. testudineus*. Micronúcleos e lóbulos compuseram o escore negativo ao eixo e com maior ligação com *B. soporator*. Todas as variáveis tiveram menor relação com a espécie *O. vespertilio* para ambos os componentes (Figura 11).

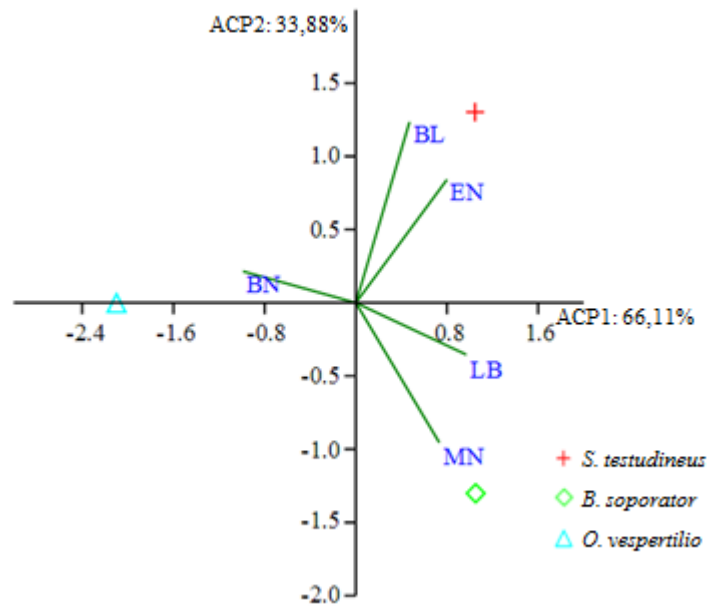


Figura 11. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares encontradas em espécimes de *Bathygobius soporator*, *Sphoeroides testudineus* e *Ogcocephalus vespertilio* para a localidade de Aratu. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados.

No ponto da Ribeira, a PCA gerada indicou a existência de dois componentes principais que explicaram 100% da variância total (Figura 12). O primeiro componente (CP1) explicou 80,89% da variância com a maior contribuição de binúcleos, separando *S. testudineus* + *B. soporator* de *O. vespertilio*. Relacionado ao escore positivo deste componente, estão as alterações de lóbulos e entalhes, ambos mais associados a *S. testudineus*. No entanto, as alterações de micronúcleos e brotos nucleares apresentaram maior correlação com *B. soporator*. A espécie *O. vespertilio* está representada no escore negativo e com nenhuma relação com as variáveis (Figura 12).

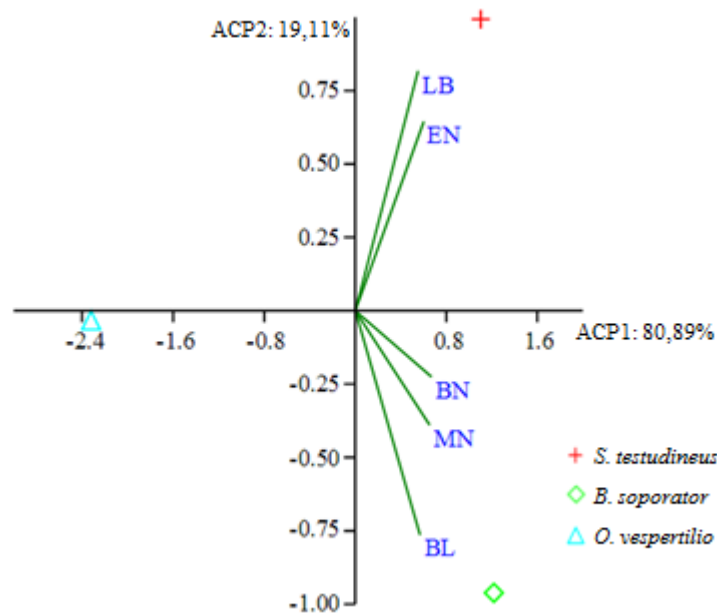


Figura 12. Gráfico biplot de componentes principais das alterações nucleares encontradas em espécimes de *Bathygobius soporator*, *Spherooides testudineus* e *Ogcocephalus vespertilio* para a localidade de Ribeira. MN: micronúcleo; BN: binúcleo; BL: broto nuclear; EN: núcleos entalhados; LB: núcleos lobados.

No estuário do rio Paraguaçu, a PCA indicou a existência de dois componentes principais que explicaram 99,99% da variância total (Figura 13). O primeiro componente (CP1) explicou 82,33% da variância. No entanto, as variáveis de binúcleo e entalhes, ambas positivamente relacionadas, foram as de maior contribuição e responsáveis por separar *B. soporator* das demais espécies (*S. testudineus* e *O. vespertilio*). Das alterações associadas ao escore negativo a esse eixo, estão os micronúcleos e brotos nucleares, mais correlacionados com *O. vespertilio*. Em contrapartida, *S. testudineus* ficou mais distanciado quanto à associação com as variáveis. O segundo componente (CP2) explicou 17,66% da variância e foi representado por todas as alterações nucleares no eixo positivo. As variáveis lóbulos, micronúcleos e entalhes tiveram maior correlação com *B. soporator*, enquanto micronúcleos e brotos nucleares foram mais associados a *O. vespertilio*. A espécie *S. testudineus* apresentou menor associação com todas as alterações (Figura 13).

No ponto de Jaguaripe, a PCA indicou a existência de dois componentes principais que explicaram 100% da variância total (Figura 14). O primeiro componente (CP1) explicou 83,19% da variância. Positivamente a este eixo, as alterações de entalhes e núcleos lobados foram as de maior contribuição, distinguindo *B. soporator* das demais espécies. O segundo componente (CP2) explicou 16,81% da variância e foi composto pelas variáveis brotos nucleares e entalhes, ambos positivamente relacionados a *S. testudineus*. Negativamente ao

6. DISCUSSÃO

A aplicação do teste de micronúcleo permitiu avaliar os efeitos genotóxicos em eritrócitos de peixes bentônicos (*S. testudineus*, *B. soporator* e *O. vespertilio*) em diferentes sistemas estuarinos na Baía de Todos os Santos. Além do micronúcleo, todas as outras AMNs (broto nuclear, entalhes, lóbulos e binúcleos) foram frequentes, variando quanto às suas frequências de ocorrência entre as respectivas espécies e localidades. Assim, é factível que a presença de tais anormalidades revela danos genotóxicos (Çavas, 2005). No caso do micronúcleo, sua formação é meramente atribuída a falhas de ligação do cromossomo ao fuso mitótico durante a divisão celular, causado por algum agente estressor (Silva *et al*, 2003).

Desse modo, o teste de MN para detectar resposta genotóxica à poluição em organismos aquáticos se beneficiam da análise integrativa de MN em conjunto com as demais alterações nucleares. No entanto, a análise conjunta de todas as alterações, conforme realizada nesse trabalho, pode aumentar ainda mais a sensibilidade do sistema biológico testado (Çavas & Ergene-Gözükara, 2005). De fato, ensaios genotóxicos para indução de micronúcleos e brotos nucleares validam a utilidade de diferentes AMN como complementares na avaliação de genotoxicidade ambiental (Barsiene *et al*. 2015).

Com base no teste de Kruskal-Wallis e de Student-Newman-Keuls revelou que *S. testudineus* foi a espécie que apresentou diferenças significativas entre as localidades de maior impacto (Aratu e Ribeira) em comparação com as de menor impacto (Jaguaripe e Paraguaçu). Além disso, as amostras de baiacu apresentaram as maiores frequências de AMN em relação à *B. soporator* e *O. vespertilio* (Tabela 2, 3 e 4). Destaca-se que os espécimes de peixe-morcego foram os que apresentaram globalmente os índices inferiores de AMN, com exceção da amostra da Ribeira (Tabela 2). Porém, deve-se destacar que essa espécie também foi a que apresentou menor número amostral o que pode ter enviesado tais resultados. Apesar de tal aspecto, com base nas amostras obtidas na Baía da Ribeira (localidade de maior impacto), para a referida espécie, possuindo uma amostragem máxima estabelecida, ainda assim apresentou baixas frequências de AMN, quando comparado com as das demais espécies (*S. testudineus* e *B. soporator*) (Tabela 2). De modo geral, baiacu e maria-da-toca mostraram-se mais sensíveis na avaliação de impactos genotóxicos considerando cada localidade (Aratu, Ribeira, Paraguaçu e Jaguaripe) da BTS.

A espécie *S. testudineus* é carnívora (Figueiredo & Menezes, 2000, Santos & Rodriguez, 2011, Chiaverini, 2008) e com hábito bentofágico (Chiaverini, 2008), apresentando tendência à malacofagia e carcinofagia (Chiaverini, 2008; Santos & Rodriguez, 2011). Essa preferência

alimentar por animais bentônicos e sésseis podem justificar a maior sensibilidade detectada em *S. testudineus*, tornando-a mais suscetível à biomagnificação.

De fato, moluscos bivalves que constituem um importante item alimentar de baiacus são usualmente utilizados como sentinelas para avaliação da toxicidade ambiental (por constituírem organismos filtradores com maior retenção de xenobióticos nos tecidos (Hatje & Andrade, 2009). Portanto, moluscos tendem a bioacumular principalmente metais tóxicos que podem ascender na cadeia trófica aos seus predadores, incluindo o homem (Souza *et al.*, 2011).

Adicionalmente, a associação de *S. testudineus* ao substrato e seu comportamento mais sedentário parece também favorecer os processos de exposição aos contaminantes ambientais. Corroborando essa hipótese, alguns estudos sobre comportamento de baiacus em habitats de manguezais tem revelado essa relação com o sedimento, no qual passam a maior parte do seu tempo repousando e se alimentado (especialmente indivíduos mais velhos e maiores) (Chiaverini, 2008; McDonald *et al.*, 2009).

Apesar das frequências de AMN serem mais altas em eritrócitos de *S. testudineus*, *B. saporator* também apresentou níveis altos de efeitos genotóxicos, indicativos de sensibilidade à poluição ambiental. Alguns trabalhos têm revelado uma correlação positiva quanto às altas frequências de micronúcleos em *B. saporator* e níveis de metais em sedimento, detectadas principalmente em algumas áreas (marinhas costeiras urbanas) de maior impacto na BTS, ressaltando a presença de efeitos mutagênicos em eritrócitos da espécie referida (Galindo *et al.*, 2014). No caso dessa espécie, tal aspecto parece estar relacionado ao seu hábito onívoro, predando principalmente crustáceos da subclasse Branchyura e da matéria orgânica digerida como observado nos estudos de Lopes e Oliveira (1998). Ademais, *B. saporator* apresenta íntima relação ao substrato (Lopes & Oliveira, 1998), o qual retém muitos contaminantes, incluindo os metais tóxicos como verificados em estudos prévios com sedimentos da BTS (Hatje & Andrade, 2009; Galindo *et al.*, 2014).

Em contrapartida, *O. vespertilio* não apresentou respostas genotóxicas acentuadas, parecendo ser mais tolerante aos efeitos da contaminação ambiental. Essa inferência é apoiada principalmente pela baixa frequência de AMN. Esse resultado contradiz alguns aspectos da biologia dessa espécie, uma vez que ela apresenta características favoráveis à bioacumulação e à biomagnificação como baixa vagilidade, hábitos exclusivamente bentônicos e dieta carnívora (Gibran & Castro, 1999). Ainda assim, as AMN em *O. vespertilio* estavam mais associadas às localidades mais impactadas (Aratu e Ribeira), como demonstrado nas Figuras 9

e 10. Novamente, vale salientar que a amostragem de peixes-morcego não foi homogênea entre as localidades amostradas e é possível que o tamanho amostral tenha influenciado a baixa incidência de AMN nessa espécie.

Contudo, há registros de que muitos organismos aquáticos testados (mexilhão de água doce, mexilhão marinho, esponjas marinhas e peixes de água doce) possuem mecanismos de resistência multixenobiótica (MXR) atribuída à atividade da bomba de glicoproteína P-170, a qual corresponde a um mecanismo de defesa após exposição aos contaminantes do meio aquático. Tal mecanismo remove substâncias xenobióticas, prevenindo a bioacumulação e possíveis efeitos citotóxicos. Bem como, protege tais organismos aquáticos contra toxinas endógenas e ambientais (Kurelec *et al.*, 1995). Similarmente, Jesus *et al* (2016) apresentaram resultados equiparados verificando que espécimes de tilápia (*O. niloticus*) de ambientes sujeitos a intensas atividades antropogênicas apresentaram efeitos genotóxicos a xenobiontes inferiores ao observado em espécies relacionadas, simpátricas e de mesmo nível trófico. Assim, estudos sobre a bioquímica e fisiologia de *O. vespertilio* são indicados para verificar os possíveis mecanismos de resposta celular e tecidual à exposição a agente potencialmente genotóxicos.

De modo geral, as análises de ACP e de Heatmap indicaram maior relação das variáveis genotóxicas com as localidades de maior impacto (Aratu e Ribeira) e menor relação com Paraguaçu e Jaguaripe que correspondem às localidades referência. Tais aspectos foram observados principalmente em amostras de *S. testudineus* (Figura 5 e 6) e *B. soporator* (Figura 7 e 8). Ao considerarmos as três espécies por localidade (Figuras 11, 12, 13 e 14), foi possível verificar que as AMN genotóxicas de fato tiveram mais relações com as possíveis espécies bioindicadoras desse trabalho (*S. testudineus* e *B. soporator*). Assim, às alterações mais significativas observadas em peixes das localidades de maior impacto destacam-se os micronúcleos, binúcleos, broto nuclear e núcleos lobados para a Baía de Aratu e os núcleos entalhados na região da Ribeira.

No entanto, a ocorrência de micronúcleo era frequente em todas as espécies estudadas (Tabela 2), apesar de tal aspecto, tal alteração nuclear estava mais associada à *B. soporator*, demonstrando que embora *S. testudineus* apresentasse as maiores frequências totais de AMN, *B. soporator* mostrou-se mais sensível ao teste de micronúcleo *stricto sensu*, visto principalmente para a localidade de Aratu (Tabela 2), localidade comprometida por diversas atividades antropogênicas. Alguns estudos relatam o elevado número de micronúcleos em

eritrócitos de *B. saporator*, principalmente em áreas de maior impacto, revelando danos genotóxicos, por ação clastogênica (Galindo *et al.*, 2014).

Estudos de Ayllón e Garcia-Vazquez, (2001) com vários compostos genotóxicos em eritrócitos renais de *Oncorhynchus mykiss* evidenciaram que a formação de micronúcleos e outras alterações nucleares depende muito do agente genotóxico. A ciclofosfamida, por exemplo, induziu tanto a formação de micronúcleos quanto das demais AMN, enquanto que a mitomicina acarretou na formação de outras AMN exceto micronúcleos. Outros compostos parecem gerar somente micronúcleos, tais como a N-etil-N-nitrosourea. Por outro lado, estudos de genotoxicidade ambiental têm revelado que outras anormalidades, tais como brotos nucleares, costumam ser mais informativos que os próprios micronúcleos, até porque essas alterações não requerem que a célula esteja em divisão, como no caso do micronúcleo (Barsiene *et al.* 2015). Desse modo, justifica-se a análise de todas as AMN nos estudos com organismos aquáticos em áreas impactadas, especialmente quando diferentes xenobióticos podem estar presentes e causar alterações específicas, como encontrado em *B. saporator* e *S. testudineus*. Tal aspecto elucidada a ideia de que a escolha do organismo-teste ou do composto genotóxico é muito importante na hora de avaliar genotoxicidade ambiental.

Diante de tais aspectos supracitados, as baías de Aratu e Ribeira são caracterizadas como áreas com maior abundância de substâncias potencialmente clastogênicas sobre as espécies bioindicadoras. Esse resultado é concordante com o grau de degradação ambiental de tais localidades na BTS (Hatje & Andrade, 2009).

Em Aratu, as atividades portuárias advindas de dois portos (Aratu e Base Naval), com tráfego constante de embarcações (Hatje & Andrade, 2009; Rocha *et al.*, 2016), os vários empreendimentos siderúrgicos, agrícolas e petroquímicos ao seu redor (Hatje & Andrade, 2009) resultam atividades industriais intensificadas (Araujo *et al.*, 2016). Assim, uma gama de poluentes, com possíveis consequências na qualidade da água, sedimento e ainda na biota aquática são liberados nessa área. Em sedimentos nessa localidade, alguns trabalhos tem descritos concentrações de metais (Zn e Cu), acima do TEL (nível limite de efeito) e PEL (nível provável de efeito), respectivamente (CRA, 2004), que foram estabelecidos pelo Conselho Canadense do Ministério do Meio Ambiente em 2001 (Buchman, 2008), para avaliação do sedimento. Além desses outros metais tem sido frequentes (As, Pb, acima do TEL e Cd, acima do PEL) (Hatje & Andrade, 2009), em níveis tóxicos e que possivelmente são relacionados à atividades industriais, refinarias e portuárias (CRA, 2004). De fato, alguns

estudos têm revelado danos ao DNA, atribuído a presença de alguns metais potencialmente tóxicos (Pb, Hg, Cr e Cd) (Ferraro *et al.*, 2004; Çavas *et al.*, 2005; Porto *et al.*, 2005).

Enquanto que na Ribeira, a contaminação é atribuída fortemente ao esgoto de origem doméstica (CRA, 2004) e, assim como na Baía de Aratu, há muitas atividades portuárias, industriais, químicas e petroquímicas (Hatje & Andrade 2009; CRA, 2004). Embora, apesar de todas essas atividades, as áreas da BTS não possam ser categorizados como altamente contaminados, a presença de efeitos genotóxicos em espécies desses locais ressaltam a necessidade de minimizar o lançamento de poluentes potencialmente tóxicos (Hatje & Barros, 2012). Todavia acerca da contaminação por metais em sedimento na Baía da Ribeira, já foram registradas altas concentrações de Cu, Zn, As e Pb com valores acima do PEL (CRA, 2004; Hatje & andrade, 2009) e de Cd com valores superiores ao do TEL (Hatje & Andrade, 2009). Esses elementos constituem-se espécies químicas potencialmente tóxicas para o sedimento (Huamán-Pino, 2005; Santos *et al.*, 2011; Rocha, *et al.*, 2016).

Por outro lado, Jaguaripe e Paraguaçu correspondem as localidades mais ambientalmente preservadas. Paraguaçu conta com uma ampla área de manguezal preservada, que favorece atividades de pesca artesanal para as comunidades ribeirinhas (Ramos, 1993; Genz *et al.*, 2008). Apesar disso, sugere-se que a qualidade do estuário de Paraguaçu esteja comprometida devido aos lançamentos industriais e a presença de um estaleiro (Hatje & Barros, 2012) e efluentes dos esgotos domésticos não tratados (CRA, 2004). Essas atividades são preocupantes para a saúde dos ecossistemas e populações ribeirinhas, pois representam fontes poluidoras de metais e outros xenobiontes orgânicos (Hatje & Barros, 2012; Manahan, 2013).

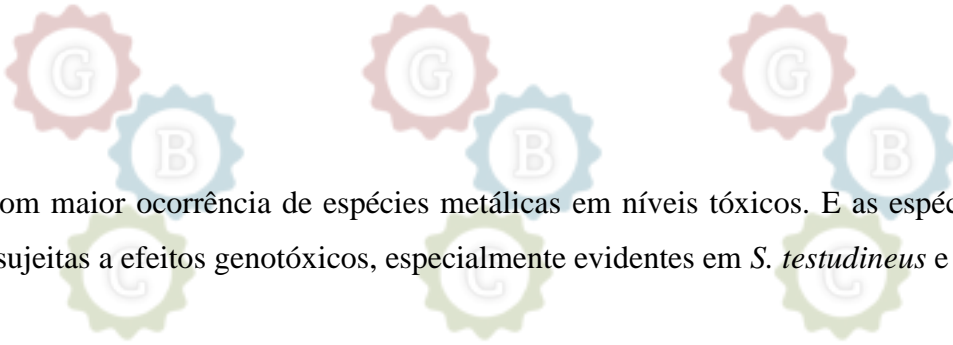
Alguns estudos têm revelado a ocorrência de As (V), espécie química menos tóxica no sedimento desse sistema estuarino. Assim como em Jaguaripe, sua especiação no meio aquático é atribuída aos fatores naturais (Hatje *et al.*, 2010). Dos metais analisados (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn) nos estudos de Barros *et al* (2008), apenas as espécies metálicas de Mn, Ba, Pb e Zn apresentaram maiores valores em suas concentrações. Todavia, tais concentrações mostraram-se ainda assim inferiores quando comparadas com outros sistemas estuarinos na BTS, provavelmente devido à menor intensidade das atividades antropogênicas. Ainda assim, Pereira *et al* (2015) revelaram concentrações elevadas de Mn, ainda que abaixo dos valores referência (TEL) e de Mg. Desse modo, o monitoramento do estuário do Paraguaçu com base nas variações sazonais faz-se necessário a fim de validar se há uma tendência crescente de acumulação de metais potencialmente tóxicos na região.

Aspectos semelhantes estão relacionados à Jaguaripe, principalmente por dispor também de uma extensa área de manguezal preservada. Uma característica do sedimento é a granulometria (areia, relativamente uniforme durante as estações seca e chuvosa) nesse sistema estuarino que dificulta a bioacumulação dos poluentes. De fato, tal aspecto pode ser elucidado a partir das concentrações de metais do material particulado em suspensão nessa área (Hatje & Barros, 2012). Dentre suas principais atividades poluidoras estão as da agricultura, com o uso indiscriminado de pesticidas (CRA, 2004) os quais impactam os ecossistemas aquáticos e ainda podem chegar até ao homem por meio do consumo de peixes, moluscos e outros organismos aquáticos via biomagnificação (Silva *et al.*, 2003). No entanto, diversas classes de pesticidas e outros compostos químicos têm despertado preocupações devido aos efeitos que podem acarretar no meio aquático (Manahan, 2013). Além desses aspectos, a região de Jaguaripe não apresenta tratamento adequado dos resíduos sólidos e do esgoto doméstico (CRA, 2004). Geralmente em seus sedimentos são ricos no elemento químico As, que se encontra presente de forma natural (Hatje & Andrade, 2009; Hatje, *et al.*, 2010). Deve-se ressaltar que a forma As III, considerada a mais tóxica, é particularmente alta nesse estuário (Hatje *et al.*, 2010). Esse resultado indica que, a despeito da indicação de Jaguaripe como um ponto de referência com conservação das áreas de mangues e da comunidade aquática (Krull *et al.*, 2014), essa região merece atenção quanto aos potenciais efeitos genotóxicos sobre a biota.

Vale salientar que além dos metais outros xenobióticos podem ser responsáveis pela AMN nos eritrócitos dos espécimes estudados. Por exemplo, é possível que outros agentes, tais como os poluentes orgânicos persistentes (POPs) possam estar atuando nesse processo (Weber *et al.*, 2011). Devido a sua característica lipofílica, os POPs raramente são encontrados na água, sendo depositados no sedimento e variando sua biodisponibilidade para a biota (Van Der Oost *et al.*, 2003). De fato, estudos em 43 pontos da BTS demonstraram concentrações de hidrocarbonetos poliaromáticos acima dos limites aceitáveis para qualidade temporária em sedimentos (Celino & Queiroz, 2006; Celino *et al.*, 2008). Esses autores associaram o acúmulo desses elementos ao transporte de petróleo ao longo da baía, resíduo de óleos a partir de embarcações motorizadas e dejetos urbanos e industriais.

Com base nos aspectos supracitados, as localidades de Jaguaripe e Paraguaçu, de fato, apresentam-se como áreas comparativamente mais preservadas a despeito da presença de alguns metais na sua forma tóxica. Diferentemente, as baías de Aratu e Ribeira constituem

área com maior ocorrência de espécies metálicas em níveis tóxicos. E as espécies estudadas estão sujeitas a efeitos genotóxicos, especialmente evidentes em *S. testudineus* e *B. soporator*.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

7. CONCLUSÕES

1. Alterações genotóxicas foram encontradas em espécies de peixes bentônicos de diferentes regiões da Baía de Todos os Santos, representando um importante estudo para esse sistema estuarino da costa brasileira.
2. Das espécies estudadas, *S. testudineus* e *B. saporator* mostraram-se mais sensíveis à contaminação ambiental, provavelmente pela relação dessas espécies com sedimentos e, particularmente, pelo nível trófico elevado e dieta predominantemente baseada em moluscos e crustáceos de *S. testudineus* favorecendo a biomagnificação de xenobióticos e potencializando os danos genotóxicos;
3. Em contrapartida, *O. vespertilio*, apesar de também apresentar características favoráveis a sua utilização como bioindicadores, mostrou-se mais tolerante às variáveis ambientais com respostas genotóxicas menos evidentes, o que pode ter sido parcialmente afetado pelo viés amostral nessa espécie;
4. O teste de micronúcleos revelou maior predominância de outras AMN além dos micronúcleos, sugerindo que as alterações genotóxicas devam ser avaliadas em conjunto para melhor avaliação de biomarcadores associados à genotoxicidade;
5. No geral, as variáveis genotóxicas encontradas nas espécies selecionadas tiveram maior relação com as localidades de maior impacto ambiental (Ribeira e Aratu) provavelmente em função de diversas atividades antropogênicas nessas localidades;
6. Apesar de Paraguaçu e Jaguaripe corresponderem a localidades relativamente mais preservadas, também recebem lançamentos de efluentes antrópicos, ainda que moderado, conferindo efeitos genotóxicos ainda que reduzidos nas espécies estudadas. Assim, ações de conscientização ambiental e pesquisas dos possíveis efeitos dos xenobióticos na biota aquática e na cadeia trófica devem ser incentivadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MONEIM, AM.; AL-KAHTANI, MA. & ELMENSHAWY, OM. 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, vol. 88, p.1028-1035.

AL-SABTI, K. & METCALFE, CD. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, vol. 343, p. 121-135.

AL-SABTI, K. 2000. Chlorotriazine Reactive Azo Red 120 Textile Dye Induces Micronuclei in Fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol.47, p. 149-155.

ANBUMANI, S. & MOHANKUMAR, MN. 2012. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish Catlacatla. *Aquatic Toxicology*. vol. 122, p. 125-132.

ANDRADE, VMA.; SILVA, J.; SILVA, FR.; HEUSER, VD.; DIAS, JF.; YONEAMA, ML. & FREITAS, TRO. 2004. 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*, vol. 44, p. 459-568.

ANSARI, RA.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S. & RAISUDDIN, S. 2011. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 74, p. 150-156.

AMORIM, LCA. 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, vol.6, no. 2, p.158-170.

APRILE, FM. & BOUVY, M. 2010. Heavy metal levels in surface Waters from a tropical river basin, Pernambuco state, northeastern Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, vol. 32, no 4, p. 357-364.

ARAÚJO, UC. 2000. A Baía de Todos os Santos: um sistema geo-histórico resistente. *Bahia Análises e Dados*, vol. 9, p. 10–23.

ARAÚJO, RPA.; SHIMIZU, G.Y.; BOHRER, M.B.C.; JARDIM, W. Avaliação da Qualidade de Sedimentos. 2006. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*: São Carlos: RiMa, 2006. p. 269-286.

ARAÚJO, CFS.; MARIÂNGELA, VL.; MIRIAN, RV.; MENEZES-FILHO, JA. 2016. Cadmium and lead in seafood from the Aratu Bay, Brazil and the human health risk assessment. *Environmental Monitoring Assessment*, vol. 188, p. 259.

ARIAS, ARL.; BUSS, DF.; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, AF.; FREIRE, MM.; EGLER, M.; MUGNAI, R. & BAPTISTA, DF. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, vol. 12, p. 61-72.

ARKHIPCHUK, VV. & GARANKO NN. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 62, p. 42-52.

AYLLO'N F. & GARCIA-VAZQUEZ, E. 2001. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 49, p. 221–225.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, DL. & SANTOS, AA. 2007. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. ONG Mamirauá. Belém, PA.

BAIRD, C. 2002. Química ambiental. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 622 p.

BARSIENE, J.; BUTRIMAVICIENE, L.; MICHAIOVAS, A. & GRIGIEL, W. 2015. Assessing the environmental genotoxicity risk in the Baltic Sea: frequencies of nuclear buds in blood erythrocytes of three native fish species. *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 187, no. 1, p. 40-78.

BARROS, F.; HATJE, V.; FIGUEIREDO, MB.; MAGALHAES, WF.; DOREA, HS. & EMIDIO, ES. 2008. The structure of the benthic macrofaunal assemblages and sediments characteristics of the Paraguaçu estuarine system, NE, Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol 78, p. 753–762.

BRITO, R. 1997. Ambientes Aquáticos. In Baía de Todos os Santos, Diagnóstico Sócio-Ambiental e Subsídios Para a Gestão. Salvador: GERMEN/UFBANIMA. p. 71–78.

BUCHMAN, MF. 2008. NOAA Screening Quik Reference Tables, NOAA OR&R Report 08-1, Seattle WA, office of Response and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration, 34 p.

CAMARGO, MMP.; FERNANDES, MN.; MARTINEZ, CBR. 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, vol. 94, p. 40–46.

CHAPMAN, PM.; ANDERSON, J. 2005. A Decision-Making Framework for Sediment Contamination. *Integrated Environmental Assessment and Management*, vol. 1, no. 3, p. 163–173.

CRA, 2001. Saneamento ambiental da Baía de Todos os Santos – Modelamento e Avaliação Ambiental. (Centro de Recursos Ambientais). N° RT-257-05-MA-003 RF, 109 p.

CRA. 2004. Diagnóstico do grau de contaminação da Baía de Todos os Santos por metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo a partir da análise das suas concentrações nos sedimentos de fundo e na biota associada, CRA, Bahia, Brasil, 366 p.

CAVALCANTI, MJ. & LOPES, PRD. 1998. Variação geográfica de caracteres quantitativos em *Ogcocephalus vespertilio* (Linnaeus) (Teleostei, Lophiiformes, Ogcocephalidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, vol 15, no. 1, p. 125-134.

ÇAVAS, T. & ERGENE-GOZUKARA, S. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolarorganizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, vol. 538, p. 81-91.

ÇAVAS, T. & ERGENE-GÖZÜKARA, S. 2005. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 46, p. 64-70.

ÇAVAS, T. 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food Chemical Toxicology*, vol. 46, p. 352-358.

CELINO, JJ.; TRIGÜIS, JA.; VEIGA, IG. & QUEIROZ, AFS. 2008. Biomarcadores e “fingerprints” de hidrocarbonetos nos sedimentos de manguezais na porção norte da Baía de Todos os Santos, Bahia. *Revista Brasileira de Geociências*, vol. 38, p. 186-196.

CELINO, JJ. & QUEIROZ, AFS. 2006. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. *Revista Escola de Minas*, vol. 59, no. 3 p. 265-270.

CHIAVERINI, AP. 2008. Ecologia trófica de *Spherooides testudineus* (Linnaeus, 1758) e *Spherooides greeleyi* (Gilbert, 1900) da Gamboa do Pereque, Pontal do Sul, Parana, Brasil. Dissertação de Mestrado em Zoologia. 54 p.

COSTA, CR; OLIVI, P; BOTTA, CMR & ESPINDOLA, ELG. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, vol. 31, no7, p. 1820-1830.

DECAPRIO, AP. 1997. Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. *Environmental Science Technology*, vol. 3, p. 1.

DE PAUW, N. & VANHOOREN, G. 1983. Method for biological quality assessment of watercourses in Belgium. *Hydrobiologia*, vol. 100, p. 153-168.

ERBE, MCL.; RAMSDORF, WA.; VICARI, T & CESTARI, MM. 2011. Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, vol. 20, p. 320-328.

ERGENE, S.; ÇAVAŞ, T.; ÇELIK, A.; KÖLELI, N.; KAYA, F. & KARAHAN, A. 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, vol. 16, p. 385-391.

FERRARO, MVM.; FENOCCHIO, AS.; MANTOVANI, MS.; RIBEIRO, CO. & CESTARI, MM. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, vol.27, p. 103-107.

FERREIRA, AP. 2005. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 21, no. 6, p. 1884-1892.

FIGUEIREDO, JL. & MENEZES, NA. 1978. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. II. Teleostei (1). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1-110p.

FIGUEIREDO, JL. & MENEZES, NA. 2000. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1-116p.

GALINDO, TPS.; ROSARIO, IR & DA SILVA, EM. 2014. Micronucleus test in frillfin goby *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1873) from tide pools of Salvador city, Brazil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, vol. 18, no 1, p. 19-24.

GENZ, F.; LESSA, GC. & CIRANO, M. 2008. Vazão mínima para estuários: um estudo de caso do Rio Paraguaçu/BA. *Rev. Brasileira de Recursos Hídricos*, vol. 13, p. 73-82.

GEFFARD, O.; GEFFARD, A.; HIS, E. & BUDZINSKI, H. 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Marine Pollution Bulletin.*, v.46, p.481-490.

GIBRAN, FZ. & CASTRO, RMC. 1999. Activity, feeding behaviour and diet of *Ogcocephalus vespertilio* in southern west Atlantic. *Journal of Fish Biology*, vol. 55, p. 588–595.

HAMMER, O.; HARPER, DAT. & RYAN, PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Eletrônica*, vol. 4, p. 9.

HATJE, V.; BARROS, F.; MAGALHÃES, W.; RIATTO, V.; AMORIM, FN.; FIGUEIREDO, MB.; SPANÓ, S. & CIRANO, M. 2008. Trace metals and benthic macrofauna distributions in Camamu Bay, Brazil: Sediment quality prior oil and gas exploration. *Marine pollution bulletin*, vol. 56, p. 363-70.

HATJE V. & ANDRADE JB. 2009. Baía de Todos os Santos: aspectos oceanográficos. EDUFBA, Salvador, BA. Brazil.

HATJE, V.; MACEDO, SM.; JESUS, RM.; COTRIM, G.; GARCIA, KS.; QUEIROZ AF. & FERREIRA, SLC. 2010. Inorganic As speciation and bioavailability in estuarine sediments of Todos os Santos Bay, BA, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 60, p. 2225–2232.

HATJE V. & BARROS, F. 2012. Overview of the 20th century impact of trace metal contamination in the estuaries of Todos os Santos Bay: Past, present and future scenarios. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 64, p. 2603–2614.

HEDDLE, JA. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, vol. 18, no. 2, p. 187-190.

HELLOU, J. 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 18, p. 1-11.

HUAMÁN PINO, GA. 2005. Bioassorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco Verde (*Cocos nucifera*). Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado em Engenharia Metalúrgica. 113p.

JESUS, IS.; MEDEIROS, RLS.; CESTARI, MM.; BEZERRA, MA. & AFFONSO, PRAM. 2014. Analysis of metal contamination and bioindicator potential of predatory fish species along Contas River basin in northeastern Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 92, p. 551-556.

JESUS, IS.; MEDEIROS, RLS.; CESTARI, MM.; BEZERRA, MA. & AFFONSO, PRAM. 2016. Genotoxicity effects in freshwater fish from a Brazilian impacted river. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*. DOI 10.1007/s00128-016-1755-1.

KIRSCHBAUM, AA.; SERIANI, R.; PEREIRA, CDS.; ASSUNÇÃO, A.; ABESSA, DMS.; ROTUNDO, MM. & RANZANI-PAIVA, MJT. 2009. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 32, p. 151-154.

KRULL, M.; ABESSA, DMS.; HATJE V. & BARROS, F. 2014. Integrated assessment of metal contamination in sediments from two tropical estuaries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 106, p. 195–203.

KUMAR, B.; SAJWAN, KS. & MUKHERJEE, DP. 2012. Distribution of Heavy Metals in Valuable Coastal Fishes from North East Coast of India. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol.12, p. 81-88.

KURELEC, B.; PIVCEVIC, B. & MULLER, WEG. 1995. Determination of Pollutants with Multixenobiotic Resistance Inhibiting Properties. *Marine Environmental Research*, vol 39, p. 261-265.

LEAO, ZMAN. & DOMINGUEZ, JML. 2000. Tropical coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 41, no. 1-6, p. 112-122.

LOPES, PRD. & OLIVEIRA-SILVA, JT. 1998. Alimentação de *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Actinopterygii: Teleostei: Gobiidae) na localidade de Cacha Pregos (Ilha de Itaparica), Bahia, Brasil. *Biotemas*, vol.11, no. 1, p. 81-92.

MANAHAN, SE. 2013. Química Ambiental. 9ª ed. Porto Alegre: Bookman, 912 p. *Environmental Chemistry*, no 54.

MACDONALD, JA.; SHAHRESTANI, S. & WEIS, JS. 2009. Behavior and space utilization of two common fishes within Caribbean mangroves: implications for the protective function of mangrove habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 84, p. 195–201.

MENEZES, NA. & FIGUEIREDO, JL. 1985. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. V. Teleostei (4). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1-105 p.

MIGUES, VH.; BEZERRA, MA.; FRANCISCO, AK.; GUERRAZZI, MC. & AFFONSO, PRAM. 2013. Accumulation of trace metals in two commercially important shrimp species

from Camamu Bay, northeastern Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 91, p. 292-297.

MOZETO, AA.; UMBUZEIRO, GA. & JARDIM, WF. 2006. Métodos de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce. São Carlos: Cubo Multimídia. 224p.

OGUNDIRAN, MB. & OJO, AS. 2012. Determination of fat contents, iodine values, trace and toxic metals in commonly consumed frozen fish in Nigeria. *American Journal of Food Technology*, vol.7, p. 34-42.

OLIVEIRA, WF. 1997. Evolução sócio-econômica do Recôncavo Baiano. Salvador. In: Baía de Todos os Santos, Dianóstico Sócio-Ambiental e Subsídios para a Gestão. Salvador: GERMEN/UFBA-NIMA. p. 43-56.

OSMAN, A.; ALI E.; HASHEM M.; MOSTAFA M. & MEKKAWY, I. 2010. Genotoxicity of two pathogenic strains of zoosporic fungi (*Achlyak lebsiana* and *Aphanomyces laevis*) on erythrocytes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, vol. 73, p. 4–31.

PEREIRA, TSA.; MOREIRA, ITA.; OLIVEIRA, OMC.; RIOS, MC.; FILHO, WACS C.; M, A. & CARVALHO, GC. 2015. Distribution and ecotoxicology of bioavailable metals and As in surface sediments of Paraguaçu estuary, Todos os Santos Bay, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 99, p. 166-177.

PORTO, LCS. 2009. Avaliação de metais pesados e micronúcleos em peixes da bacia hidrográfica Butuí-Icamaquã e análise da água. Lajeado/RS: Centro Universitário UNIVATES. Dissertação de mestrado em Ambiente e Desenvolvimento. 99 p.

RAMOS, MAB. 1993. Estudos geoquímicos relativamente à dinâmica de marés no estuário lagunar do rio Paraguaçu – Bahia – Brasil. Dissertação de Mestrado em Geoquímica. 96 p.

REEVE, RN. 2002. *Introduction to Environmental Analysis*. West Sussex: John Wiley & Sons. 301 p.

READMAN, JW.; FILLMANN, G.; TOLOSA, I.; BARTOCCI, J.; VILLENEUVE, JP.; CATINNI, C. & MEE, LD. 2002. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, Vol.44, no. 1, p. 48–62.

ROCHA, GO.; GUARIEIRO, ALN.; ANDRADE, JB.; EÇA, GF.; ARAGÃO, NM.; AGUIAR, RM.; KORN, MGA.; BRITO, GB.; MOURA, CWN. & HATJE, V. 2012. Contaminação na Baía de Todos os Santos. *Revista Virtual Química*, vol. 4, no. 5, p. 583-610.

ROCHA, TS.; SALES, EA.; BERETTA, M. & OLIVEIRA, IB. 2016. Effects of dredging at Aratu port in All Saints Bay, Brazil: monitoring the metal content in water and sediments. *Environmental Monitoring Assessment*, vol. 188, p. 39–58.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, AR.; GARCIA-VAZQUEZ, E. 1998. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 43, p. 301-304.

SANTANA, CO.; JESUS, TB.; AGUIAR, WM.; ROCHA, WJSF. & SOARES, CAC. 2017. Assessment of health risk related to the ingestion of trace metals through fish consumption in Todos os Santos Bay. *Environmental Monitoring Assessment*, vol. 189, no. 5, p. 204.

SANTOS, ACA. & RODRIGUEZ, FNC. 2011. Ocorrência e alimentação do baiacu *Sphoeroides testudineus* (Actinopterygii – Tetraodontiformes) na margem oestada Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, vol 11, no. 1, p. 31–36.

SOUZA, MM.; WINDMÖLLER, CC. & HATJE, V. 2011. Shellfish from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil: Treat or threat? *Marine Pollution Bulletin*, vol. 62, p. 2254–2263.

SCHEFFER, EW.; SODRÉ, FF. & GRASSI, MT. 2007. Fatores que governam a especiação do cobre em ambientes aquáticos urbanos: evidências da contribuição de sulfetos solúveis. *Química Nova*, vol. 30, no. 2, p. 332-338.

SCHIFFMANN, D & DE BONI, U. 1991. Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise. *Mutation Research*, vol. 246, p. 113-122.

SCHMID, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 31, p. 9-15.

SISINNO, CLS & FILHO, ECO. 2013. *Princípios de Toxicologia Ambiental*. Rio de Janeiro, Ed. Interciência, 22 p.

SILVA, J.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, JAP. 2003. *Genética toxicológica*. Porto Alegre, Ed. Alcance, 422 p.

SILVA, E.; VIANA, ZCV.; SOUZA, NFA., KORN, MGA. & SANTOS, VLCS. 2016. Assessment of essential elements and chemical contaminants in thirteen fish species from the Bay Aratu, Bahia, Brasil. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 76, no. 4, p. 871-877.

SNELGROVE, PVR., 1998. The biodiversity of macrofaunal organisms in marine sediments. *Biodiversity and Conservation*, vol. 7, p. 1123–1132.

STRUNJAK-PEROVIC, I.; POPOVIC, NT.; COZ-RAKOVAC, R. & JADAN, M. 2009. Nuclear abnormalities of marine fish erythrocytes. *Journal of Fish Biology*, vol.74, p. 2239-2249.

TABARI, S; SARAVI, SSS; BANDANY, G; DEGHAN, A & SHOKRZADEH, M. 2010. Heavy metals (Zn, Pb, Cd and Cr) in fish, water and sediments sampled from the Southern Caspian Sea, Iran. *Toxicology and Industrial Health*, vol. 26, no. 10, p. 649-656.

TAVARES, TM & CARVALHO, FM. 1992. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. *Química Nova*, vol. 15, no. 2, p. 147-154.

VAN DER OOST, R.; DEYER, J. & VERMEULEN, N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 13, p. 57-149.

VINODHINI, R. & NARAYANAN, M., 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organ of freshwater fish *Cyprinus carpio* (Common carp.) *International Journal of Environmental Science Technology*, vol. 5, p. 179-182.

WEBER, R.; WATSON, A.; FORSTER, M. & OLIAEI, F. 2011. Persistent organic pollutants and landfills - a review of past experiences and future challenges. *Waste Management Research*, vol. 29, p. 107-121.

WILD, C.; RASHEED, M.; WERNER, U.; FRANKE, U.; JOHNSTONE, R. & HUETTEL, M. 2004. Degradation and mineralization of coral mucus in reef environments. *Marine Ecology Progress Series*, vol. 267, p. 159-171.

