



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

**“ABORDAGENS BIOLÓGICAS COMO INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL EM
ESTUÁRIOS DA REGIÃO METROPOLITANA DE FORTALEZA-CE: BIOMARCADORES E
TOXICIDADE DE SEDIMENTOS”**

MARCELA BERGO DAVANSO

Fortaleza-CE
2010

MARCELA BERGO DAVANSO

**“ABORDAGENS BIOLÓGICAS COMO INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL EM
ESTUÁRIOS DA REGIÃO METROPOLITANA DE FORTALEZA-CE: BIOMARCADORES E
TOXICIDADE DE SEDIMENTOS”**

Dissertação submetida á Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Veras Costa-Lotufo

Fortaleza-CE

2010

D267 Davanso, Marcela Bergo

Abordagens biológicas como instrumento de avaliação de risco ambiental em estuários da Região Metropolitana de Fortaleza-CE: biomarcadores e toxicidade de sedimentos. / Marcela Bergo Davanso

2010.

74 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Co-orientadora: Letícia Veras Costa-Lotufo

Área de concentração: Saneamento Ambiental

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2010.

1. Atividade enzimática - Contaminação. 2. Dano no DNA. 3. Sedimentos. 4. Toxicidade crônica I. Abessa, Denis Moledo de Souza III. Universidade Federal do Ceará – Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais.

CDD 638.168

MARCELA BERGO DAVANSO

“ABORDAGENS BIOLÓGICAS COMO INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL EM ESTUÁRIOS DA REGIÃO METROPOLITANA DE FORTALEZA-CE: BIOMARCADORES E TOXICIDADE DE SEDIMENTOS”

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação de em Ciências Marinhas Tropicais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa (Orientador)
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP-CLP

Prof. Dr. Christiano Magini (membro interno)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira (membro externo)
Universidade Santa Cecília - UNISANTA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Luis Carlos Davanso e Aparecida de
Souza Bergo Davanso, exemplos de
união e amor de uma vida inteira.

*“A inspiração vem de onde? Pergunta pra mim alguém,
Respondo talvez de Londres, de avião, barco ou ponte,
Vem com meu bem de Belém, vem com você nesse trem,
Nas entrelinhas de um livro,
Da morte de um ser vivo, das veias de um coração,
Vem de um gesto preciso, vem de um amor, vem do riso, vem por alguma razão,
Vem pelo sim, pelo não,
Vem pelo mar gaivota,
Vem pelos bichos da mata, vem lá do céu, vem do chão,
Vem na medida exata, vem dentro da tua carta,
Vem do Azerbaijão, vem pela transpiração,
A inspiração vem de onde? De onde?
Vem da tristeza, alegria, do canto da cotovia,
Vem do luar do sertão, vem de uma noite fria,
Vem olha só quem diria, vem pelo raio e trovão,
No beijo dessa paixão,
A inspiração vem de onde?
De longe”*

(Transpiração - Alzira Espíndola e Itamar Assumpção)

AGRADECIMENTOS

O mestrado para mim foi um período de muitas transformações e aprendizado. Foi intenso em todos os sentidos, repleto de desafios, erros, tentativas, acertos, onde felicidades e tristezas caminharam juntas. Minhas fronteiras estão menores, minhas idéias fortes, minhas opiniões flexíveis. Da mesma maneira, creio eu, que foi e será para todos os que se aventuram pelo mestrado, sem muita ajuda e apoio não poderia ter desenvolvido este trabalho e completado mais este caminho. Por isso eu agradeço:

Aos meus pais, Davanso e Cida, por tudo, sempre. Longe ou perto, na lembrança ou nos olhos, os dois ao coração.

Ao meu irmão, cunhada e meu sobrinho, Ricardo, Tânia e Lucas, pelo caminho trilhado junto, colado, de mãos dadas. As minhas irmãs Fê e Rê, por aquilo que a gente nem consegue explicar, mas tá aí pra vida toda.

As minhas famílias, Bergo-Davanso, Eitler e Pimentel, pelo apoio crucial aos meus de casa e a mim. Sem todos vocês não teria coragem e força para ficar longe e deixar minha casa muitas vezes.

Aos amigos, aqueles do peito, desses que vibram e choram com a gente. Tenho a sorte e felicidade de dizer que meus dedos não são suficientes para contar vocês. Os de SP, os de SV, os do CE, os que se bandearam pelo Brasil, pelo mundo, e pelo universo paralelo, obrigada. Viva a Ossada!

Ao meu orientador Denis, por todos os ensinamentos, suporte, amizade, orientação, estímulo e bastante paciência, mais uma vez nesses 5 anos, obrigada.

Á minha co-orientadora Letícia, por me receber no Ecotox, me ensinar, orientar e me considerar mais uma das suas. Aprendi muito, e agora tenho mais um exemplo de boa pessoa e bom profissional para seguir.

Ao Prof. Dr. Christiano Magini e ao Prof. Dr. Camilo Pereira, por aceitarem fazer parte da Banca deste trabalho e por toda a contribuição com este.

Aos colegas de mestrado, valeu por tudo. Um valeu especial para o Elthon, Lula, Ricardinho, Fernanda e Ronaldo. E uma vibração de paz para o Alvarenga.

Aos que fazem o programa de Pós em Ciências do Mar acontecer em todas as esferas, obrigada pela dedicação, apoio e paciência. Agradeço especialmente ao Prof. Drude, a todos os Professores, a Rosângela, Hanne, Seu Carlos, Seu Edilson, Francisco, Wagner e Cláudia.

Aos maravilhosos integrantes do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha - UFC, que abriram as portas de suas vidas, desde quando fui prestar a prova, até para sempre. Vocês se tornaram parte integrante da minha vida. Um

salve para Jana, Patô, Belle, Paula, Jeamys, Elthon, Lucas, Évila, Lívia, Alysson, Janis, Larissa, Lígia, Luana e Seu Zezinho.

Aos meus trutas do NEPEA – UNESP-CLP, onde eu comecei e para onde eu sempre quero voltar.

Aos Laboratórios Cearenses EQUAL e LECA, na qualidade única junto com o ECOTOX de piso mais legal do LABOMAR, o nível do mar, sempre. Pelos almoços compartilhados, trocas científicas, merendas, saídas e tudo o que se pode querer dos vizinhos-amigos, uma convivência ideal.

Ao Laboratório de Oncologia Experimental LOE-UFC, pela ajuda nas análises e por me receberem sempre bem, em especial a Silvana e Adelanía, meu obrigada.

Aos Laboratórios Vicentinos DIPECO/MICROMAR, pela disputa mais acirrada de toda a UNESP-CLP, bolo colorido, café!!! Ao LABIMES, pela acolhida de sempre, trocas científicas e tudo que ainda está por vir.

A Maysa Ito, pela imensa ajuda com os cometas difíceis de lidar/colorir, meu muito obrigada!

Aos amigos Lucas, Lívia, Marcionília, Allyson, Jeamylle, Jana e Janisi pela imensa ajuda laboratorial e suporte durante coletas, experimentos e análises, valeu.

A UNESP-CLP, pela infra-estrutura cedida e pessoal, agradeço em especial a Conceição (bibliotecária mais gentil e agilizada que já conheci), Luciana, Márcia e Beto (Técnicos do CLP).

À Dna. Maria, Seu Tarso e Seu Marcos, por todo o auxílio durante as coletas e pela vivência.

Aos que me acolheram sempre: Jeamylle e Verônica, Kcrishna, Castanha (e agregada), Cristal e Pankeka, Janisi e Carol, Daku, Jeba e Tieta, toda a Ossada e VPD do meu coração.

A Alice e Marcionília Pimentel, por escancararem sua porta e me entregarem de coração a sua Morada, fazendo dela meu Lar Cearense, minha Família tb.

A SEMACE, em especial Vanessa Mariano e Thiago Pontes, gerentes das APAs do Rio Ceará e Rio Pacoti.

A FUNCAP, pela bolsa concedida.

A Deus, pelas coisas inexplicáveis, pela vida e pela morte, pelo límpido e pela névoa: o entendimento um dia virá.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ZONA COSTEIRA DO CEARÁ E SUA GESTÃO	2
1.2. CONTAMINAÇÃO, SISTEMA AQUÁTICO E ECOTOXICOLOGIA	5
1.2.1 <i>Biomarcadores</i>	7
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. ÁREA DE ESTUDO	13
3.1.1. <i>Rio Ceará</i>	14
3.1.2. <i>Rio Pacoti</i>	15
3.2. ORGANISMO-TESTE	16
3.3. AMOSTRAGEM	18
3.4. BIOMARCADORES	20
3.4.1. <i>Processamento do Material Biológico</i>	20
3.4.2. <i>Quantificação de Proteínas</i>	21
3.4.3. <i>Glutathione S-transferase</i>	22
3.4.4. <i>Colinesterase (ChE)</i>	23
3.4.5. <i>Teste do Cometa</i>	24
3.5. SEDIMENTOS	26
3.5.2. <i>Teste de Toxicidade de Sedimento Integral</i>	29
3.5.3. <i>Granulometria</i>	30
3.5.4. <i>Teor de Matéria Orgânica</i>	30
3.5.5. <i>Teor de Carbonatos</i>	31
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	41
5.1. SEDIMENTOS	42
5.2. BIOMARCADORES	49
5.3. AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL E SUA APLICABILIDADE NA ZC – CE	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

As regiões estuarinas incluem-se entre os ecossistemas costeiros mais ameaçados do mundo. Para prever riscos ao ambiente, surgiu a Avaliação do Risco Ecológico (ERA), que pode ser baseada no peso de evidências para avaliar os efeitos decorrentes da contaminação. O uso de biomarcadores na ERA pode fornecer uma detecção prévia de estresse em níveis subletais, gerando subsídios para a gestão, em conformidade com o princípio da precaução. A avaliação da qualidade dos sedimentos também é considerada um importante componente, visto que os sedimentos são o principal destino das substâncias antrópicas introduzidas nos corpos hídricos. No presente estudo, caranguejos da espécie *Goniopsis cruentata* e sedimentos foram coletados em dois estuários tropicais urbanizados na região Metropolitana de Fortaleza-CE (APA do Estuário do Rio Ceará - RC e APA do Estuário do Rio Pacoti). Os sedimentos foram avaliados quanto ao potencial tóxico (toxicidade crônica), características granulométricas, teor de matéria orgânica (MO) e carbonatos (CaCO_3). Já os organismos de *G. cruentata* tiveram suas brânquias (anteriores e posteriores) analisadas quanto à atividade enzimática de Glutathione *S*-transferase (GST) e Colinesterase (ChE), enquanto a hemolinfa dos organismos foi utilizada no Ensaio do Cometa, visando a quantificação de dano no DNA. Os sedimentos dos estuários se apresentaram ricos em CaCO_3 , predominantemente lamosos e com altos teores de MO, indicando que ambos são propícios à deposição, recebem influência marinha e têm potencial de retenção de contaminantes. Nos testes de toxicidade todas as amostras dos estuários foram significativamente diferentes do controle e consideradas potencialmente tóxicas. No que concerne aos biomarcadores, a estação RC1 apresentou inibição da atividade enzimática da ChE relacionada ao aporte de pesticidas e compostos carbamatos, visto que existe uma policultura a menos de 800m da estação. A atividade da GST não apresentou diferença significativa entre os estuários, porém devido à contaminação da região do Rio Ceará e o aumento da contaminação na região do Rio Pacoti, é possível a indução na atividade da GST nos dois estuários. Em relação ao dano em DNA, as estações do RC apresentaram dano significativo quando comparado ao Pacoti, indicando que, apesar da ativação dos sistemas de detoxificação (GST), a exposição a compostos genotóxicos está causando efeito deletério no DNA dos caranguejos. Conclui-se que o RC apresenta piores condições para os organismos aquáticos, com presença de efeitos genotóxicos, bioquímicos, e toxicidade crônica dos sedimentos, enquanto o Pacoti apresenta comprometimento da qualidade anteriormente descrita para o estuário, evidenciada pela toxicidade crônica e efeitos bioquímicos. Além disso, o caranguejo grapsídeo *G. cruentata* se apresenta como um organismo-sentinela promissor para avaliações ecológicas de estuários tropicais. É necessária a aplicação de outras abordagens, visando elucidar de forma mais detalhada as relações entre contaminação, dinâmica dos fatores abióticos e presença de efeitos na biota local, como passo obrigatório para a avaliação de risco e o gerenciamento integrado desses estuários.

Palavras-chave: atividade enzimática, contaminação, dano no DNA, sedimentos, toxicidade crônica.

ABSTRACT

The estuarine systems are among the most threatened coastal environments. The Environmental Risk Assessment (ERA) could be predicted by applying the Weight of Evidence approach, that is based on several Lines of Evidence (LOE) to assess the effect of contaminants in the ecosystems. The use of biomarkers in ERA can provide an early detection of stress at sublethal levels (early-warning), providing good data-base for coastal management. Sediment quality assessment is also an important component in ERA, since it accumulates contaminants and serves as source of pollution to the ecosystems. The aim of this study is assess the environmental risk and quality of two tropical estuaries in Fortaleza's metropolitan area - CE - Brazil (Ceará river – RC; Pacoti river). Sediments were collected to evaluate potential toxic effects (chronic toxicity), granulometric characteristics, organic matter content (OM) and carbonate (CaCO₃). The enzymatic activities of glutathione S-transferase (GST) and cholinesterase (ChE) were analyzed in anterior and posterior gills of land crab *Goniopsis cruentata*, while the hemolymph was used to quantify DNA damage. The sediments showed high contents of mud, CaCO₃ and organic matter, indicating a depositional site, with strong marine influence and potential to accumulate contaminants. In toxicity tests all samples of the estuaries were significantly different from control and potentially toxic. The RC1 station showed inhibition of enzymatic activity of ChE related to the pesticides and carbamate compounds inputs by an agriculture area near the site. Although GST activity was not significantly different between estuaries, it was considered that GST activity was induced in both estuaries due to contamination in Ceará river and increasing pollution in the Pacoti river. In relation to DNA damage, the samples of the Ceará river showed significant damage when compared to the Pacoti river, indicating that despite the detoxification systems (GST), exposure to genotoxic compounds are causing deleterious effects on crabs. We conclude that Ceará river has the worst conditions for aquatic organisms, with the presence of genotoxic, biochemical, and chronic toxicity effects, while Pacoti river is under moderated stress, that was evidenced by the chronic toxicity and biochemical effects. In addition, the Grapsidae crab *G. cruentata* could be a good sentinel organism for tropical estuary environmental assessment. It requires the application of other approaches, to elucidate in more detail the relationship between pollution, dynamics of abiotic factors and effects on biota, such as mandatory step for risk assessment and integrated management of estuaries.

Key words: enzymatic activity, contamination, DNA damage, sediments, chronic toxicity.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma zona costeira ampla, considerada patrimônio nacional dada sua grande importância ambiental, social e econômica. Em seus 8.000 km de costa, abriga um mosaico de ecossistemas de alta relevância ambiental, com zonas de transição entre ambientes terrestres e marinhos, que requerem atenção especial do poder público devido a sua fragilidade (BRASIL, 1988a; BRASIL, 1988b).

De maneira geral, os ambientes costeiros são as regiões de maior biodiversidade dos oceanos e abrigam a maior parte dos recursos vivos marinhos do mundo, principalmente em ecossistemas específicos, como manguezais, costões rochosos, recifes de corais, entre outros (CLARK, 1998).

Estuários são ambientes complexos, dinâmicos, únicos e especialmente influenciados pela maré, que constituem zonas de alimentação, proteção e reprodução para um grande número de espécies. Podem ser definidos em função da variação da salinidade, pois são considerados zonas de transição entre água doce e água salgada, em mistura contínua, devido às descargas fluviais e a amplitude da maré, o que faz a salinidade variar geralmente de 0 até um pouco mais 35 (CLARK, 1998; CHAPMAN & WANG, 2001).

Em geral, os estuários apresentam menor biodiversidade que os ambientes que o margeiam. Todavia são, em média, biologicamente mais produtivos do que as dos rios e oceano adjacentes, devido às características hidrodinâmicas da circulação, que potencializam a retenção de matéria orgânica, nutrientes e algas, tanto no sedimento quanto na coluna d'água, estimulando a produtividade primária (CHAPMAN & WANG, 2001; MIRANDA *et al.*, 2002; McLUSKY & ELLIOTT, 2004).

Apesar da notável importância, as regiões estuarinas estão incluídas entre os ecossistemas costeiros mais degradados pela ação humana no mundo. Os estuários e suas bacias são favoráveis ao assentamento humano e de indústrias pela acessibilidade, disponibilidade de recursos naturais, facilidades para obtenção de recursos básicos pela população (água doce, acesso ao mar e ao continente, alimentos) e ideal para o desenvolvimento de atividades econômicas como exploração de recursos naturais, turismo, atividades portuárias, etc. O uso múltiplo resulta na exposição destes ambientes a uma ampla variedade de contaminantes orgânicos e inorgânicos provenientes de atividades industriais,

agropecuárias, portuárias e urbanas (especialmente domésticas), entre outras (KENNISH, 1992; MACHADO *et. al.*, 2002; McLUSKY & ELLIOTT, 2004).

Os principais impactos decorrentes das atividades humanas nas regiões estuarinas são: a redução da biodiversidade e da abundância de recursos naturais; o comprometimento da saúde da biota chegando em inúmeros casos a diminuição e extinção total de habitats; e a diminuição da qualidade de vida da população humana, visto que a sustentabilidade das atividades humanas e o bem-estar da população nas zonas costeiras dependem de um meio ambiente marinho saudável (KENNISH, 1992; CLARK, 1998).

1.1. Zona Costeira do Ceará e sua gestão

A zona costeira do Estado do Ceará (ZC-CE) está inserida na região conhecida como Litoral Setentrional do Nordeste, apresentando de maneira geral um litoral com clima sub-úmido, alta disponibilidade de sedimentos arenosos e influência dos ventos Alísios de Nordeste (SEMACE, 2005). Com declividade de terreno suave e serra distante da costa, ocorre a incisão linear de rios formando zonas com características demarcadas, como o tabuleiro pré-litorâneo e planícies flúvio-marinhas. Extensos campos de dunas, lagos costeiros e praias arenosas caracterizam a linha de costa, enquanto manguezais dominam a margem de rios ao longo de regiões estuarinas (LACERDA & MARINS, 2006).

O clima é controlado pela oscilação da Zona de Convergência Intertropical, que induz a precipitação, sendo a sazonalidade bem demarcada na maioria dos anos pelo período pré-chuvoso (Dezembro à Janeiro), período chuvoso (Fevereiro à Maio) e período seco (Junho à Novembro) (FUNCEME, 2010).

Segundo a Superintendência Estadual do Meio Ambiente – CE (SEMACE, 2005), um dos órgãos responsável pelo meio ambiente no Estado, os principais problemas relacionados à zona costeira cearense envolvem a urbanização, erosão da linha de costa, desmatamento de manguezais e de matas ciliares, assoreamento ou aterramento de áreas de lagoas, enchentes, poluição de recursos hídricos superficiais e subterrâneos, disposição incorreta de resíduos sólidos, áreas de mineração, ocupação irregular e carcinicultura.

Para lidar com os problemas ambientais e visando o cumprimento das diretrizes estabelecidas na Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA), a SEMACE estabeleceu

programas estratégicos que focam na aplicação de instrumentos previstos em legislação, como o Zoneamento Ecológico-Econômico Costeiro (ZEEC) e delineamento de ações para controle e monitoramento. Dentre os programas que atuam direta ou indiretamente sobre a zona costeira vale destacar o Programa Estadual de Gerenciamento Costeiro – GERCO-CE.

O GERCO-CE tem como objetivo primordial planejar e administrar a utilização dos recursos naturais da zona costeira, visando a proteção de seus ecossistemas e a melhoria da qualidade de vida das populações locais, através do uso sustentável de seus recursos naturais (SEMACE, 2003). Este engloba por sua vez os programas de Monitoramento de Balneabilidade de Praias, Controle Ambiental, Fiscalização e Monitoramento da Qualidade de Água, entre outros.

O órgão ambiental busca aplicar as diretrizes de qualidade já estabelecidas pela legislação brasileira, como nos programas de monitoramento da qualidade de água e balneabilidade de praias, onde os critérios aplicados são os previstos pela Resolução CONAMA 357-05 (BRASIL, 2005). Porém, a SEMACE ainda está se adequando as normativas da CONAMA 357-05, não tendo incluído como obrigatórios, por exemplo, estudos ecotoxicológicos nos programas de monitoramento ambiental, tanto para bacias hidrográficas e corpos hídricos (estudos conduzidos pelos órgãos ambientais), como os solicitados nos estudos para o licenciamento de empreendimentos potencialmente poluidores (estudos conduzidos pelos empreendedores) em esfera estadual.

A despeito das normas jurídicas de regulamentação, na ZC-CE definem-se quadros críticos ou potencialmente críticos de degradação ambiental, demandando ações de caráter corretivo, de mediação dos múltiplos conflitos de uso dos espaços e dos recursos naturais e de controle de impactos oriundos de atividades terrestres sobre o ambiente marinho (SEMACE, 2003).

Diversos países vêm investindo na criação de áreas protegidas como estratégia para a conservação da biodiversidade, dos recursos naturais e dos valores culturais da humanidade (BRITO, 2000). Nas duas últimas décadas, a criação de Unidades de Conservação (UC) vem correspondendo a um dos maiores esforços da sociedade cearense, incluindo o governo, os órgãos ambientais e instituições privadas, para a proteção ambiental. A criação das UC tem como objetivo conservar ecossistemas estratégicos da ZC-CE, objeto de acelerado processo de ocupação, disciplinar o uso do solo e frear a intensa degradação de regiões de importância sócio-ambiental (SEMACE, 2004). As unidades de conservação são, por definição, um

espaço territorial e seus recursos ambientais, incluindo as águas jurisdicionais, com características naturais relevantes, legalmente instituídas pelo Poder Público, com objetivos de conservação e limites definidos, sob regime especial de administração, ao qual se aplicam garantias adequadas de proteção ambiental (BRASIL, 2000).

A Declaração de Bali, elaborada durante o III Congresso Mundial de Parques, realizado em 1982, enfatiza a importância das unidades de conservação como elemento indispensável para a conservação, já que asseguram a manutenção de amostras representativas de ambientes naturais, da diversidade de espécies e de sua variabilidade genética, além de promover oportunidades para pesquisa científica, educação ambiental, turismo e outras formas menos impactantes de geração de renda (BRITO, 2000).

Visando adequar as UC instituídas no Estado do Ceará ao Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC (BRASIL, 2000), a SEMACE criou o Sistema Estadual de Unidades de Conservação (SEUC), através do qual vem avaliando a situação das UC estaduais. Esta avaliação permitiu identificar alguns pontos críticos, como a predominância de unidades de Uso Sustentável (menos restritivas), inexistência de Planos de Manejo, precariedade na infra-estrutura física e operativa, necessidade de capacitação para os gerentes das UC, informações técnicas dispersas, entre outros (SEMACE, 2010).

Apenas a criação destas áreas, sem investimento em recursos humanos e financeiros, elaboração de estudos e diagnósticos, definição do plano de manejo, monitoramento e fiscalização adequados, e sensibilização por parte dos atores sociais envolvidos, torna o instrumento ineficaz no intuito de proteger o patrimônio natural e os recursos de uma determinada região.

Segundo SEMACE (2010) o monitoramento realizado atualmente nas UC ocorre através de sobrevôos mensais, priorizando as UC de uso sustentável, no caso as Áreas de Proteção Ambiental de Aratanha, Baturité, Maranguape e as APA litorâneas. Durante o sobrevôo se observam aspectos de uso e ocupação do solo, desmatamentos e queimadas, utilização de agrotóxicos, construção civil dentre outras. Após o reconhecimento aéreo, procede-se a averiguação de campo, e quando necessário, aplica-se as ações administrativas pertinentes. O licenciamento ambiental é realizado pelos gerentes das UC, que poderão solicitar a composição de equipe técnica, conforme as especificidades que cada caso requer (SEMACE, 2010). Vale frizar que, como não há plano de manejo, não existem diretrizes

específicas que os gerentes devam considerar para gerir o uso e ocupação do solo e assegurar os interesses sócio-ambientais específicos a cada unidade.

Muito investimento e empenho se fazem necessários para assegurar a qualidade ambiental na ZC do Estado. Faltam estudos nas áreas básicas para embasar planos de ação, p.ex. estudos sobre composição e funcionamento dos ecossistemas, atores sociais envolvidos, efeitos da contaminação sobre a biota local, entre outros. Essa demanda se torna primordial para as unidades, em face da crescente pressão que as regiões vêm sofrendo.

1.2. Contaminação, sistema aquático e ecotoxicologia

Uma vez introduzidos no ambiente aquático, os contaminantes são submetidos a processos de partição, podendo se dissolver na água ou ser sorvidos pelos materiais em suspensão (sais, carbonatos, matéria orgânica, argilas, entre outros) e/ou precipitando nos sedimentos (MEYER, 2002).

De maneira geral os sedimentos são tidos como o principal destino das substâncias introduzidas nos corpos hídricos (ADAMS *et al.*, 1992), sendo premissa a acumulação de contaminantes em níveis mais elevados que a coluna d'água adjacente (NIPPER *et al.*, 1989). Os sedimentos são apenas um dos componentes dos ecossistemas, porém em muitos sistemas aquáticos podem ser a principal fonte de estresse para a saúde do meio (BURTON, 1992).

Depois de retidos nos sedimentos, processos químicos, físicos e biológicos podem resultar na liberação dos contaminantes, transformando-os e/ou disponibilizando-os. As principais formas de exposição aos sedimentos são sedimento integral, água intersticial, elutriatos e interface sedimento-água, todas estas relacionadas às vias de exposição dos organismos ao sedimento (NIPPER *et al.*, 1989; NIPPER, 1997; CESAR, 2002).

Os efeitos da contaminação dependem da via pela qual os contaminantes são absorvidos pelos organismos, como por trocas com o meio circundante (contato dérmico), alimentação direta (p.ex. ingestão, filtração) ou pela cadeia trófica, na qual os compostos passam consecutivamente para os próximos níveis tróficos (BURTON, 1992; MOZETO & ZAGATTO, 2006). O tempo de residência de certas substâncias também influencia nos efeitos da contaminação, pois esta é potencializada em ambientes menos dispersivos, o que aumentaria o tempo de contato contaminante/organismo, aumentando o risco de efeitos

nocivos decorrentes dessa contaminação (KENNISH, 1992; ARAÚJO *et al.*, 2006; MOZETO & ZAGATTO, 2006).

A Ecotoxicologia é uma ciência multidisciplinar que estuda os efeitos tóxicos de substâncias químicas biologicamente ativas sobre os organismos (MASTROTI, 1997). Possui aplicações importantes no diagnóstico e na avaliação da degradação ambiental, fornecendo informações para o controle dos impactos, bem como provendo análises de risco ecológico em programas de monitoramento ambiental, dentro dos quais fornece significado biológico para os dados de contaminação, além de prova legal, possibilitando o desenvolvimento de métodos mais eficazes para a conservação e gestão ambiental, responsabilização por danos e passivos, entre outros (ABESSA, 2002).

Atualmente, os programas de monitoramento ambiental empregam análises químicas e ensaios ecotoxicológicos para avaliar os níveis de contaminação de uma área e os efeitos biológicos dessa contaminação.

O uso de ensaios ecotoxicológicos permite a integração dos conceitos da ecologia, no que diz respeito à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico no ecossistema, e da toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas (PLAA, 1982). Os ensaios ecotoxicológicos são considerados os melhores métodos para estimar os efeitos de múltiplos contaminantes e determinar o potencial tóxico dos mesmos, desde que o organismo-teste seja sensível e os parâmetros avaliados ao final do teste (*endpoints*) bem escolhidos (USEPA, 2002). Testes de toxicidade de sedimento permitem estimar os efeitos tóxicos da exposição de um organismo a uma amostra ou substância, observando, entre outros, alterações nos estágios de desenvolvimento, reprodução, crescimento, bem como sobrevivência, permitindo assim considerações sobre a qualidade deste compartimento.

Uma das grandes vantagens dos ensaios é a capacidade de integrar os efeitos de misturas complexas e interações contaminantes-fatores abióticos sobre os organismos. Perante a complexidade do compartimento analisado, os resultados podem ser relativamente variáveis, visto que dependem das respostas de organismos vivos e de processos biológicos que por si só não são necessariamente lineares e/ou dose-dependentes.

A análise química é uma boa ferramenta para avaliação ambiental. Seu resultado, entretanto, deve ser aplicado com parcimônia, visto algumas limitações, p.ex. quantificação direta dos contaminantes não refletir necessariamente que os mesmos estejam disponíveis a biota, e que em avaliação de ambientes com misturas complexas de contaminantes, as quantificações se restringem as substâncias mais comuns, as interações e possíveis efeitos da mistura desconsiderados (p.ex. efeitos sinérgicos) (CHAPMAN & WANG, 2001; MEYER, 2002).

A complexidade química e as baixas concentrações em que alguns compostos químicos se apresentam dificultam a sua detecção e a avaliação de seus efeitos, tornando necessário o desenvolvimento de métodos capazes de indicar a exposição e os efeitos quando das baixas concentrações de poluentes que não levam à letalidade, condição comumente encontrada em ambientes marinhos (DAVID, 2007). Além disso, em programas de monitoramento ambiental é interessante que sejam analisadas espécies que ocupem diferentes nichos ecológicos, devido às propriedades dos contaminantes e a maneira como os organismos metabolizam essas substâncias (BIANCHINI *et al.*, 2006).

1.2.1 Biomarcadores

A resposta biológica às agressões ambientais pode ser evidenciada em qualquer nível de organização biológica, desde ecossistemas até reações bioquímicas intracelulares (MAYER *et al.*, 1992; RAND *et al.*, 1995).

Os biomarcadores são considerados alterações fisiológicas, bioquímicas, moleculares, celulares e comportamentais em resposta ao estresse, atuando como indicadores de exposição e/ou efeito à xenobióticos (RAND *et al.*, 1995).

Biomarcadores de exposição são qualquer alteração biológica mensurável que evidencie a exposição dos organismos a um poluente específico (ou classe de poluente), enquanto biomarcadores de efeito, ou biomarcadores não específicos, evidenciam efeito associado à exposição do organismo a fatores de estresse, i.e. múltiplos contaminantes e/ou variações ambientais extremas, pois todos os tipos de estresse podem afetar o *endpoint* analisado (MAYER *et al.*, 1992; BIANCHINI *et al.*, 2006).

Uma vez exposto a um fator de estresse, um dos primeiros sinais de alteração no organismo são respostas fisiológicas, moleculares e bioquímicas, disparadas visando adequação a condição e retorno ao estado ótimo pretérito à exposição, através das vias metabólicas necessárias; quando o fator de estresse consiste na exposição/absorção de um poluente, as atividades dentro do organismo focam na metabolização, imobilização e/ou excreção da substância. As possíveis vias de metabolização e eliminação de um composto também dependem das características do mesmo, como a solubilidade em água, pois quanto menos solúvel o composto, maior o caminho que ele percorrerá até a total metabolização (que pode resultar em total excreção ou mesmo o acúmulo de metabólitos nos tecidos (MELANCON *et al.*, 1992; LEHNINGER *et al.*, 2006).

A metabolização de xenobióticos envolve comumente dois tipos de reações enzimáticas de detoxificação (MELANCON *et al.*, 1992): reações de fase I e de fase II.

As reações de fase I são o primeiro caminho metabólico pelo qual compostos hidrofóbicos percorrem: grupos polares são introduzidos na molécula do composto através de processos oxidativos, hidrolíticos ou de redução, formando um produto passível de excreção ou tornando-o um substrato adequado (mais eletrofílico) para os processos que caracterizam a fase II. Durante a fase II, os produtos da ação enzimática da fase I sobre os xenobióticos são novamente biotransformados: uma espécie endógena é ligada, por intermédio de uma enzima, a um grupo polar funcional. Esse processo, nesses termos, é conhecido como conjugação, resultando em produtos secundários normalmente menos tóxicos que o xenobiótico original, altamente hidrosolúveis, que são imediatamente excretados via bile, rim ou brônquias; também podem ser hidrolizados e os metabólitos livres reabsorvidos. Os principais agentes de conjugação e as enzimas que catalizam as reações de fase II são UDP glucuroniltransferase, glutathione S-transferase (GST), sulfotransferase, e acetilação por enzimas acetiltransferases (MELANCON *et al.*, 1992; MANAHAN, 2001).

Glutathione S-transferases são uma família de enzimas diméricas multifuncionais que vêm sendo utilizadas amplamente como biomarcadores para estimar exposição a estresse ambiental em organismos aquáticos. Na fase II de detoxificação são responsáveis pela catalização da reação de conjugação da glutathione reduzida (GSH) com xenobióticos e substâncias endógenas; participam tanto da detoxificação de xenobióticos (compostos orgânicos, metais, entre outros) quanto da proteção em eventos de estresse oxidativo e do transporte de substâncias endógenas e exógenas em diversos organismos, incluindo crustáceos, auxiliando na homeostase dos indivíduos (VAN DER OOST *et al.*, 2003;

HERMES-LIMA, 2004; CUNHA *et al.*, 2007; MARTÍN-DÍAZ *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2009).

É importante frisar que as reações de fase I e fase II podem formar subprodutos tóxicos mais reativos que o composto inicial, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS), e aldeídos produtos da peroxidação lipídica, capazes de estabelecer ligações covalentes com macromoléculas, resultando em danos subcelulares (figura 1); essas ligações covalentes são consideradas o evento inicial para muitos processos toxicológicos como mutagênese, carcinogênese, necrose e apoptose celular (MELANCON *et al.*, 1992; ALMEIDA *et al.*, 2007; MARTÍN-DÍAZ *et al.*, 2007b).

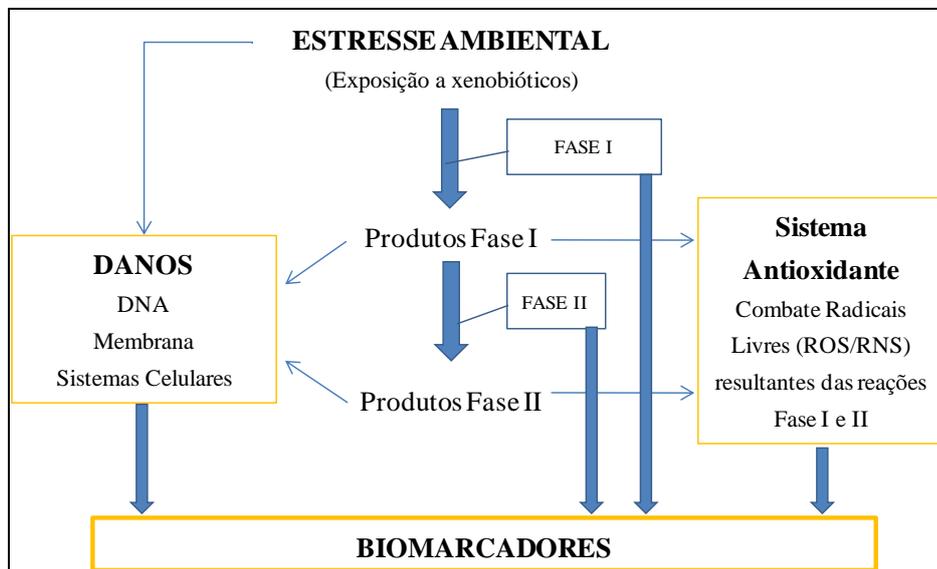


Figura 1: Esquema ilustra fontes de possíveis biomarcadores dos processos e efeitos desencadeados por estresse ambiental., como lesões em componentes celulares (i.e. DNA e compostos lipídicos), atividade de enzimas das fases I e II, e ativação do sistema antioxidante (adaptado de Almeida *et al.*, 2007 e Martín-Díaz *et al.*, 2007b).

Dentre as famílias de enzimas mais conhecidas está a das Colinesterases (ChE), que inclui as acetilcolinesterases (AChE) e as pseudocolinesterases, grupo que envolve as Butirilcolinesterases, Propionilcolinesterases e outras isoformas (PChE). Enquanto a AChE é de suma importância para a neurotransmissão, sendo responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, as PChE degradam alguns xenobióticos e parecem apresentar ação protetora perante a AChE, visto que atuam sobre os agentes anticolinérgicos e diminuem a ação destes diretamente sobre a AChE. Também existem relatos da hidrólise do

substrato acetilcolina pelas PChE (MASSOULIÈ *et al.*, 1993; BROWN *et al.*, 2004; VIARENGO *et al.*, 2007).

Consideradas, em um primeiro momento, biomarcadores de exposição específicos, devido à alta inibição da atividade relacionada à exposição aos pesticidas organofosforados e carbamatos, alguns estudos hoje indicam a inibição e/ou ativação das colinesterases também por alguns metais (i.e. mercúrio), surfactantes, pesticidas piretróides, componentes dos óleos combustíveis e misturas complexas de poluentes em altas concentrações, levantando dúvidas quanto a sua especificidade. Apesar disso, ainda hoje as colinesterases são aplicadas em estudos com pesticidas e organofosforados, e ainda são consideradas indicadores da ocorrência destes compostos no meio ambiente (MAYER *et al.*, 1992; GUILHERMINO *et al.*, 1998; McLOUGHLIN *et al.*, 2000; ELUMALAI *et al.*, 2002; QUINTANEIRO *et al.*, 2006).

Danos no material genético vêm sendo associados com efeitos deletérios em organismos aquáticos, como redução no crescimento, desenvolvimento anormal e sobrevivência reduzida de embriões, larvas e indivíduos adultos.

As lesões no DNA envolvem quebra de fita (simples ou dupla), modificação de pares de base, problemas relacionados à troca entre os cromossomos e trocas DNA - proteínas (*crosslinks*). As quebras da fita de DNA podem ser causadas diretamente por compostos genotóxicos ou secundariamente por radicais de oxigênio e outros compostos reativos que são subproduto dos processos de detoxificação (LEE & STEINERT, 2003; AKCHA *et al.*, 2004; DHAWAN *et al.*, 2009).

Diversos métodos podem ser aplicados para verificação e quantificação das quebras de fita de DNA. Um dos mais empregados é o Teste do Cometa (*comet assay* ou *single cell gel assay*), utilizado tanto para quantificar danos diretamente, como para observar a atuação dos mecanismos de reparo indiretamente, através da exposição *in vivo* ou *in vitro* e posterior quantificação de dano ao longo do tempo. O ensaio apresenta a vantagem de ser sensível, sendo capaz de detectar baixos níveis de danos (uma quebra por 10^{10} Da de DNA) em relação a outros testes de genotoxicidade (DHAWAN *et al.*, 2009)

O ensaio do cometa foi considerado por LEE *et al.* (2003) e WOO *et al.* (2006) como uma ferramenta eficiente na detecção de danos no DNA em invertebrados marinhos e de água doce, assim como na avaliação da contaminação de sedimentos marinhos e estuarinos coletados de regiões costeiras. Devido a sua flexibilidade, ensaios de detecção de dano no

DNA com organismos provenientes de áreas degradadas devem ser combinados e incorporados a uma bateria de testes, provendo informações adicionais sobre a contaminação, e garantindo uma interpretação correta do resultado obtido (VASQUEZ, 2009).

O uso de biomarcadores em estudos ambientais é de extrema importância, visto que a detecção prévia de estresse em níveis sub-letais (*early-warning*) fornece subsídios para a gestão ambiental (NASCIMENTO *et al.*, 2006), com a vantagem de apresentar alta sensibilidade, curto prazo de resposta e baixo custo.

Avaliações de risco ambiental aplicando biomarcadores vêm crescendo (FOSSI *et al.*, 2000). Vários autores utilizam o conceito em organismos aquáticos, semi-terrestres e terrestres dos mais diversos grupos e hábitos: vertebrados, invertebrados, vegetais, fungos; bentônicos, demersais ou da coluna d'água; sésseis ou de mobilidade variável; onívoros, detritívoros, suspensívoros, filtradores; entre outros. Alguns destes estudos lidam com organismos *in situ* e integram biomarcadores a outros testes e análises (em geral análises químicas), abordagem que permite explorar possíveis relações entre as respostas nos diferentes níveis de organização biológica e a complexidade do meio e suas relações (ASTLEY *et al.*, 1999; CAIRRÃO *et al.*, 2004; MARTÍN-DÍAS *et al.*, 2005; MAGNI *et al.*, 2006; QUINTANEIRO *et al.*, 2006; ZANETTE *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2007; DAVID, 2007; ELUMALAI *et al.*, 2007; LIMAVERDE *et al.*, 2007; MONSERRAT *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2007; RANK *et al.*, 2007; TOGNI, 2007; GORBI *et al.*, 2008; TORRES, 2009; ZHOU *et al.*, 2009; VIDAL-LIÑÁN *et al.*, 2010). Além disso, existe um esforço para adequação de testes, validação de metodologias e eleição de espécies que possam ser consideradas boas como biomonitoras de ambientes e representativas dentro dos diferentes ecossistemas, incluindo os ecossistemas estuarinos.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é comparar a qualidade ambiental de dois estuários da Região Metropolitana de Fortaleza (APA do Estuário do Rio Ceará e do Estuário do Rio Pacoti) com diferentes graus de degradação, utilizando análises biológicas (biomarcadores ChE, Glutathione S-Transferase, dano no DNA) além de testes de toxicidade crônica dos sedimentos.

Os objetivos específicos são:

- avaliar a qualidade dos sedimentos por meio dos testes de toxicidade crônica;
- avaliar correspondência de respostas entre biomarcadores de efeito e exposição;
- observar se há correspondência entre os efeitos indicados a partir de análises de biomarcadores e testes de toxicidade do sedimento;
- avaliar a utilização do organismo *Goniopsis cruentata* como possível organismo sentinela.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

O Programa Estadual de Gerenciamento Costeiro do Ceará – GERCO/CE divide a zona costeira do estado em quatro setores: Setor I - Costa Leste; Setor II - Costa Metropolitana; Setor III - Costa Oeste; Setor IV - Costa Extremo Oeste.

Os estuários enfoques do presente estudo estão inseridos no Setor II, mais especificamente na Região Metropolitana de Fortaleza (RMF) ilustrada na figura 2. São eles: Rio Ceará (RC) e Rio Pacoti.

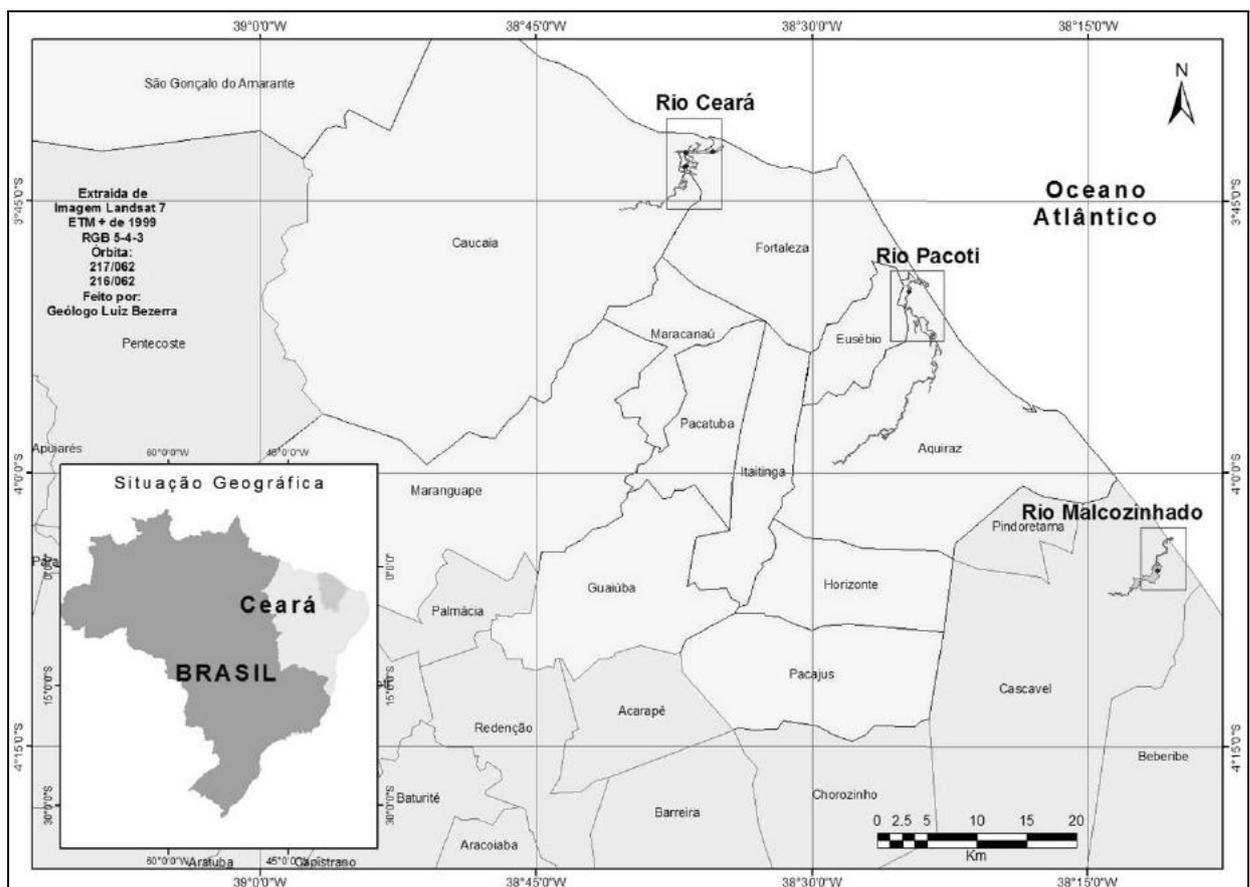


Figura 2: Mapa da Região Metropolitana de Fortaleza – CE. Destaque para o Rio Ceará e Rio Pacoti. *Fonte: Nilin, 2008.*

3.1.1. Estuário do Rio Ceará

O Rio Ceará é um dos principais afluentes que deságuam na zona costeira do Ceará. Com cerca de 60 km de extensão, desde a nascente na Serra de Maranguape até a foz entre as cidades de Fortaleza e Caucaia, bacia de drenagem com cerca de 600 km² (SEMACE, 2005).

A foz do Rio Ceará (RC) apresenta a formação de um *spit* arenoso decorrente de intervenção antrópica na linha de costa, fazendo com que a largura da foz seja equivalente a 60 m, se abrindo em 250 m logo acima desta. Esse *spit* intensifica o assoreamento do estuário, diminui a contribuição do rio com material arenoso e matéria orgânica ao mar adjacente. A influência da maré pode ser observada até 14 km partindo da foz, classificada como planície flúvio-marinha, com ocorrência da floresta de mangue, após a qual se observa mudança gradual para uma cobertura vegetal tipicamente continental (SEMACE, 2005).

A porção estuarina foi recentemente classificada com área de proteção ambiental, a APA do Estuário do Rio Ceará (Decreto Estadual 25.413/09), por abrigar ecossistemas de grande valor ecológico e turístico, e pela natural fragilidade do equilíbrio ecológico deste estuário, que hoje se encontra em permanente estado de risco, face às intervenções antrópicas (CEARÁ, 1999).

A APA é uma das regiões mais estudadas no Estado, sendo uma das poucas áreas de proteção que apresenta plano de manejo já elaborado. Este, porém, ainda não foi publicado em Diário Oficial pelo estado, não exercendo, portanto, seu valor legal quanto a sua aplicação para gestão do território e delimitação dos usos previstos.

Hoje, as principais atividades da região da APA são pesca artesanal, agricultura e urbanização residencial (SEMACE, 2005), havendo também cais de atracação para pequenas embarcações na desembocadura e navegação turística ao longo do estuário.

Entre as principais fontes de poluição para o estuário do RC estão o Distrito Industrial de Maracanaú que despeja seus efluentes no rio Maranguapinho (principal afluente do Rio Ceará, a 7 km da foz), e fontes difusas de poluição relacionadas à ocupação desordenada do solo na região, decorrentes da falta de ações efetivas de gestão sobre os usos múltiplos da região, a favelização, entre outros (SEMACE, 2005). O Distrito Industrial de Maracanaú, criado há pouco mais de 40 anos, é o mais importante distrito do Estado, concentrando 1/3 da produção cearense; reúne cerca de 100 empresas de diversas áreas de atuação, como por

exemplo, têxteis, metalurgia e mecânica, papel e papelão, material elétrico, químico, de vestuário, calçados e serviços de construção (MARACANAÚ, 2010). Muitas indústrias não tratam seus efluentes, sendo estes lançados na rede de coleta pública ou nos recursos hídricos próximos (JUVÊNCIO, 1997).

Poucos estudos ambientais foram realizados visando avaliar a qualidade ambiental do Rio Ceará. Dentre eles, alguns estudos recentes avaliaram água e sedimentos da região, sendo observada a ocorrência de toxicidade aguda e crônica no estuário (NILIN *et al.*, 2007; NILIN, 2008), e contaminação por cobre (Cu) e zinco (Zn) de origem antrópica (AGUIAR *et al.*, 2004). Também foi observada biocumulação de mercúrio (Hg) em ostras da região (VAISMAN *et al.*, 2005), indicando presença de contaminantes na biota.

3.1.2. Estuário do Rio Pacoti

O rio Pacoti é um dos principais da Região Metropolitana de Fortaleza (RMF). Com um total de 150 km de comprimento, a região estuarina representa cerca de 17 km, delimitada pela zona de influência da maré e ocorrência da floresta de mangue, permeando os municípios de Aquiraz, Eusébio e Fortaleza; a influência da maré se traduz em variações de salinidade entre 0 e 33 no estuário, chegando abaixo de 0,5 no alto estuário em períodos chuvosos. O rio e sua bacia são de grande importância para o abastecimento de água da região metropolitana, além de prover recursos para sustento da população ribeirinha. (IRVING *et al.*, 1988). Há indústrias e serviços de apoio à atividade turística e à população local, bem como um importante pólo de artesanato em rendas e bordados. A implantação de empreendimentos imobiliários de vulto na região da bacia de drenagem, como o Porto das Dunas e o Alphaville, estimulou o crescimento populacional da região da bacia e áreas adjacentes.

O município possui bom potencial para atividade agrícola, capaz de contribuir para o abastecimento da Região Metropolitana. Culturas cíclicas (milho, feijão e mandioca) e fruticultura diversificada são os usos agrícolas principais. Possui, também, o município notória tradição na avicultura (Aguiar, 2005).

Devido à importância da região (apresenta remanescentes de Mata Atlântica, por exemplo), a mesma foi designada como Área de Proteção Ambiental com a criação da APA do Estuário do Rio Pacoti (Decreto Estadual no. 25.778), além da criação do Corredor Ecológico do Pacoti (Decreto Estadual no. 25.777), que interliga as APA do Estuário do Rio

Pacoti e da Serra de Baturité (CEARÁ, 2000a; 2000b). Nenhuma destas APA apresenta plano de manejo estabelecido.

Segundo Gorayeb (2005) e Semace (2010), os principais impactos na região são fontes difusas de esgotos relacionadas às atividades de turismo e lazer, disposição de resíduos sólidos, uso e ocupação irregular do solo, como urbanização, culturas agrícolas substituindo cobertura vegetal típica, extração de madeira, barramentos e desvios no curso do rio e conseqüente aceleração dos processos erosivos, de assoreamento e de diminuição da biodiversidade local.

Alguns estudos consideraram a região da APA do Rio Pacoti inicialmente como área referência para comparação de dados em relação à contaminação e seus efeitos nos organismos, por se tratar de uma região com menores índices de urbanização e industrialização. Todavia, foi observado por esses autores um comprometimento da qualidade do estuário nos parâmetros analisados, enquadrando a região como comprometida, mas em um grau menor de degradação quando comparado com os outros estuários da RMF (AGUIAR, 2005; TORRES, 2009; NILIN, 2008).

3.2. Organismo-teste

O grupo dos invertebrados é muito utilizado em estudos ecotoxicológicos por representar quase 95% das espécies animais conhecidas, ser o maior componente de todos os ecossistemas descritos e por apresentar populações numerosas, o que permite a amostragem de indivíduos sem afetar significativamente a dinâmica da população (BRUSCA & BRUSCA, 2003; FOSSI *et al.*, 2000).

Dentre os invertebrados, os crustáceos constituem um grupo interessante para avaliações ecotoxicológicas de sistemas estuarinos e manguezais, visto que é um dos grupos de maior representatividade nesses ecossistemas, ocupando praticamente todos os nichos, com diversas espécies-chave e importante para o fluxo de energia no sistema (MELO, 1996; BRUSCA & BRUSCA, 2003), se enquadrando nos requisitos básicos em torno da representatividade ecológica necessária a espécies utilizadas em abordagens ecotoxicológicas (CHAPMAN, 2002).

Os crustáceos braquiúros representam a fauna característica dos manguezais, possuindo um papel importante na cadeia alimentar e na aceleração do processo de decomposição da matéria orgânica. Os caranguejos, por terem o hábito de viver em tocas, promovem um constante revolvimento do substrato, contribuindo para sua aeração e liberação de substâncias, por exemplo, nutrientes para a coluna d'água, além de muitas espécies constituírem fontes de renda e proteína animal para as populações locais (COSTA, 1995; SILVA, 2007).

O emprego de decápodes em estudos ecotoxicológicos vem se ampliando nos últimos anos, visando suprir a necessidade de organismos de diferentes níveis tróficos para a avaliação do ambiente, com estudos recentes utilizando caranguejos, como *Carcinus maenas* e *Neohelice granulata*, siris do gênero *Callinectes*, entre outros (SKAGGS & HENRY, 2002; BROWN *et al.*, 2004; MARTÍN-DÍAZ *et al.*, 2007a; TOGNI, 2009; SÁ *et al.*, 2008).

Nesse contexto, o organismo-teste utilizado no presente estudo foi o caranguejo *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803) (Crustacea – Decapoda – Grapsidae), devido a sua ampla distribuição, ocorrência ao longo de todo ano e por apresentar um hábito que integra a complexidade do ambiente estudado ao ocupar a maioria dos microhabitats do ecossistema manguezal. A espécie, segundo Melo (1996), apresenta distribuição no Atlântico Oriental (Senegal a Angola) e Ocidental (Bermuda, Flórida, Golfo do México, Antilhas, Guianas e Brasil – Pará a Santa Catarina, com registros em Fernando de Noronha).

Goniopsis cruentata é considerado um organismo semi-terrestre, que pode ser encontrado do supra-litoral até o entre-marés, em praias lodosas, braços de mar ou estuários, e em regiões de manguezal, ocupando áreas como raízes e troncos das árvores de mangue, tocas escavadas por outros macroinvertebrados, poças lamosas, sob a serrapilheira, e o ambiente aquático por curto período de tempo (MELO, 1996; COBO & FRANSOZO, 2003). Por ser extremamente ágil, é capaz de desenvolver velocidade, deslocando-se rapidamente quando em fuga ou busca por alimento.

Ativo quando da maré baixa, *G. cruentata* é onívoro, se alimentando principalmente de propágulos e folhas de mangue, detritos, e pequenos crustáceos vivos ou mortos; seu papel ecológico vai da herbivoria à predação (MELO, 1996; COBO & FRANSOZO, 2003; MOURA & COELHO, 2004). No Ceará é utilizado como fonte alternativa de alimentação e renda por populações tradicionais e ribeirinhas (SOUZA, 2009). Essas características o tornam interessante para atuar como um possível bioindicador de ambientes estuarinos, pois

integra a complexidade do manguezal ao ocupar os mais diversos nichos desse ecossistema, além de ser uma espécie explorada pela população local.

3.3. Amostragem

As coletas foram realizadas nos Estuários do Rio Pacoti e Rio Ceará durante o período pós-chuva, nos meses de Setembro (rio Pacoti) e Outubro (rio Ceará) do ano de 2009. Os pontos de coleta foram devidamente registrados com auxílio do GSP para posterior localização no mapa. No Rio Ceará foram determinados 3 pontos de coleta (figura 3), enquanto no Rio Pacoti (figura 4), inicialmente considerado referência para o presente estudo, foi determinado um único ponto de amostragem.



Figura 3: Estações Estuário do Rio Ceará (foz S 3°42.046' – W 38°35.471'); Datum: WGS 84 – Fonte: Google Earth™.



Figura 4: Estação Estuário do Rio Pacoti (foz S 3°49.538' – W 38° 24.124'); Datum: WGS 84 – Fonte: Google Earth™.

Os exemplares de *G. cruentata* foram “capturados” por meio de vara de pesca com isca de peixe, em maré baixa, nos braços e manchas de mangue descobertas. O esforço de amostragem consistiu em uma hora por ponto ou um mínimo de 10 animais, para os pontos do Rio Ceará. No Rio Pacoti foi amostrado um total de 30 animais. Os organismos foram então acondicionados vivos em caixas térmicas, com uma camada de 3cm de água do local de coleta, com passagem de ar aberta, mantido ao abrigo do sol, até transporte para laboratório, onde foram mantidos nas caixas térmicas, em ambiente escuro, temperatura controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), processados para as análises em até 24hrs depois da coleta.

As amostras de sedimentos, para análises ecotoxicológicas, granulométrica e dos teores de matéria orgânica e carbonatos, foram coletadas com o auxílio de uma pá, correspondendo à camada superficial de sedimento (2 a 3 cm de profundidade). As amostras de água foram coletadas da superfície, para análise das variáveis físico-químicas em laboratório (pH, oxigênio dissolvido, salinidade), utilizando frasco âmbar, rinsado três vezes com água do local antes de acondicionar a amostra. As amostras de sedimento foram acondicionadas em sacos plásticos, e levadas ao laboratório em isopor com gelo (resfriamento a 4°C), ao abrigo da luz, assim como as amostras de água, que para as medidas das variáveis físico-químicas foi retornada as condições de temperatura ambiente.

3.4. Biomarcadores

3.4.1. Processamento do Material Biológico

Os exemplares de *G. cruentata*, devidamente identificados em laboratório quanto a sexo, peso e tamanho (comprimento e largura – figura 4), foram levados à condição letárgica através da baixa de metabolismo por resfriamento em gelo. Em seguida foi realizada a retirada de hemolinfa para o Teste do Cometa, com posterior dissecação do organismo para retirada das brânquias, que foram pesadas e imediatamente congeladas em -20°C .



Figura 4: Exemplar de *G. cruentata* utilizado no presente estudo; (a) largura; (b) comprimento. Foto: autor.

O tecido branquial foi retirado para a realização das análises com biomarcadores bioquímicos, por esse órgão estar em contato direto com o ambiente, sendo considerado a primeira barreira direta à entrada de xenobióticos, além de participar tanto das trocas gasosas quando da transformação/excreção de muitos metabólitos produzidos pelos crustáceos em geral (MASUI *et al.*, 2002). Devido à diferença funcional da estrutura branquial (brânquias

anteriores respondem pelas trocas gasosas e brânquias posteriores pela excreção), cada organismo teve o trio branquial anterior e o trio branquial posterior analisados separadamente.

Para a homogeneização do material foi definido o Tampão Fosfato de Potássio (0,1M, pH 7.2). Duas soluções estoque foram preparadas: Fosfato de potássio monobásico 0,1M (KH_2PO_4 ; pH=4.53); e Fosfato de potássio dibásico 0,1M (K_2HPO_4 ; pH=9.48) (Sigma-aldrich). As soluções estoque foram misturadas (solução ácida adicionada à básica), até a estabilização do pH em 7.2 (QUINTANEIRO, *et al.*, 2006).

Os tecidos foram gradualmente descongelados sobre gelo, e em seguida misturados ao tampão de homogeneização gelado, na proporção 1:5 (1g de tecido:4mL de tampão). A homogeneização foi feita manualmente com auxílio de pistilo e tubo de vidro (*potter* Sigma-aldrich), sobre o gelo. Os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 10000 rotações por minuto, durante 30 minutos. A fração citosólica resultante, utilizada no presente estudo, foi aliquotada e congelada em freezer -20°C para as análises posteriores.

3.4.2. Quantificação de Proteínas

A dosagem de proteínas na amostra foi realizada seguindo o Método de Lowry (1951), adaptado para leitura em microplaca de 96 poços, utilizando-se um kit da marca BioRad.

A partir de uma solução padrão de albumina sérica bovina 1mg/mL (BSA, Sigma-aldrich) foram feitas concentrações para traçar a curva padrão de proteína (0,0; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0 mg/mL) visando à obtenção da equação de regressão linear, utilizada na determinação das concentrações de proteína das amostras.

Para a quantificação, 5 μ L da amostra foram acondicionadas num poço ao qual foram adicionados 25 μ L do reagente A' (preparado a partir dos reagentes S e A) e 200 μ L do reagente B, sendo que a leitura ocorreu após 15 minutos da adição do ultimo reagente. As absorbâncias das amostras, assim como os pontos da curva padrão, foram lidas em quadruplicata, à λ 595nm, espectrofotômetro de microplaca (DTX-880, Beckman Coulter).

3.4.3. Glutathione S-transferase

O princípio do método, descrito por Keen *et al.* (1976), baseia-se na detecção da formação de um tioéter (S-2,4-dinitrofenilglutathione), este por sua vez produto da conjugação do substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a GSH (glutathione reduzida), pela ação da enzima glutathione S-transferase, caracterizando então uma medida indireta da atividade da GST.

O protocolo adotado por este estudo é a adaptação da metodologia de Keen *et al.* (1976) às espécies estuarinas brasileiras, realizada por Monserrat *et al.* (2006). A reação de Conjugação do CDNB (0,1M, Sigma-Aldrich) com GSH (0,1M, Sigma-Aldrich) realizou-se em meio Tampão Fosfato de Potássio pH 7.0. As amostras foram lidas em quadruplicata, a formação do tioéter monitorada em espectrofotômetro (FEMTO Scan), no comprimento de onda de 340 nm, a 25°C, em intervalos de 30 segundos, durante 2,5 minutos, registrando-se o aumento da absorbância ao longo do tempo.

O cálculo da atividade enzimática (AE), expressa em unidades de enzima necessárias para catalisar a formação de 1 µmol de produto/minuto/miligrama de proteína (U/mg de proteína), foi realizado a partir dos dados obtidos de aumento da absorbância e quantificação de proteínas, aplicando-se a fórmula abaixo:

$$AE = \Delta ABS * Dam / (\epsilon * Vam * [prot] * Dprot * t)$$

Onde:

ΔABS = variação (aumento) de absorbância

Dam = diluição da amostra

ϵ = coeficiente de extinção molar do CDNB ($9,6 \times 10^4$)

Vam = volume de amostra lido (mL)

[prot] = concentração de proteínas (mg/mL)

Dprot = diluição da proteína

t = tempo de leitura (minutos)

3.4.4. Colinesterase (ChE)

Para a quantificação da ChE utilizou-se o método clássico descrito por Ellman *et al.* (1961), e adaptado para leitor de microplaca por Guilhermino *et al.* (1996), onde enzimas do grupo ChE, predominantemente a acetilcolinesterase, degradam o substrato acetiltiocolina em tiocolina e acetato. A tiocolina complexa com o DTNB levando à formação de um composto de cor amarela. A formação deste composto pode ser monitorizada a aproximadamente 414 nm, registrando-se um aumento de absorbância ao longo do tempo.

Para o presente estudo foram preparadas solução Tampão Fosfato (0,1M pH 7.2), solução A (iodeto de acetilcolina, 0,075M, Sigma-aldrich) em água ultra-pura, solução de B (DTNB - ácido 5,5-ditiobis2-nitrobenzóico, 10mM; NaHCO₃, 17,85mM, Sigma-aldrich) em tampão fosfato. A solução de reação foi então preparada (30 ml de tampão fosfato; 0,2 ml da solução A; 1,0 ml da solução B), utilizada em no máximo 15 minutos após o preparo.

Para a análise, 250µl de solução de reação são adicionados a 50µl de amostra; após 10 minutos iniciou-se a primeira das três leituras, realizadas em intervalos de 5 minutos, $\lambda \approx 414\text{nm}$, no espectrofotômetro de microplaca (DTX-880, Beckman Coulter).

O cálculo da atividade enzimática (AE), baseado na Lei de Beer-Lambert, é representado pela equação abaixo, dada em nmol de NTB/min/miligramma de proteína (U/mg de proteína):

$$AE = (\Delta ABS/\epsilon * d) * (1/(V_{amostra}/V_{final})) * (1/[prot]) * 10^6$$

Onde:

ΔABS = delta do aumento da absorbância entre o último e primeiro valor de leitura;

d = 0,9 cm (diâmetro do orifício da microplaca);

ϵ = coeficiente de extinção molar do DTNB ($1,36 \times 10^4$);

V = volume;

$[prot]$ = concentração de proteína;

No presente estudo não foi determinado o tipo de Colinesterase predominante no tecido branquial do *G. cruentata*. Apesar da metodologia aplicada para a avaliação da

atividade enzimática empregar a acetilcolina como substrato, degradado principalmente pela ação de AChE, como não foram utilizados inibidores de AChE não se pode afirmar que a degradação ocorreu única e exclusivamente em virtude da ação desta enzima e não por outras colinesterases, como também não se pode afirmar que a AChE é a enzima colinesterase predominante no tecido.

Em decorrência da discussão sobre o tipo enzimático, apesar de aplicarmos o substrato acetilcolina nos ensaios, trataremos as enzimas apenas como colinesterases (ChE).

3.4.5. Teste do Cometa

O Teste do Cometa, ou *Single Cell Gel Assay* pode ser realizado com qualquer célula de eucarionte, necessita de um número pequeno de células, e tem grande sensibilidade. Nele, núcleos celulares isolados, previamente expostos *in vitro* ou *in vivo* a agentes mutagênicos, são aplicados em um gel de agarose sobre uma lâmina, suas membranas são lisadas com detergente, seguindo por um tratamento com solução alcalina forte para extração das proteínas nucleares, que sofrem um relaxamento e desnovelamento do DNA. O produto então passa por uma micro-eletroforese numa cuba horizontal, onde qualquer fragmento de DNA (que é carregado negativamente) migra em direção ao ânodo. Após coloração, qualquer quebra (simples e dupla) na fita de DNA é observada, e apresenta a forma de uma “cauda de cometa”, a ser analisada visualmente ou por programas desenvolvidos para este fim, sendo os padrões de observação bem estabelecidos e de boa confiabilidade (UMBUZEIRO & ROUBICEK, 2006).

Para o presente estudo, o teste do cometa seguiu o protocolo desenvolvido por Singh *et al.* (1988), adaptações no tempo de *unwinding*, adequando o teste à hemolinfa do *G. cruentata*. Primeiramente as lâminas foram lavadas em Detertec 10%, enxaguadas em água corrente, rinsadas com água destilada e deixadas de molho em álcool etílico 70%, por no mínimo 3 horas. Depois de retiradas do álcool, foram secas e então receberam a primeira camada de agarose (agarose padrão 1,5% em tampão fosfato de sódio - pH 7,4), deixadas para secagem *overnight*.

A hemolinfa dos organismos foi extraída com uma seringa hipodérmica (agulha 22G) previamente lavada com solução de EDTA 10 mM, contendo solução de citrato de sódio 1%

na proporção 1:1, para evitar a coagulação das células. Uma alíquota de 20µL do material retirado foi acondicionada em microtubo, à qual foram adicionados 180 µL de agarose baixo ponto de fusão 0,75%. Cada lâmina recebeu 100 µL da solução de células (duas lâminas por organismo), sendo imediatamente recoberta por lamínula e levada ao congelador por 3 minutos, para solidificação da segunda camada de solução de células e retirada da lamínula.

As lâminas foram então submersas em solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Triton X-100 1%, DMSO 10%, pH 10,5, 4°C), por um período mínimo de 3 horas. Após esse período, o material foi levado a solução de eletroforese (NaOH 0,3M, EDTA 1,25mM, pH>13, 4°C, 10 à 15 minutos) para relaxamento do DNA, e posterior corrida (270mA, 21V, 15 minutos). Logo em seguida, as lâminas foram imersas em solução tampão de neutralização (Tris 0,4M, pH 7,5, 15 minutos), e em Etanol P.A. a 4°C durante 5 minutos para fixação.

A coloração escolhida para o presente estudo foi nitrato de prata: as lâminas foram imersas em Solução A (fixadora, composta de Ácido Tricloroacético 15%, Sulfato de Zinco 5%, Glicerol 5%), gelada, por 10 minutos; em seguida foram retiradas, lavadas em água destilada gelada e deixadas para secar *overnight*. Quando do início da segunda etapa do procedimento de coloração, realizado no escuro, as lâminas foram re-hidratadas em água destilada, 37°C, por 5 minutos. A Solução B (Carbonato de Sódio 5%) e a Solução C (Nitrato de amônia 0,1%, Nitrato de prata 0,1%, Ácido Silicotungstico 0,25%, Formaldeído 0,15%) compuseram a Solução de trabalho (66mL solução B e 34mL solução C), onde as lâminas foram coradas por cerca de 2 minutos, a 37°C, e depois imersas em água destilada gelada por 3 vezes para lavagem, e em solução de interrupção de coloração (ácido acético glacial 1%) por 5 minutos, enxaguadas com água novamente.

A análise dos dados foi realizada por meio da quantificação visual, onde 100 células de cada organismo foram classificadas em cinco classes de danos, variando do zero (ausência de dano) a quatro (alto dano e células apoptóticas) (figura 5). A partir dessa classificação foi feito o cálculo do índice de dano (ID) de acordo com Villela *et al.* (2007) para obtenção de um único valor visando à comparação dos resultados; os valores para cada ponto podem variar de 0 (dano inexistente) a 400 (todas as células com alto índice de danos).

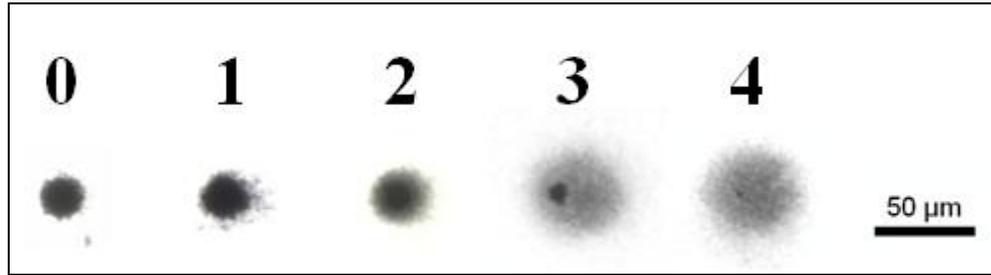


Figura 5: Classes de danos de hemolinfa de *G. cruentata* elaborada através de exposição à Peróxido de Hidrogênio 40 μ M (controle positivo).

3.5. Sedimentos

Ao considerar o estudo dos sedimentos por uma abordagem ecotoxicológica, é indicada a observação das vias de exposição dos organismos ao sedimento em questão. (NIPPER, 1997).

No presente estudo foram consideradas as seguintes formas de exposição: sedimento integral, por ser um componente ambiental adequado para indicar a qualidade de um ecossistema aquático, já que é um importante substrato para diversos organismos, e integra a exposição via contato direto (dérmico) com a fase sólida do sedimento e com a água intersticial, e a exposição pela via alimentar; interface sedimento-água por ser um indicativo do potencial dos sedimentos para afetar a coluna d'água imediatamente adjacente e, por conseguinte, os organismos demersais, além de outras relações ecológicas que possam ser estabelecidas.

Os sedimentos foram analisados quanto ao potencial tóxico, características granulométricas, teor de matéria orgânica e carbonato.

3.5.1. Teste de toxicidade de Interface Sedimento-Água

No presente estudo, foi observado o desenvolvimento embrionário dos gametas de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) expostos ao sistema Interface

Sedimento-Água (ISA) delineado por Anderson *et al.* (2001), adaptado ao tubo de ensaio por Cesar (2002). O organismo-teste (ovos recém fecundados de *L. variegatus*) é considerado sensível aos efeitos da poluição, e vem sendo utilizado com sucesso por diversos pesquisadores, devido à sensibilidade, facilidade de obtenção de gametas, baixo custo, rapidez na execução dos experimentos e ocorrência cosmopolita (PRÓSPERI & ARAÚJO, 2002).

Para preparação da exposição interface sedimento-água, uma porção de 2mL de sedimento foi acondicionada em tubo de ensaio, 4 réplicas por amostra. Sobre cada porção foi colocada uma rede de plâncton de 45µm fixada por um anel plástico esterilizado, possibilitando a recuperação das larvas ao final do teste. Em seguida foram adicionados 8 ml de água de diluição ao sistema, que permaneceu nas condições controladas de temperatura (25°C) por um período de 24h, para que ocorresse o equilíbrio entre o sedimento (a princípio refrigerado) e a água adicionada. Após o período de descanso o sistema foi utilizado para realização dos testes de toxicidade. Foram utilizados 3 controles diferentes: controle (apenas água de diluição), controle-rede (água de diluição e a rede de plâncton com anel de fixação) e controle IB (utilizando sedimento proveniente da Praia do Engenho – IlhaBela-SP).

Os indivíduos adultos de *Lytechinus variegatus* foram coletados nos costões rochosos da Ilha da Palmas, Santos-SP, por meio de mergulho livre, sendo imediatamente envoltos em macroalgas do local e levados ao laboratório, onde foram mantidos em tanques com água do mar sob condições controladas, até o início do experimento.

Para a obtenção dos gametas e posterior fecundação o presente estudo adotou a metodologia descrita pela ABNT-NBR 15350 (2006); os ouriços foram submetidos a choque osmótico, com injeção de 1-3 mL de KCl (0,5M) na cavidade celomática dos animais. Os ouriços foram pré-selecionados pelo tamanho do gonóporo, pois, segundo ABESSA *et al.* (2001) existe dimorfismo sexual para *L. variegatus*, no qual os machos apresentam gonoporo relativamente menor do que fêmeas. O dimorfismo foi confirmado quando da liberação dos gametas: o esperma de cor branca e os óvulos de cor amarelo-alaranjada. Foram utilizados gametas de 3 machos e 4 fêmeas, promovendo relativa variabilidade entre os gametas, conforme indicado no protocolo. Cada fêmea foi apoiada em um béquer de cerca de 400 mL, totalmente preenchido com água do mar, permitindo a deposição dos óvulos. Em seguida, os óvulos foram reservados e analisados sob microscópio, para verificar seu estágio de maturação e sua morfologia, ou seja, definir se eram adequados para o teste; aqueles considerados inviáveis sendo descartados.

Os óvulos selecionados foram então misturados, em um béquer de 1000 mL, e lavados 3 vezes. O esperma foi acondicionado *in natura* em um béquer mantido em isopor com gelo, sendo ativado por diluição em água do mar, numa proporção de 0,5 mL de esperma para 24,5 mL de água de diluição, imediatamente antes da fecundação. Para a fecundação, adicionou-se de 1 a 2 mL da solução de esperma à solução de óvulos, verificando-se uma taxa mínima de 90 % de sucesso na fecundação para a realização do teste.

Em seguida, adicionou-se em cada réplica uma alíquota de solução de ovos recém fecundados contendo cerca de 300 a 500 ovos por tubo. Os testes foram mantidos em câmara de germinação, sob foto-período de 12hrs:12hrs (luz:escuridão) e temperatura de 25 ± 2 °C. Após cerca de 24 horas, os embriões foram fixados com adição de 3 gotas de formol 40% neutralizado em cada tubo.

Para a contagem das larvas foi utilizada ± 1 mL de amostra, em câmara de SEDGEWICK-RAFTER, examinada em microscópio óptico sob aumento de 40X. Para cada réplica, as primeiras 100 larvas foram contadas, sendo então contabilizadas as larvas com desenvolvimento anormal (ovo, desenvolvimento retardado ou deformações – figura 6) e também aquelas que atingiram o estágio plúteus, ou seja, as larvas normais.

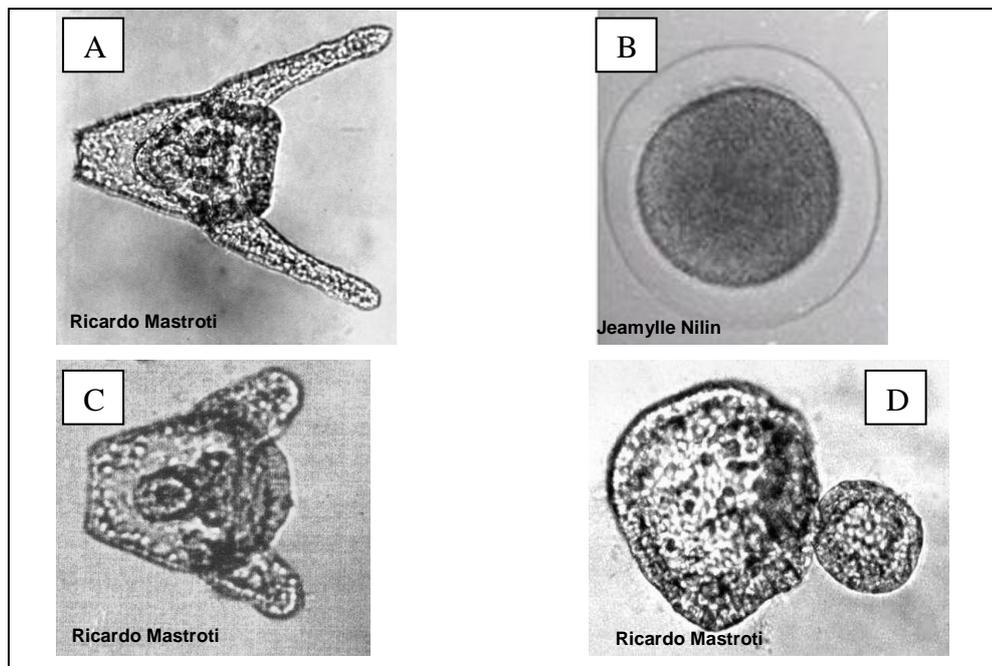


Figura 6: Desenvolvimento embrio-larval avaliado: (A) larva normal; (B) Ovo; (C) larva desenvolvimento retardado; (D) Larva anômala (fotos sem escala).

As variáveis físico-químicas medidas no início do experimento foram: oxigênio dissolvido (OD) e temperatura (oxímetro da marca Digimed DM4P), pH (pHmetro Lutron PH-206), salinidade (refratômetro 211) e amônia (Eletrodo Thermo Orion 9512 para NH_4).

3.5.2. Teste de Toxicidade de Sedimento Integral

Para o teste com sedimento integral foi aplicada a metodologia padronizada por Lotufo & Abessa (2002), utilizando-se o copépodo harpacticóide *Nitokra* sp. O organismo-teste apresenta ciclo de vida relativamente curto (3 - 4 semanas), alta sensibilidade, é estuarino, bentônico, cosmopolita e de fácil cultivo. Os animais utilizados no estudo foram obtidos do cultivo do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecologia Aquática (NEPEA) da Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista (UNESP-CLP), situado em São Vicente, litoral de São Paulo.

O teste consiste na exposição de 10 fêmeas ovadas ao sedimento a ser analisado, durante 10 dias, iluminação constante, avaliando efeitos tóxicos agudos (sobrevivência) e crônicos (reprodução) causados por contaminantes presentes nos sedimentos. Aproximadamente 2 mL de sedimento homogeneizado foram acondicionados em frascos de cintilação, 4 réplicas por amostra. A cada réplica foram adicionadas 8 mL de água de diluição, salinidade semelhante ao cultivo (19 ± 2), perfazendo um volume final de 10 mL. Após 24 horas as fêmeas ovadas foram separadas do cultivo e acondicionadas nos frascos de cintilação.

A alimentação consistiu na adição de 100 μL de uma mistura de levedura e água no início do experimento. Os frascos foram mantidos sem aeração e sob temperatura constante. Ao final do experimento, o teste foi fixado e corado com uma solução formalina 10% e Rosa de Bengala, agitado, e posteriormente analisado após dois dias do encerramento do teste, propiciando uma melhor coloração dos sobreviventes. Os organismos foram retirados do sedimento com auxílio de uma peneira de malha de porosidade de 45 μm . O material retido na peneira foi levado ao microscópio estereoscópico onde foram identificados e classificados como fêmeas (adultos) e prole (náuplios e copepoditos) (figura 7).

As variáveis físico-químicas medidas no início e no término do experimento foram: oxigênio dissolvido (OD) e temperatura (oxímetro da marca Digimed DM4P), pH (pHmetro Lutron PH-206) e salinidade (refratômetro 211).

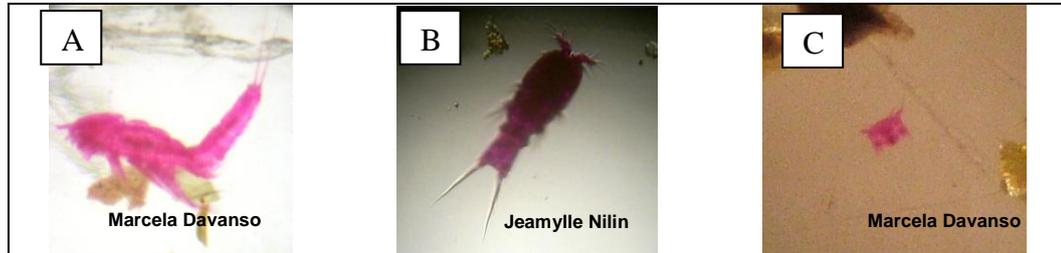


Figura 7: Estágios avaliados no teste com *Nitokra* sp.; A - Fêmea adulta; B - Copepodito; C - náuplio (Fotos sem escala).

3.5.3. Granulometria

Cada amostra foi seca em estufa a 56°C, durante três dias, e posteriormente macerada e peneirada em um conjunto de peneiras utilizando malha definidas na escala ϕ . Com base nos resultados, o tipo de sedimento predominante foi classificado de acordo com a escala de Wentworth (WENTWORTH, 1922).

3.5.4. Teor de Matéria Orgânica

Para a avaliação do teor de matéria orgânica total foi aplicado o método descrito por Loring & Rantala (1992), onde 10 gramas de sedimento, secos previamente em estufa a 60°C por três dias, foram queimados em forno mufla à 500°C por 3 horas. As amostras foram analisadas em duplicata e a concentração de matéria orgânica calculada pela diferença entre o peso inicial e o peso final (após a queima), dada em porcentagem.

3.5.5. Teor de Carbonatos

A estimativa do teor de carbonatos foi feita seguindo a metodologia descrita por Gross (1971). Frações de 2,0 gramas de sedimento, secos em estufa a 60°C por três dias, foram pesadas em béqueres e digeridas com ácido clorídrico 50% por um mínimo de 4 horas, até total digestão dos carbonatos (observada pela ausência de formação de gases), duas réplicas para cada sedimento. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada, deixadas sedimentar por um dia, o excesso de água foi retirado e as amostras levadas para secar em estufa a 60 °C por 24 horas, sendo posteriormente pesadas. A diferença entre o peso final e o inicial correspondeu à estimativa do teor de carbonatos, dada em porcentagem.

3.6. Análises Estatísticas

Os dados obtidos nos testes com biomarcadores e nos de toxicidade foram primeiramente verificados quanto à normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk's* ou teste de *Bartlett*, e quanto à homogeneidade das variâncias (homocedasticidade) pelo teste de Chi-Quadrado.

Nos testes de toxicidade e do Ensaio do Cometa, que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, foi aplicado o método estatístico *t-student* (Zar, 1996) para amostras independentes, através do qual os resultados da análise das amostras foram comparados com o respectivo controle (água de diluição para os ouriços, sedimento de Ilhabela para os copépodos, estação do Pacoti para o Ensaio do Cometa), de modo a determinar se as amostras foram significativamente diferentes ou não.

Já os dados provenientes dos ensaios com biomarcadores enzimáticos foram submetidos ao Teste de *Mann-Whitney* para amostras independentes, análise não-paramétrica, visto que não apresentavam distribuição normal.

4. RESULTADOS

As condições de coleta, bem como as informações sobre os organismos coletados foram compilados na tabela 1.

Tabela 1: Dados dos organismos e variáveis mensuradas nos pontos de coleta (Estuário do Pacoti - 23/09/2009; Estuário do Rio Ceará- 21/10/2009).

Amostras	<i>G. cruentata</i>			Coleta					
	n	♀	♂	Peso (g)	comprimento (mm)	largura (mm)	S	pH	OD
RC1	13	9	4	28,61±9,61	36,43±5,51	32,59±2,41	27	7,68	Sat
RC2	16	7	9	36,06±9,95	40,50±3,05	35,02±2,95	20	7,80	Sat
RC3	11	4	7	30,61±6,83	39,85±3,52	33,63±1,99	35	8,03	Sat
Pacoti	21	10	11	28,8±10,1	37,16±3,87	32,31±3,21	35	8,05	Sat

S: salinidade; OD: oxigênio dissolvido; Sat: OD > 5,0 mg/L.

As variáveis mensuradas se apresentam dentro do esperado para ambientes estuarinos e marinhos, os pontos mais próximos da foz apresentando valores maiores de salinidade e pH em torno de 8,0, demonstrando o aumento de salinidade e tamponamento característico exercidos pelo aporte de água marinha: o ponto RC2 apresentou a salinidade de 20, o que pode ser explicado pelo aporte de água doce uma vez que a estação está localizada na confluência dos rios Maranguapinho e Ceará.

O oxigênio dissolvido mensurado se mostrou dentro do esperado, visto a influência da água altamente oxigenada trazida pela maré, os valores de OD enquadrados dentro da classe 1 de qualidade para águas salobras na CONAMA 357-05 (acima de 5,0 mg/L).

Os padrões de comprimento e largura obtidos para o *G. cruentata* indicam que os mesmos se encontram na faixa de organismos maduros (23,80 à 52,83 mm de comprimento, sendo comprimento e largura alométricos) (SOUZA, 2008); foi observada apenas uma fêmea ovada (Pacoti), fato que vem de encontro com o esperado, visto que Souza & Silva (2009) concluíram que o período reprodutivo (ocorrência de fêmeas ovadas) dos organismos da região se dá predominantemente entre os meses de abril e junho.

Os machos amostrados apresentaram peso maior que as fêmeas ($p=0,004$), sendo que não houve diferença de peso significativa entre as estações ($p=0,093$), nem mesmo entre os machos e fêmeas da mesma estação ($p=0,341$).

4.1. Biomarcadores

Para a atividade de Glutathione *S*-transferase (GST) foi observada apenas diferença estatística entre as brânquias anteriores e posteriores ($p=0,018$), as posteriores com valores maiores; não houve diferença entre machos e fêmeas ($p=0,059$). Integrando os valores não foram observadas diferenças entre as estações ($p=0,317$). Porém, por haver diferença entre as brânquias, comparações estatísticas entre estações foram feitas levando em consideração esses dois grupos (figuras 8 e 9).

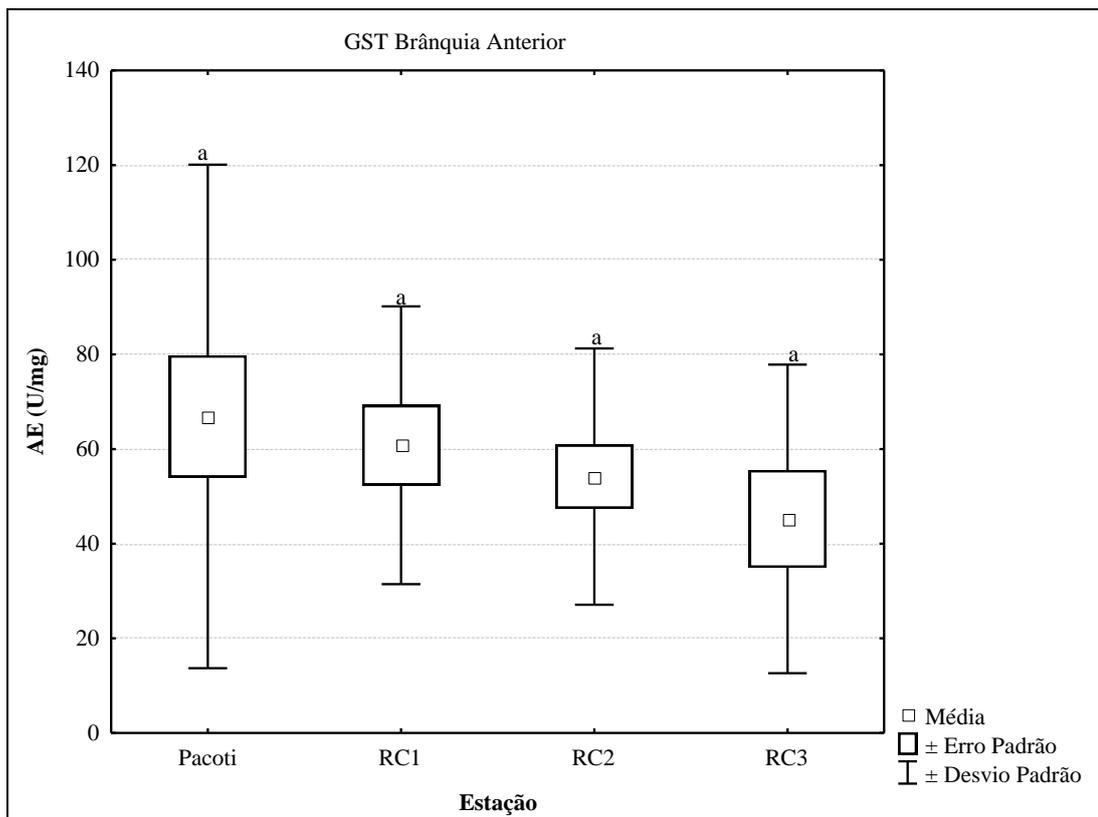


Figura 8: Ensaio de Atividade Enzimática de Glutathione *S*-transferase – Brânquia Anterior; estações que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Não foi observada diferença estatística entre as estações para atividade enzimática de GST das brânquias anteriores de *G. cruentata*. O mesmo padrão foi obtido para brânquias posteriores. Nas brânquias dos organismos provenientes do Pacoti, é possível notar uma grande variabilidade dos dados, embora a média tenha sido ligeiramente maior que das outras estações nos dois casos.

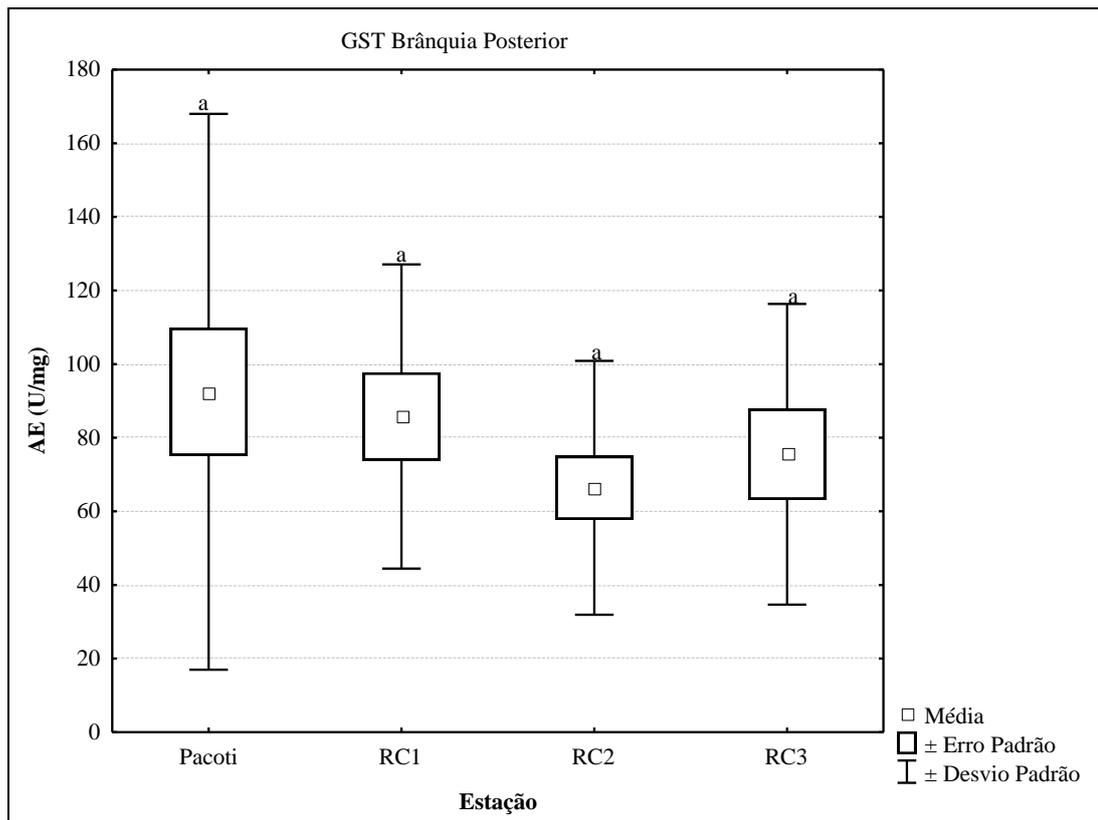


Figura 9: Ensaio de Atividade Enzimática de Glutationa S-transferase – Brânquia Posterior; estações que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A atividade enzimática da Colinesterase não apresentou padrão de variação relacionado ao sexo dos organismos ($p=0,851$) nem com o tipo de brânquia analisado ($p=0,839$), estando relacionado significativamente com as estações ($p=0,049$).

Foram analisadas diferenças estatísticas entre estações para cada grupo de brânquia (figuras 10 e 11).

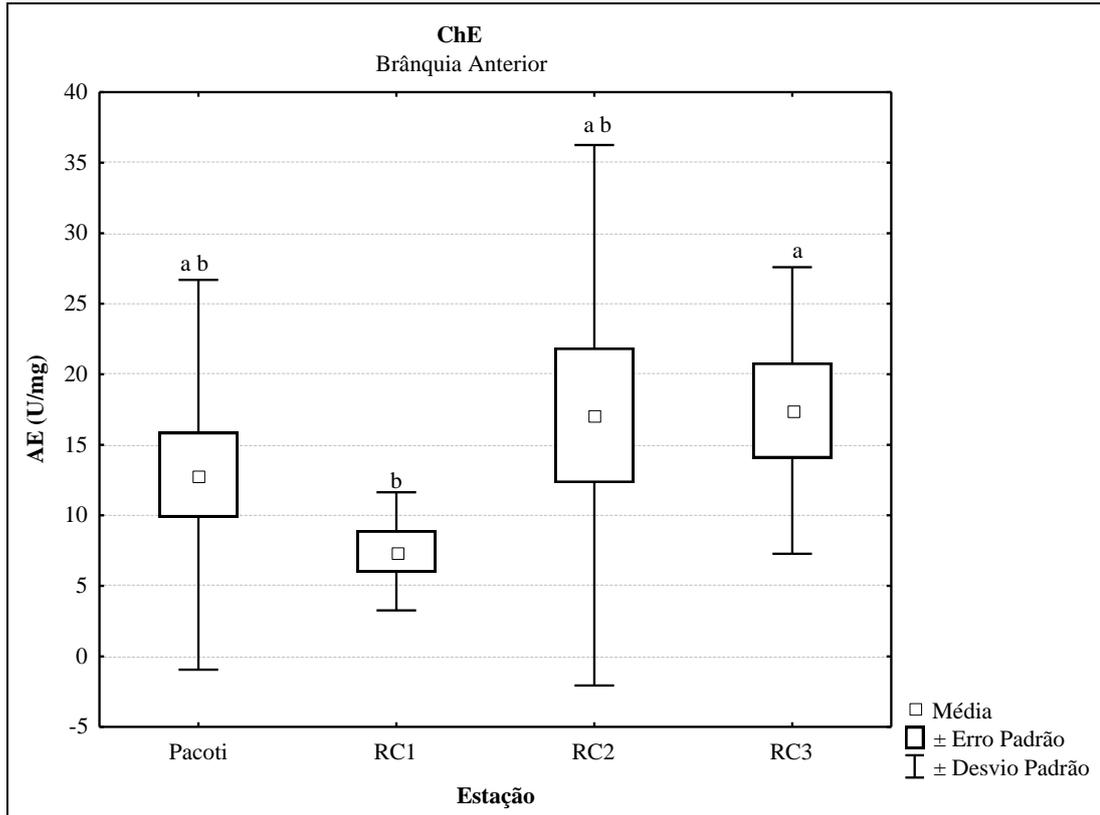


Figura 10: Ensaio de atividade enzimática de Colinesterase – Brânquia Anterior; estações que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

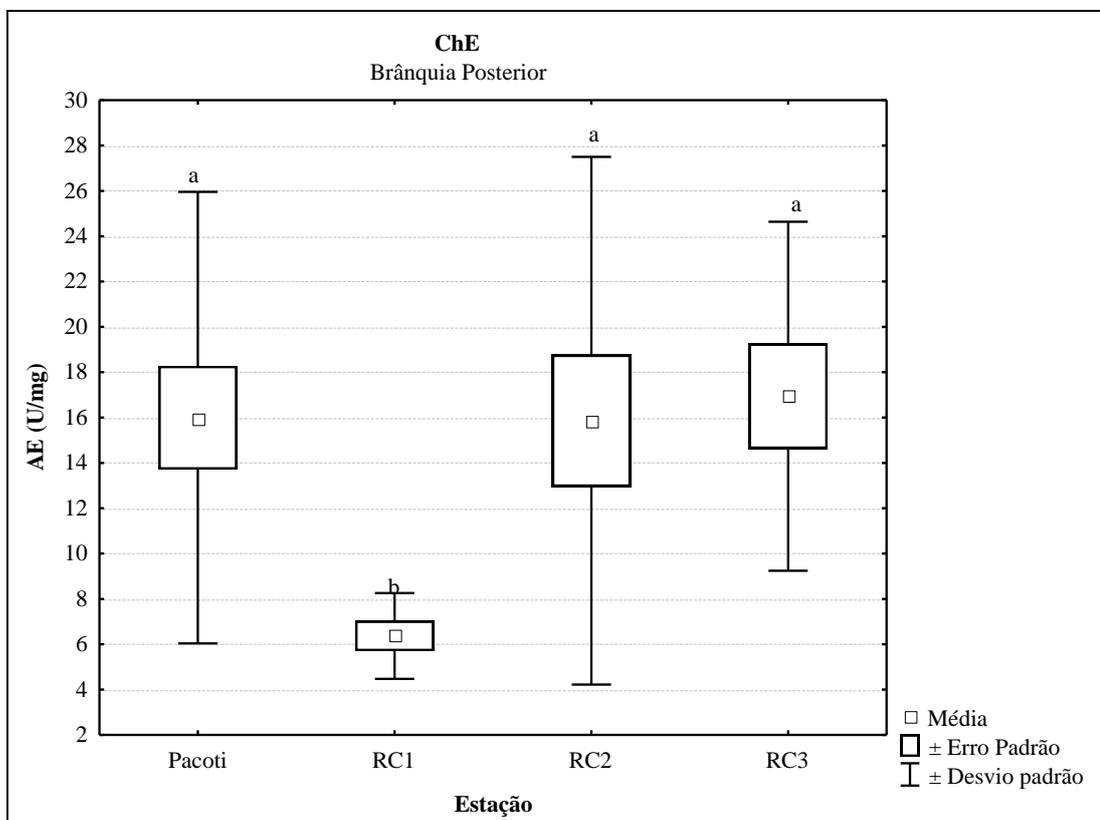


Figura 11: Ensaio de atividade enzimática de Colinesterase – Brânquia Posterior; estações que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Para as brânquias anteriores houve diferença estatística significativa entre as estações RC3 e RC1, com inibição da atividade nesta última estação. Já nas brânquias posteriores a estação RC1 foi diferente das demais estações, também indicando inibição da atividade da Colinesterase para a estação. Foi possível observar uma alta variabilidade nas brânquias anteriores e posteriores das estações Pacoti e RC2. A inibição da atividade foi considerada um efeito deletério (EF) sobre a saúde do organismo.

Os resultados obtidos para o teste do cometa foram compilados na figura 12: as estações do Rio Ceará apresentaram danos significativos quando comparadas à estação do Rio Pacoti, sendo a estação RC3 com maior índice de danos, caracterizando a estação como a mais degradada do Estuário em questão por este ensaio.

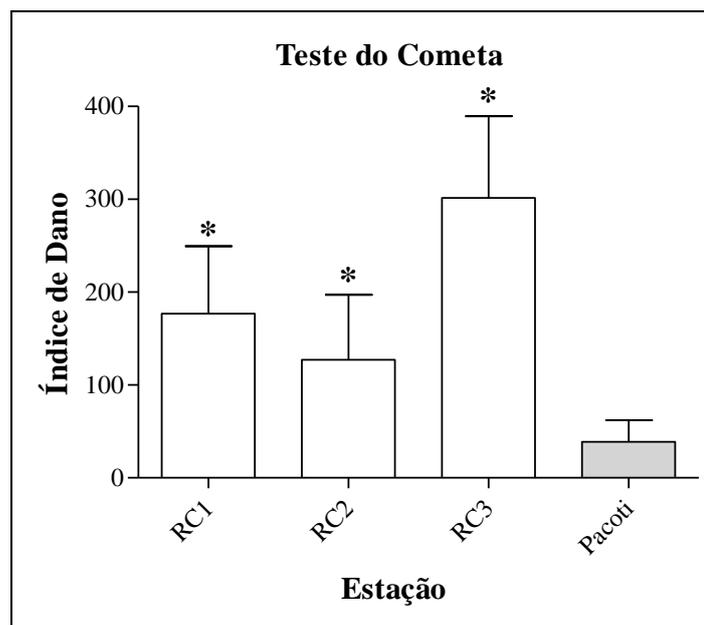


Figura 12: Índice de danos no DNA - Teste do Cometa; * (asterisco) representa as estações significativamente diferentes da Estação Pacoti ($p < 0,05$).

Nenhum dos biomarcadores analisados apresentou relação com o peso dos organismos (ChE x Peso $R^2 = 0,012$; GST x Peso $R^2 = 0,029$; Teste do Cometa x Peso $R^2 = 0,003$).

4.2. Sedimentos

Os sedimentos coletados nos respectivos estuários foram trabalhados em no máximo 3 meses. A recomendação no geral é que os testes com sedimentos sejam executados o mais rápido possível; a USEPA (2001) assume que tanto sedimentos integrais como águas intersticiais podem permanecer estocados por 8 semanas ou mais por não observar um padrão constante na variação dos dados ecotoxicológicos, de acordo com o “Manual de Coleta, Estocagem e Manipulação de Sedimento para Análises Químicas e Ecotoxicológicas” da entidade; não esperamos portanto variação significativa na toxicidade relacionada as condições de armazenamento do sedimento.

De maneira geral, os sedimentos foram caracterizados como predominantemente lamosos (tabela 2); a estação RC1, apesar de apresentar a predominância de lama, indicou também a ocorrência da fração areia fina em quantidade, provavelmente por estar sob influência de área de salgado ou apicum, onde há maior ocorrência de sedimentos arenosos. Os teores de matéria orgânica (MO) variaram de 8,16 a 22,09 %, o valor mais alto encontrado na confluência dos rios Maranguapinho e Ceará. Já para o teor de Carbonato, foi observada uma variação de 10,24 à 14,37% nas amostras do RC, e 22,07 % no estuário do Pacoti.

Tabela 2: Características gerais dos sedimentos coletados.

Estação	MO (%)	CaCO₃ (%)	Lama (%)
RC1	8,16	10,24	34,87
RC2	22,09	12,52	85,78
RC3	10,45	14,37	67,42
Pacoti	13,02	22,07	95,51

MO: matéria orgânica; CaCO₃: carbonatos.

A água de diluição utilizada para os testes com copépodos e embriões de ouriço foi filtrada em membrana Milipore de 45µm, e aerada por dois dias no mínimo, apresentando OD inicial acima de 7,0 mg/L, ideal para a execução dos experimentos.

O teste crônico de SI com o copépodo *Nitokra* sp. atingiu os padrões aceitáveis para as variáveis pertinentes a execução do teste (tabela 3). O pH observado está dentro do aceitável para águas estuarinas e testes com sedimentos provenientes destas regiões. A salinidade demonstrou um incremento final de no máximo 3, relacionada a possível evaporação e/ou salinização pelo sedimento. Os copépodos são organismos eurihalinos, suportando salinidades de 5 à 30 (Lotufo & Abessa, 2002), indicando então que o aumento observado no teste não foi um fator interferente à resposta obtida pelo mesmo.

Tabela 3: Variáveis físico-químicas do teste de SI com *Nitokra* sp.

Estação	pH		Salinidade	
	inicial	final	inicial	final
RC1	7,03	7,61	17	19
RC2	6,82	7,91	17	17
RC3	7,25	7,41	17	20
Pacoti	7,14	7,48	17	19
Controle IB	7,11	8,34	17	20

O resultado obtido com o teste crônico de sedimento integral é representado pela figura 13.

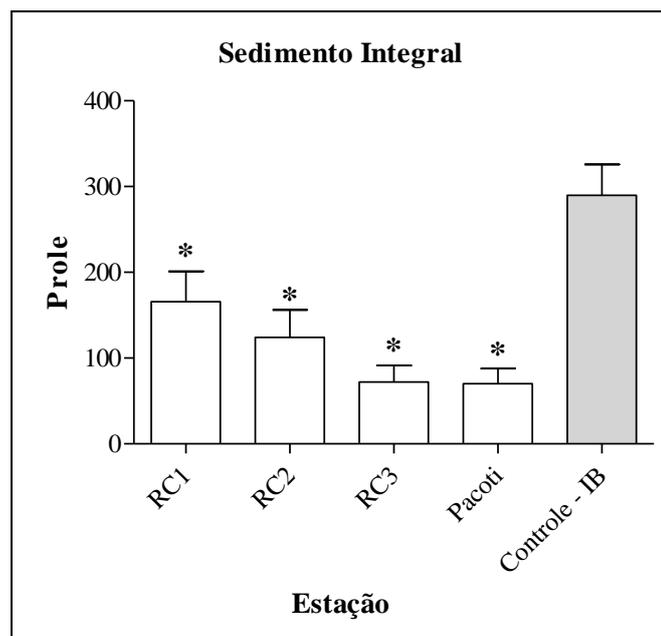


Figura 13: Teste com Sedimento Integral (SI) utilizando o copépodo *Nitokra* sp.; * (asterisco) representa as estações significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Todas as estações analisadas foram diferentes do controle interno (Ilhabela), indicando toxicidade crônica das amostras para o organismo-teste *Nitokra* sp. Não foi observada mortalidade das fêmeas em nenhuma das estações, para nenhuma das pseudo-réplicas, indicando ausência de toxicidade aguda.

As variáveis físico-químicas obtidas no teste crônico de ISA com embriões de ouriço do mar *L. variegatus* foram compiladas na tabela 4.

Tabela 4: Variáveis físico-químicas do teste de ISA com *L. variegatus*.

Estação	pH	mV/pH	OD (mg/L)	Salinidade	NH ₄ (mg/L)	NH ₃ ⁺ (mg/L)
RC1	7,89	-105	2,0	35	0,30	0,0105
RC2	8,29	-113	4,6	35	0,24	0,0197
RC3	8,16	-117	4,1	35	0,19	0,0119
Pacoti	8,08	-112	4,0	35	0,16	0,0086
Controle IB	8,37	-124	6,3	35	0,06	0,0060
Controle	8,30	-128	5,8	35	<0,04	<0,01
Controle Rede	8,30	-128	5,8	35	<0,04	<0,01

Os valores encontrados obedeceram aos padrões de execução do teste. Em nenhuma das amostras os valores de amônia ionizada (NH₃⁺), considerada interferente para o teste, foram iguais ou maiores que 0,05 mg/L, valor máximo proposto pelo protocolo experimental (PRÓSPERI, 2002), indicando que este fator não influenciou o resultado obtido pelo presente estudo. A estação RC1 apresentou OD igual a 2,0 mg/L após a estabilização de um dia dos frascos-teste, indicando perda considerável de OD que pode ter influenciado no resultado obtido.

O teste crônico de ISA tem seu resultado apresentado pela figura 14. Todas as estações foram tóxicas quando comparadas a qualquer um dos controles analisados (controle sedimento de Ilhabela, controle água de diluição e controle água e rede). No caso da RC1, como houve a baixa taxa de OD, o efeito observado na amostra da estação foi considerado como início de toxicidade (IT).

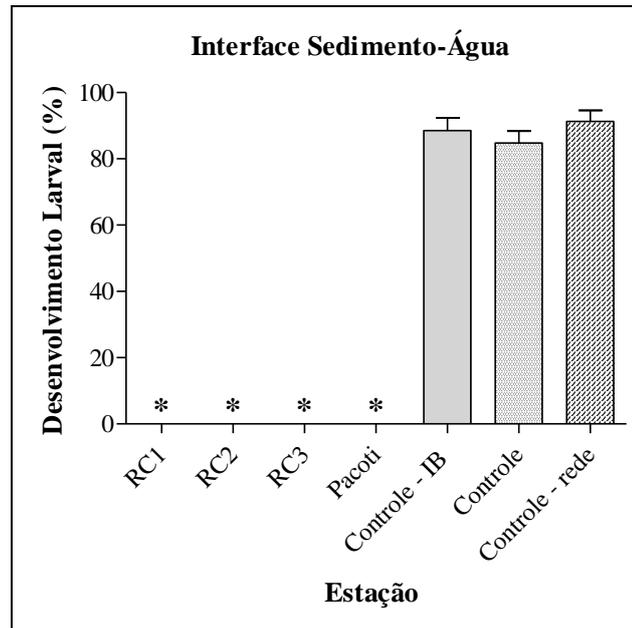


Figura 14: Teste Interface Sedimento Água (ISA) utilizando o ouriço *Lytechinus variegatus*; * (asterisco) representa as estações significativamente diferentes do controle IB ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Um dos principais propósitos dos estudos de monitoramento é a avaliação do risco ambiental (*Environmental Risk Assessment* - ERA), que se enquadra no princípio da prevenção e da predição ao tentar identificar problemas que podem se agravar futuramente. Para tanto, se faz necessário estabelecer modelos conceituais sobre como o ecossistema funciona e como os agentes estressores podem afetar os componentes do ambiente natural. Esses modelos devem se basear em respostas a partir das espécies que constituem o ecossistema, contempladas na escolha de espécies-chave, com resultados que possam ser extrapolados para outros organismos, e prever conseqüências para outros níveis de organização biológica (população, comunidade e ecossistema, incluindo o ser humano) (DEPLEGDE & FOSSI, 1994; USEPA, 1998; GALLOWAY, 2006; PRÓSPERI & NASCIMENTO, 2006).

Uma abordagem buscando a ERA consiste no peso de evidências (*Weight of Evidences* – WOE) (DEPLEGDE & FOSSI, 1994; CHAPMAN *et al.*, 2002), que visa determinar os impactos possíveis de estressores químicos baseado em múltiplas linhas de evidência (LOE), onde a relevância ecológica da exposição a poluentes pode ser determinada de maneira integrada dentro do processo de monitoramento e indicar a integridade do ecossistema como um todo. As LOE comumente consideradas são quatro: caracterização da contaminação, bioensaios, alterações *in situ* e biomarcadores.

A inclusão dos biomarcadores como uma LOE e sua integração com os demais parâmetros para a tomada de decisão na avaliação e gestão de áreas costeiras e de atividades permite uma determinação causa-efeito mais sensível (MARTÍN-DÍAZ *et al.*, 2008b), buscando a prevenção de efeitos sobre a biota. O estudo e integração das LOE permitem, por exemplo, a adequação dos parâmetros de qualidade já existentes, como as guias de qualidade de sedimentos (CHOUERI *et al.*, 2009; MORALES-CASELLES *et al.*, 2009)

O presente estudo abordou duas das quatro linhas de evidência ao aplicar dois testes de toxicidade, avaliando duas formas de exposição potenciais para os organismos, e três biomarcadores, dois enzimáticos sendo um de efeito e outro de exposição, e um relacionado a danos no DNA.

As linhas aplicadas apresentam como vantagem a resposta aos efeitos de compostos biodisponíveis, em três escalas sub-letais dentro da organização biológica (alterações enzimáticas, celulares, e efeitos no desenvolvimento e reprodução). A existência de um conjunto de efeitos em nível de população e sub-organismo (toxicidade e biomarcadores) indica que existe a possibilidade de os efeitos se propagarem para escalas biológicas maiores, como comunidade e ecossistema.

5.1. Sedimentos

Por sua capacidade de acumular contaminantes ao longo do tempo e pela sua importância ecológica, os sedimentos têm sido utilizados como importantes indicadores da saúde dos ecossistemas aquáticos, sendo hoje considerados tão importantes em avaliações ambientais quanto à coluna d'água ou a bioacumulação dos compostos nos organismos (ABESSA, 2002).

Os sedimentos dos estuários analisados no presente estudo se apresentam ricos em carbonatos, predominantemente lamosos e com alta carga orgânica, composição encontrada por vezes em regiões estuarinas (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1990; ABESSA, 2002; FARIA & SANCHEZ, 2001; KEHRIG *et al.*, 2003), indicando um ambiente propício à deposição e com grande influência marinha, uma vez que a ocorrência de carbonatos também está relacionada à intrusão de água salina.

É possível observar a influência do rio Maranguapinho no sistema do RC, pelo aumento do teor de lama e de matéria orgânica nos sedimentos e pela diminuição da salinidade da água na área de confluência dos rios (RC2). Também é possível observar a influência da maré no canal do RC, visto que os teores de carbonatos diminuem ligeiramente conforme se adentra no rio.

Alguns autores encontraram valores diferenciados para as características sedimentológicas dos Estuários do Rio Ceará (RC) e do Pacoti. Aguiar (2005) observou sedimentos predominantemente arenosos e dedicou este fato no caso do estuário do Pacoti ao aporte de sedimentos das dunas adjacentes na região, chegando por arraste eólico, assim como descreve o ZEE (2005), e no RC pela influência da maré e plataforma adjacente, visto a ocorrência de maior porcentagem de sedimentos arenosos próximo da foz. Nilin (2008) ao analisar a fração granulométrica dos estuários constatou variação de 34,8 % a 92,3% no teor

de finos do Rio Ceará, a proporção de finos maior na porção interna do estuário, teores próximos aos apresentados pelo presente estudo. Os valores, segundo a autora, não apresentaram padrão de distribuição ao longo do ano, especialmente para as amostras dos pontos RC1 e RC2, assim como concluiu Juvêncio (1997) ao constatar que as frações granulométricas variaram consideravelmente entre as campanhas no RC, aludindo o fato à influência da maré e diferenças nos locais de amostragem. Para o Pacoti, Nilin (2008) encontrou o teor de finos em 40,4%, na mesma altura do rio (cerca de 7 km da foz), valor duas vezes menor do que o apresentado pelo presente estudo, fato que também pode estar relacionado a diferenças no local de amostragem.

No que concerne a MO, Aguiar (2005) observou baixos teores, variando de 0,82 a 3,96% nos dois estuários, indicando baixa contribuição orgânica dos estuários à plataforma adjacente. O maior teor de MO constatado pelo autor ocorreu na área do RC2, região da confluência do Rio Maranguapinho. Já Nilin (2008) observou valores maiores em relação à estudos anteriores e grande variação de MO das amostras do RC (de 1,6 a 24,8 %), relacionando o incremento dos teores ao possível aumento da contribuição de MO por fontes antrópicas. O maior valor de MO encontrado pela autora também foi na região do RC2, corroborando a contribuição do afluente Maranguapinho ao sistema do RC, também observada pelo presente estudo.

Para o rio Pacoti o presente trabalho constatou um teor de MO nove vezes maior do que o observado por Aguiar ($1,44 \pm 0,09\%$), sendo que o valor do presente estudo é equivalente aos observados por Nilin (2008) e Torres (2009) para a mesma região (em torno de 10%).

No tocante aos Carbonatos, Aguiar (2005) indicou altos teores de carbonatos no Pacoti (de 38,80 à 79,80%) e valores menores para o RC (de 3,75 à 49,72%), os valores mais altos próximos a foz nos dois estuários, evidenciando contribuição trazida pela maré de material proveniente da plataforma continental adjacente, visto que os carbonatos são considerados substrato sedimentar predominante na região da plataforma nordeste (LACERDA & MARINS, 2006; AGUIAR *et al.*, 2007). As amostras do RC analisadas por Nilin (2008) apresentaram teores de carbonatos variando de 0 a 18,6%, os maiores valores próximos da foz; no rio Pacoti, a autora encontrou 3,3% de carbonatos na amostra analisada, valor quatro vezes menor que o encontrado no presente estudo e mais de dez vezes menor que o observado por Aguiar (2005).

A autora Nilin (2008) assim como Juvêncio (1997) constatou que a distribuição dos teores analisados apresenta grande variação ao longo do ano para as mesmas estações do RC. Variações de MO, carbonatos e fração lamosa podem ser observados em algumas regiões da costa cearense, como os estuários do Rio Jaguaribe (TORRES, 2009) e do Rio Malcozinhado (NILIN, 2008) e mar adjacente (AGUIAR *et al.*, 2007; MOREIRA, 2009).

A variação dos teores descrita na literatura e observada no presente estudo nos leva a crer que os processos que regem a distribuição destes componentes nos dois estuários são altamente dinâmicos.

Os processos ligados ao aporte fluvial, à ação de maré e a componentes meteorológicos afetam a dinâmica dos processos sedimentares (MIRANDA *et al.*, 2002). No caso dos estuários da costa cearense, a dinâmica sedimentar é particular. O aporte e capacidade de retenção dos sedimentos variam de acordo com o período e volume das chuvas, a ação dos ventos (fatores sob a influência climatológica da zona de convergência intertropical), a presença de rios com características intermitentes, como o Rio Ceará, formações geomorfológicas características, como as dunas e falésias, fonte de sedimentos para os sistemas adjacentes, torna o aporte e composição de sedimentos passível de variabilidade. Além disso, intensas intervenções antrópicas nos estuários e suas bacias, como a ocupação desordenada do solo, desmatamento de áreas de mangue, barramentos e captação de água, etc, alteram a dinâmica estuarina (p.ex. geomorfologia das margens dos canais, padrão de entrada da maré, velocidade e direção das correntes) e influenciam no aporte e retenção dos sedimentos (MIRANDA, 2002; SEMACE, 2005; LACERDA *et al.*, 2007).

Antes de se depositar nos fundos, as partículas de sedimento, MO e os carbonatos percolam através da coluna d'água, onde podem interagir com outras substâncias ali presentes; essas interações ocorrem na forma de processos como sorção ou formação de complexos, carreando substâncias diversas para os sedimentos, caracterizando a MO, os carbonatos e as partículas de silte e argila como bons carreadores geoquímicos (CHESTER, 1993).

LONG *et al.* (2000) afirmam que os contaminantes presentes em sedimentos arenosos ricos em carbonatos estão mais biodisponíveis do que os contaminantes encerrados em partículas sedimentares finas e com carga (argilas e siltes). Argilas, MO e carbonatos enquanto carreadores geoquímicos são capazes de interagir com uma gama de contaminantes presentes em suspensão, retendo e agregando-os em moléculas mais estáveis e,

conseqüentemente, menos reativas e menos biodisponíveis, fatores que dependem também da concentração dos contaminantes no meio e da dinâmica biogeoquímica encontrada nos sedimentos (CHESTER, 1993).

No presente estudo as regiões analisadas apresentaram altos teores de matéria orgânica e carbonatos, e sedimentos predominantemente lamosos, características que propiciam a retenção de contaminantes no sistema, imobilizando-os para a coluna d'água e água intersticial, além de parâmetros físico-químicos da água comuns a regiões estuarinas, os padrões de pH em torno de 7,8 (tamponamento exercido pela influência da água do mar), salinidade entre 0 e 35, e alta oxigenação quando da entrada da maré no canal

As características de retenção do meio pode facilitar a incorporação pela via alimentar, tanto para os copépodos harpaticóides utilizados no ensaio de toxicidade com sedimento integral quanto para os caranguejos semi-terrestre, avaliados quanto aos biomarcadores.

Os estuários possuem características particulares, principalmente devido à mistura de águas marinha e fluvial e à inundação freqüente a que são submetidos pelas marés. Tais fatores impõem variações extremas de pH e salinidade ao ecossistema, além de proporcionarem condições permanentemente redutoras para os sedimentos sub-superficiais e águas intersticiais, principalmente quando apresentam florestas de mangue (McLUSKY & ELLIOT, 2004).

Nesses ambientes, a precipitação de metais é favorecida pela alta disponibilidade de carbonatos (caso da costa cearense), pelo alto pH e pela disponibilidade de sulfetos, visto as condições de redução na camada sub-superficial do sedimento (MASUTTI *et al.*, 2002). No que tange os compostos orgânicos, estes, por serem altamente hidrofóbicos, tendem a interagir com o material em suspensão, com especial afinidade química por carbono orgânico, componente amplamente distribuído em regiões estuarinas. O comportamento hidrofóbico faz com que os contaminantes orgânicos permaneçam associados às partículas nos sedimento por longos períodos, mesmo após o término de eventos de despejo no ambiente (BAUMARD, *et al.*, 1999; MEDEIROS & BÍCEGO, 2004).

Não existem padrões brasileiros para controle da contaminação dos sedimentos por compostos orgânicos e inorgânicos (ABESSA, 2002; CETESB, 2008). Visando estabelecer critérios de qualidade de sedimentos, muitos estudos e até mesmo legislações brasileiras e órgãos ambientais aplicam valores orientadores presentes em guias de qualidade sedimento delineados para regiões temperadas, adotados por órgãos internacionais. O guia de qualidade

de sedimento comumente aplicado no país é o estabelecido pela agência ambiental canadense, a *Environmental Canada* (1999), que propõe dois tipos de valores orientadores limites para substâncias tóxicas, um para o feito limiar à biota (ISQG ou TEL – *Threshold Effect Level*) e outro acima do qual são observados efeitos severos na biota (PEL – *Probable Effect Level*) (CETESB, 2008).

Os ensaios de toxicidade de sedimento realizados indicaram toxicidade crônica para todas as amostras dos dois estuários. Os resultados obtidos vão de encontro com o observado por Nilin (2008), que encontrou toxicidade aguda e crônica nos sedimentos dos estuários do Rio Ceará e do Rio Pacoti. A autora relacionou ainda a toxicidade observada nas amostras do RC1 à ocorrência de contaminação por Cu (35,4 µg/g), Cr (63 à 76 µg/g) e Pb (30,3 µg/g) nos sedimentos, valores acima de TEL.

Aguiar (2005) observou concentração de Cu (20,4 µg/g) acima de TEL na região onde está inserido o ponto RC3 do presente estudo, caracterizando a contaminação como de origem antrópica com fonte difusa; para o Pacoti o autor não observou indícios de contaminação de origem antrópica (1,28±0,07 µg/g de Cu e 3,52±0,12 µg/g de Zn).

Já Lopes *et al.* (2005) não encontraram contaminação dos sedimentos por Zn (6 à 9,6 µg/g) e Cu (3,1 à 3,6 µg/g) acima de TEL para nenhum dos dois estuários do presente estudo, porém constataram bioacumulação de Cu (25,9 à 121,3 µg/g de tecido seco) em ostras *Crassostrea rhizophorae* provenientes do RC, relacionando essa bioacumulação com a contaminação industrial por atividade de indústrias têxteis e de beneficiamento de couro, comuns na região. Como para a mesma região, Aguiar (2005) evidenciou Cu acima de TEL, é possível que este esteja biodisponível, explicando o padrão de bioacumulação em ostras observado por Lopes (2005). Vaisman *et al.* (2005) observaram bioacumulação de Hg em ostras *C. rhizophorae* em concentrações equivalentes a ambientes moderadamente poluídos.

Cavalcante *et al.* (2009), ao estudarem o impacto da urbanização sobre os mangues tropicais da RMF, encontraram nos sedimentos do RC alguns HPA (Benzo(a)Pireno, Benzo(a)Antraceno, Acenafaleno e Acenafiteno) em níveis acima de TEL (de 46,9 a 87,5 % acima), relatando níveis maiores de contaminação no interior do estuário do que na foz, além de classificar cerca de 50% da camada sedimentar como área de influência média, típica de zona urbano-industrial, os compostos provenientes de fontes como petróleo, madeira e produtos de combustão pirogênica.

Referente ao Rio Pacoti, Lopes *et al.* (2005) afirmam que a ausência de contaminação e bioacumulação era esperada por se tratar uma região mais preservada que as demais analisadas pelos autores. Porém, Lacerda *et al.* (2008) indicaram aumento da pressão antrópica na bacia do Pacoti ao correlacionar o enriquecimento de N e P nos sedimentos à pecuária e lançamento de esgotos, fato que pode explicar a toxicidade crônica e aguda observada por Nilin (2008) para o estuário.

O aumento da pressão antrópica na região do Pacoti também foi relatado por Ávila (2005) e Queiroz (2005). Thiago Pontes, atual gestor da APA do Pacoti (*comunicação pessoal*) relatou parâmetros de cor, DBO, nitrogênio amoniacal, sulfato, cloretos e coliformes termotolerantes de amostras de água da APA do Estuário do Rio Pacoti em desacordo com a Resolução CONAMA 357/05, mesmo quando comparados aos valores esperados para amostras de água salobra classe 3 (menos restritiva), monitoramentos realizados pela SEMACE no ano de 2009 e 2010.

Segundo Carr *et al.* (1996a; 1996b) a contaminação dos sedimentos pode ser classificada de em 3 grupos: inexistente - nenhum valor acima de PEL e/ou apenas 1 TEL excedido; moderada - nenhum PEL e/ou mais de 2 TELs excedidos; forte – acima de 1 PEL excedido. Em contrapartida, focando nos efeitos da contaminação sobre a biota, Long *et al.* (2000) concluíram que a ocorrência de toxicidade aguda em sedimentos que contenham de 1 à 5 contaminantes em níveis acima do PEL irá depender das características geoquímicas dos mesmos, relatando que quanto mais lamosos e ricos em MO, maior será o número de contaminantes acima de PEL para que ocorra toxicidade.

Ao avaliar estudos que identificaram contaminantes em níveis de efeito limiar e potencial aos organismos e a saúde humana na Baía de Tampa (Flórida – USA), MacDonald *et al.* (2004) elaboraram uma lista de compostos com provável potencial tóxico (COPC), baseado em quantas vezes esses compostos excederam os valores orientadores de qualidade de sedimentos, assim, uma vez listados, mesmo que os compostos não apresentem níveis acima de PEL, poderão ser considerados, em mistura, a causa da toxicidade observada

Abessa *et al.* (2006) observou ainda que para a região de Santos - SP, em mais de 80% dos casos em que houve violação do TEL (um ou mais contaminantes) ocorreu também toxicidade nos sedimentos, sugerindo que em ambientes tropicais e subtropicais os efeitos dos contaminantes aconteçam em menores concentrações do que no ambientes temperados em

virtude do metabolismo mais alto em organismos que ocupam regiões com temperaturas mais elevadas, além de variações das características dos sedimentos, entre outros fatores.

Para a região do RC avaliada, alguns autores (AGUIAR, 2005; NILIN, 2008, CAVALCANTE *et al.*, 2009) observaram mais de um contaminante que excederam os níveis de TEL, indicando que a região apresenta contaminação moderada e potencialmente tóxica aos organismos.

Em regiões estuarinas, a disponibilidade e mobilidade de contaminantes estão relacionadas não só as características sedimentares, como granulometria ou composição, mas também aos fatores físico-químicos das águas intersticiais e da coluna da água adjacente aos sedimentos. No caso dos estuários nordestinos, a intrusão de água salina extremamente oxigenada, por exemplo, é responsável pela oxidação de muitos compostos, mobilização e re-disponibilização destes, assim como processos biológicos de bioturbação, responsável por oxigenar camadas sub-superficiais dos sedimentos e alterar o equilíbrio de partição.

Organismos bentônicos que vivem enterrados em sedimentos contaminados estão expostos tanto aos contaminantes associados à fase sólida (sedimento integral), como àqueles dissolvidos na fase líquida (ou água intersticial). Segundo Lotufo e Abessa (2002), é necessário ampliar nossos conhecimentos a respeito dos riscos ecológicos associados à presença de contaminantes em sedimentos para assegurar a proteção ambiental de ecossistemas aquáticos. Assim, mesmo sendo ricos em MO, carbonatos e predominantemente lamosos, os sedimentos dos estuários aqui analisados podem estar atuando como fonte de contaminantes para a biota e a coluna d'água adjacente.

O potencial tóxico dos sedimentos dos dois estuários foi comprovado pelo presente estudo. No caso do RC, existem relatos consistentes da degradação que explicam a toxicidade observada no presente trabalho, como a ocorrência de substâncias acima dos efeitos limiares, toxicidade aguda e crônica, e fontes de contaminação já descritas (p.ex. Distrito Industrial de Maracanaú) no estuário. Para o Pacoti devido os indícios de lançamento de contaminantes, e os resultados de toxicidade da região por Nilin (2008) e pelo presente estudo, é possível observar comprometimento da qualidade ambiental dos sedimentos deste estuário.

5.2. Biomarcadores

A Glutathione *S*-Transferase (GST) não apresentou diferença estatística entre os estuários, os dados se apresentando inconclusivos e descortinando duas possibilidades: 1 - a atividade enzimática da GST mensurada nas brânquias de *G. cruentata* não se mostrou um biomarcador de peso para indicar a degradação observada nos estuários; 2 – os mecanismos de depuração estavam ativos nos animais coletados em todos os pontos de amostragem, de modo que os valores encontrados refletem um aumento da atividade da GST, como resposta ao estresse ambiental presente nos locais, inclusive a contaminação.

As GST são as enzimas da fase II de detoxificação mais estudadas e caracterizadas nos crustáceos (LIVINGSTONE, 1991). Compostos químicos, como metais pesados e hidrocarbonetos, são biotransformados em conjugados da enzima glutathione reduzida (GSH), sendo este processo de conjugação uma importante rota de detoxificação, o qual é catalizado pela enzima GST (MARTÍN-DÍAZ *et al.*, 2008b).

A resposta da GST perante a contaminação costuma ser a ativação da atividade enzimática, porém algumas vezes pode ocorrer a inibição da atividade nos tecidos analisados, como o observado por Elumalai *et al.* (2002) . Assim, a análise dos resultados deve ser feita com cautela, visto que diferentes contaminantes podem promover efeitos distintos sobre a atividade da GST (BAINY *et al.*, 2000).

Visando entender os efeitos observados no presente trabalho, alguns estudos que relacionam efeitos deletérios sobre a atividade da GST em organismos expostos a contaminantes em laboratório e em campo foram compilados na tabela 5 e discutidos posteriormente.

Ao estudarem o caranguejo *S. serrata* Van Oosterom *et al.* (2010) observaram, além da indução da atividade da GST, resíduos de HPA na urina dos caranguejos, indicando exposição a estes compostos e possível resposta do sistema de detoxificação, gerando os metabólitos excretados.

Tabela 5. Alterações da atividade enzimática de GST relacionada a exposição à contaminantes.

Organismo	Efeito	Tecido	Contaminante	Via de Exposição	Referência
Caranguejo <i>C. maenas</i>	ativação	HEP	Pb, Hg, HPAHPAs	Sedimentos	Morales-Caselles <i>et al.</i> , 2008b
<i>C. maenas</i>	ativação	HEP	Cu, Cr, Hg, Mn	Sedimentos	Martín-Díaz <i>et al.</i> , 2007a
<i>C. maenas</i>	ativação	HEP	HPAHPAs, PCBs	Sedimentos	Martín-Díaz <i>et al.</i> , 2007b
<i>C. maenas</i>	ativação	HEP	As, Cd, Cr, Hg, Pb, Zn	Campo	Martín-Díaz <i>et al.</i> , 2008a
<i>C. maenas</i>	ativação	HEP	Cipermetrim	Injeção cavidade abdominal	Gowland <i>et al.</i> , 2002
<i>C. maenas</i>	ativação	HEP	Zn, Hg	Água	Elumalai <i>et al.</i> , 2007
<i>C. maenas</i>	inibição	HEP	Cr, Cu	Água	Elumalai <i>et al.</i> , 2002
<i>C. maenas</i>	ativação	HEMO e BRA	n.a.	Campo	Astley <i>et al.</i> , 1999
Caranguejo <i>S. serrata</i>	ativação	HEP e HEMO	HPAHPAs *	n.a.	Van Oosterom <i>et al.</i> , 2010
Camarão <i>C. crangon</i>	ativação	AB	Efluente urbano e Industrial	Campo	Quintaneiro <i>et al.</i> , 2006
<i>C. crangon</i>	ativação	AB	Óleo Combustível	Água	Menezes <i>et al.</i> , 2010
Peixe <i>P. microps</i>	ativação	BRA	Cu, Hg	Água	Vieira <i>et al.</i> , 2009
Gastrópode <i>N. lapillus</i>	inibição	BRA	Cu	Água	Cunha <i>et al.</i> , 2007
Molusco <i>R. philippinarum</i>	ativação	GLA	Cu, Mn, Ni, Zn	Campo	Martín-Díaz <i>et al.</i> , 2008a
Ostra <i>C. rhizophorae</i>	ativação	BRA	n.a.	Campo	Zanette <i>et al.</i> , 2006
Mexilhão <i>M. galloprovincialis</i>	ativação	BRA e HEP	Cu, HPAs, PCBs, DDT *	Campo	Vidál-Liñán <i>et al.</i> , 2010
Mexilhão <i>P. perna</i>	não apresentou alteração	BRA	HPAs	Campo	Pereira <i>et al.</i> 2007

AB – Abdômen; BRA – Brânquias; GLA – Glândula Digestiva; HEMO – Hemolinfa; HEP – Hepatopâncreas; n.a. não analisada; * tecido do animal;

Vieira *et al.*, (2009) sugeriram duas diferentes hipóteses para explicar o resultado de ativação da GST obtido em *P. microps*: (i) como a GST é um co-fator da ação da glutathione peroxidase (GPx), o aumento da GPx decorrente do estresse oxidativo ativou também a produção de mais co-fatores, elevando conseqüentemente os níveis de GST no tecido; (ii) como a determinação de GST foi realizada em brânquias, que constituem a primeira barreira contra a entrada de compostos tóxicos no organismo e a GST tem a capacidade de se ligar, capturar e/ou transportar substâncias, o aumento da GST pode ser a primeira tentativa de conter o estresse pela exposição aos metais, sendo capaz de se ligar aos metais e diminuir a concentração local dos compostos, evitando a absorção pelo organismo. Ambas as situações podem ocorrer concomitantemente, o incremento da GST como resposta rápida a contaminação na captura de compostos, e como resposta secundária no suporte as outras vias de detoxificação.

Metais traço também podem se ligar a diferentes grupos funcionais de uma enzima e alterar a atividade da mesma. Normalmente essas reações resultam na desativação da enzima, embora a ligação de cátions metálicos possa em algumas situações estimular sua função catalítica. Variações na atividade de enzimas que catalisam reações irreversíveis podem ter implicações desconhecidas sobre os aspectos de um metabolismo intermediário (WRIGHT & WELBOURN, 2002).

Pereira *et al.* (2007) não observaram alteração na atividade da GST em *Perna perna*, mesmo tendo encontrado alta concentração de HPA nos organismos de uma das estações analisada. Porém os autores destacaram a grande variabilidade na atividade da GST observada para organismos da mesma estação, sugerindo que a população de organismos está exposta a uma condição de estresse, corroborada por efeitos em outros biomarcadores e pela contaminação observada no local. Essa variabilidade também foi observada no presente estudo, assim como as condições de estresse foram documentadas para as regiões analisadas, podendo responder pelo padrão obtido.

Alguns estudos abordam a problemática do potencial Redox dos tecidos branquiais relacionado ao metabolismo aeróbico dos organismos aquáticos, alterado pela condição de estresse de privação de oxigênio e reoxigenação em decorrência do ciclo de maré, fator comum às espécies estuarinas (OLIVEIRA *et al.*, 2005; TOGNI, 2007). Em algumas espécies, um dos métodos de prevenção contra danos causados por ROS resultantes da reoxigenação é a produção/ativação de enzimas durante o período de anoxia, em especial da GST, visando o combate aos danos do estresse oxidativo. Este falso positivo de ativação da GST poderia, por

exemplo, ser induzido em decorrência do estresse de coleta dos organismos, uma vez que estes sejam privados de oxigênio durante o procedimento, e/ou exposição ao ar pelo ciclo de maré.

A fauna dos estuários apresenta uma gama de estratégias adaptativas (p.ex. adaptações fisiológicas), que permitem a sobrevivência sob as condições complexas do sistema, como a capacidade de resistir a ciclos alternados exposição e inundação, e as variações de salinidade (COSTA, 1995).

O caranguejo *G. cruentata*, utilizado como organismo-teste no presente estudo, por ser um caranguejo semi-terrestre apresenta adaptações diferenciadas para sobrevivência no ambiente estuarino. A exposição do organismo ao ar durante a maré baixa ou durante o procedimento de coleta não é um fator restritivo em relação à oxigenação dos tecidos, uma vez que os sistemas que emprega para trocas gasosas continuam ativos. O sistema branquial e pulmonar do *G. cruentata* se mantém ativos, oxigenando os tecidos, o primeiro em menor taxa, pois é capaz de continuar em atividade se as condições de umidade forem preservadas, e o segundo totalmente ativo, visto que realiza as trocas gasosas em contato direto com o ar, possibilitando a manutenção do nível de oxigênio na hemolinfa e, conseqüentemente, nos tecidos do organismo (WILKENS & YOUNG, 1992). Assim, como as condições de umidade foram mantidas durante a coleta e o *G. cruentata* é capaz de realizar trocas gasosas quando exposto ao ar, não esperamos alterações nos níveis de GST relativos ao estresse de hipoxia.

Os autores Zanette *et al.* (2006) levantaram ainda a questão de que a variação observada na GST em ostras *Crassostrea rhizophorae* entre os períodos de verão e inverno numa das estações analisadas pelos autores tenha sido reflexo de fatores sazonais ou se foi decorrente de evento de curto prazo, no caso representado por chuva intensa antes da coleta dos organismos, evento que alterou a salinidade e aumentou o pH da água.

As variações dos padrões abióticos ocasionados por precipitações podem afetar os biomarcadores. Todavia, outras condições decorrentes de um evento intenso de precipitação podem ser responsáveis por essa alteração, como o carreamento de contaminantes para o sistema aquático pelo escoamento superficial da bacia de drenagem e pelo aumento do aporte proveniente dos rios e riachos tributários contaminados que chegam ao sistema principal. Baily *et al.* (2000) observaram o aumento da atividade da GST em mexilhões *Perna perna* e correlacionaram a alteração da atividade com o aumento da pluviosidade e conseqüente

aumento do descarte de efluentes domésticos não tratados diretamente no ambiente cerca de 30 dias antes da coleta dos organismos.

A precipitação na RMF no ano de 2009 apresentou um padrão anormal, o período chuvoso se estendendo até o início de Agosto, com duas ocorrências de chuvas intensas nos meses de Setembro e Outubro. De maneira geral, a pluviosidade foi cerca de 50% maior em 2009 do que no ano anterior, p.ex. o mês de agosto de 2009 apresentou índice de pluviosidade 165% maior que no ano de 2008 (FUNCEME, 2010).

O aumento da pluviosidade pode ter influenciado nos resultados encontrados para GST, especialmente em decorrência do aumento do aporte de contaminantes via escoamento superficial e maior contribuição das fontes difusas (p. ex. esgotos domésticos). Cavalcante *et al.* (2009) descreveram como maior fonte de poluição para os sistemas aquáticos e lençóis freáticos da RMF os contaminantes que chegam através do escoamento superficial e drenagem urbana da região.

Pelos resultados encontrados neste estudo, tendo sido comprovada a toxicidade crônica dos sedimentos, pelos estudos que demonstram alteração da atividade da GST em organismos frente à exposição a compostos como Cu, Cr, Zn e HPA, contaminantes que ocorrem na região de estudo em concentrações acima do efeito limiar a biota e/ou bioacumulados nos organismos descritos em trabalhos recentes (AGUIAR, 2005; LOPES *et al.*, 2005; VAISMAN *et al.*, 2005; LACERDA *et al.*, 2008; NILIN, 2008; CAVALCANTE *et al.*, 2009; TORRES, 2009), a alternativa mais provável é alteração da atividade enzimática da GST.

Nesse sentido, novos estudos devem ser feitos, tanto na identificação de contaminantes nas águas, sedimentos e biota do Rio Pacoti, quanto na análise da atividade da GST em caranguejos da espécie *G. cruentata* provenientes de locais comprovadamente não contaminados. O uso de outros biomarcadores, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), em organismos do Rio Pacoti e do Rio Ceará também poderá oferecer informações importantes para a elucidação dessa questão.

A inibição de Colinesterase (ChE) vêm sendo amplamente aplicada como biomarcador no diagnóstico de um ambiente, indicando a exposição de populações nativas de vertebrados e invertebrados à compostos anticolinérgicos.

O sistema nervoso dos crustáceos apresenta como neurotransmissor a acetilcolina, que normalmente é degradada pela enzima AChE. Com exceção do sistema nervoso, mais de uma ChE é geralmente encontrada nos tecidos dos organismos. Alguns autores identificaram, através do método de variação de substrato e inibidores, o tipo predominante de colinesterase nos tecidos de um organismo, enquanto outros, mesmo variando tipo de substrato e inibidores não conseguiram classificar o tipo visto que as respostas obtidas foram típicas aos dois grupos de enzimas (ATWOOD, 1982; QUINTANEIRO *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2007).

Referente aos resultados da atividade da ChE, esta foi inibida apenas na estação RC1, tanto para brânquias anteriores quanto para as posteriores. A cerca de 800 metros da estação RC1 foi identificada pelo plano de manejo da APA do Estuário do Rio Ceará uma área de policultura (SEMACE, 2005), sendo esta possível fonte de compostos pesticidas, reconhecidos inibidores de atividade de ChEs. Estes compostos são de difícil detecção no ambiente visto que são de rápida degradação. Porém seu efeito tóxico na biota é agudo, severo persistente, podendo ser observado semanas depois da exposição (HABIG *et al.*, 1986).

Já as brânquias anteriores dos organismos do RC2 e Pacoti não apresentaram diferença significativa nem quando comparados ao RC1 nem quando comparados ao RC3 devido a alta variabilidade dos dados. Este nível intermediário pode ser explicado pela presença de outros contaminantes acima de TEL, como Cu, também considerado agente neurotóxico para alguns invertebrados (BROWN *et al.*, 2004), ou uma mistura complexa de contaminantes já descritas anteriormente para as regiões, carregados pela água da chuva, por exemplo.

Tsangaris *et al.* (2007) afirmaram que apenas exposição crônica a altas concentrações de metais pesados induzem efeito de inibição sobre ChE, enquanto Cailleaud *et al.* (2009) e Van der Oosterom *et al.* (2010) observaram inibição de ChE quando da presença de HPAs, nos crustáceos *E.affinis* e *S.Serrata* respectivamente. Cavalcante *et al.* (2009) indicam o interior dos estuários da RMF como zonas de maior contaminação por HPAs que a região da foz, e LACERDA (2008) relatam o aumento da atividade antrópica na bacia do Pacoti, relacionado a pecuária, atividade que por vezes também associa o uso de pesticidas para controle de pragas na pastagem e parasitas no gado.

A alta variabilidade observada nos dados do RC2 e Pacoti pode ser decorrente de uma resposta heterogênea do organismo em decorrência de estresse ambiental. Fatores como tempo e temperatura durante a coleta, transporte ao laboratório e processamento dos organismos, podem ser possíveis interferentes nos dados. Uma vez que os organismos foram

mantidos em ambiente úmido, com temperatura de 25 ± 2 °C, no escuro, e processados em menos de 24 horas após a coleta, não esperamos variabilidades nos dados devido aos procedimentos realizados. É interessante, frente os resultados obtidos, o aumento do número de amostras eliminando possíveis pontos fora de âmbito, além da análise de outros tecidos do organismo, visando entender os efeitos aqui apresentados.

Estudos corroboram a alteração na atividade enzimática da ChE por compostos organofosforados e pesticidas, elementos metálicos em altas concentrações (p.ex. Cu, Cr, Cd), compostos orgânicos (como HPA) e misturas complexas de poluentes, caso dos efluentes (tabela 6).

Ainda não foi definido qual o melhor tecido para as análises de ChE em crustáceos e outros invertebrados (FULTON & KEY, 2001). Vale ressaltar a variabilidade da resposta de um mesmo tecido, dependendo também da via da exposição, e entre organismos para o mesmo tecido, destacando o emprego de diferentes vias metabólicas, além de diferentes susceptibilidades a contaminação.

O trabalho desenvolvido por Cunha *et al.* (2007) observou a inibição da ChE em células musculares de gastrópodes marinhos expostas *in vitro* a Cu, enquanto para o mesmo tecido, frente a exposição *in vivo* a Cd, ativação da ChE, relacionando a variação da resposta de detoxificação na exposição *in vivo*, que envolvem processos intra e extra celulares. Já Brown *et al.* (2004) constataram efeitos diferentes sobre a AChE quando da exposição de 3 espécies de invertebrados a Cu, indicando diferentes vias de depuração.

Tabela 6. Alterações da atividade enzimática de ChE relacionada a exposição à contaminantes.

Organismo	Tipo ChE	Efeito	Tecido	Contaminante	Via de Exposição	Referência
Caranguejo <i>C. maenas</i>	AChE	inibição	HEMO	Cr, Cu	Água	Elumalai et al., 2002
<i>S. serrata</i>	ChE	inibição	HEMO	HPAs *	Campo	Van Oosterom et al., 2010
Camarão <i>C. crangon</i>	AChE	inibição	CEF	Áreas agrícolas e drenagem	Campo	Quintaneiro et al., 2006
<i>C. crangon</i>	AChE	não apresentou alteração	CEF	Fração solúvel de óleo (WAF)	Água	Menezes et al., 2010
Copépodo <i>E. affinis</i>	AChE	inibição	ORG	HPA e PCB	Campo	Cailleaud et al., 2009
Anfípodo <i>G.pulex</i>	ChE	inibição	CEF	pirimiphos-methyl	Água	McLoughlin et al., 2000
Isópodo <i>A. aquaticus</i>	ChE	inibição	ORG	Efluente urbano tratado	Campo	O'Neill et al., 2004
<i>D. magna</i>	AChE	inibição	ORG	Organofosforados	Água	Guilhermino et al, 1996
Caranguejo <i>C. Maenas</i>		inibição				
Molusco <i>P. vulgata</i>	AChE	ativação	HEMO	Cu	Água	Brown et al., 2004
Mexilhão <i>M.edulis</i>		não apresentou alteração				
<i>P. perna</i>	ChE	ativação	BRA	Mn, Cu, Cr *	Campo	Pereira et al. 2007
<i>M. galloprovincialis</i>	AChE	inibição	MUS	Efluentes urbanos	Campo	Tsangaris et al., 2007
Gastrópode <i>N. lapillus e N. lineata</i>		inibição		Cu	<i>In vitro</i>	
<i>N. lapillus</i>	ChE	ativação	MUS	Cd	Água	Cunha et al., 2007
<i>N. lapillus e N. lineata</i>		não apresentaram alteração		Cu	Água	

BRA – Brânquias; CEF – Cefalotórax; HEMO – Hemolinfa; MUS – Músculo; ORG – organismo todo; n.a. não analisada; * tecido do animal.

A inibição da atividade de ChE pode causar desregulação nas funções do sistema nervoso, sensorial e neuromuscular, levando, conseqüentemente, a efeitos deletérios em

diversas funções, incluindo disfunções fisiológicas (p.ex. efeitos sobre taxa de respiração, batimentos cardíacos), alimentação, fuga e comportamento (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Alguns autores correlacionam a inibição da ChE com alterações nas atividades fisiológicas, como Lundebye *et al.* (1997), que observaram a redução nos batimentos cardíacos de *Carcinus maenas* pela ação do pesticida dimetoato, e Habig *et al.* (1986) observou a alteração na musculatura da quela do siri *Callinectes sapidus* em decorrência da exposição a *S,S,S*-tri-*n*-butilfosforatrícioato. Mattos *et al.* (2006) observaram efeitos sobre a acuidade visual do peixe *Poecilia vivipara* relacionada ao efeitos de inibição da AChE pelo composto naftaleno.

Os autores Vieira *et al.* (2009), por exemplo, ao estudarem o efeito de Cu e Hg sobre peixes da espécie *Pomatoschistus microps*, observaram o comprometimento dose-dependente da capacidade de natação dos organismos, esta por sua vez correlacionada à inibição significativa da atividade da AChE, indicando que os compostos estão causando efeito neurotóxico e, conseqüentemente, alteração das funções neurológicas e neuromusculares, com reflexo direto na capacidade de natação. No caso do *P. microps*, um peixe migratório e predador que habita regiões de considerável hidrodinamismo, o comprometimento da capacidade de natação pode afetar a sobrevivência do organismo no ambiente, visto que esta é de vital importância para a ocupação do nicho ideal e captura de alimento.

Portanto, tendo em vista os dados reportados na literatura e a inibição da ChE nos animais de RC1, a ação neurotóxica pode vir a comprometer, entre outras funções, a agilidade dos indivíduos da espécie *G. cruentata* capturados nesse local, já que essa é uma característica inerente deste caranguejo, bem como sua habilidade de fuga, escalada, captura de alimento, etc.

Segundo Brown *et al.* (2004), a normalização da atividade enzimática da ChE pela concentração de proteína do tecido analisado é justificada, porém cuidados devem ser tomados ao assumir as causas do efeito na atividade da ChE, sendo necessário confirmar o status da proteína total como normalizador e não como fator principal da variação encontrada nos valores. No presente estudo, no que diz respeito a normalização pelo conteúdo protéico, não houve relação entre a atividade enzimática de ChE e a concentração de proteína nos tecidos (brânquia anterior $R^2=0,22$ e brânquia posterior $R^2=0,07$), corroborando que o efeito encontrado é decorrente da alteração na atividade enzimática.

Assim, para a avaliação da atividade de ChE, foi considerada sob efeito deletério a Estação RC1 em decorrência da possível contaminação por pesticidas.

Se a formação de compostos oxidantes e outros agentes de toxicidade para a célula não for inibida, estes podem levar a inativação de enzimas, peroxidação lipídica, danos no DNA e por fim a morte celular. Danos no DNA levam a transcrição incompleta, disfunções celulares, inibição no crescimento, efeitos negativos sobre a imunidade e reprodução, doenças, e outros efeitos deletérios sobre o organismo (WINSTO *et al.*, 1991; WOO *et al.*, 2006).

A molécula de DNA dos invertebrados marinhos, segundo Dixon & Wilson (2000), expressa os danos induzidos por substâncias químicas de forma muito similar ao registrado para os vertebrados, validando a importância e a aplicabilidade dos testes genotóxicos nestes grupos animais.

As quebras de fita observadas através do teste do cometa não são possíveis de relacionar a compostos específicos, porém são uma medida fácil e sensível ao estresse ambiental, sendo uma consequência comum a agentes genotóxicos e um dos *endpoints* mais sensíveis para danos no DNA (NACCI *et al.*, 1996).

Diferentes tecidos podem ser utilizados para ensaios de monitoramento. O uso da hemolinfa é recomendado visto que demanda menor manipulação do tecido, o que reduz a possibilidade de dano quando da execução do ensaio, além de desempenhar, entre outros, um importante papel na defesa imune, no transporte de substâncias e metabólitos, e na excreção e detoxificação de xenobióticos (MERSCH *et al.*, 1996; SIU *et al.*, 2004; VILLELA *et al.*, 2007).

Os organismos de todas as estações do RC se apresentaram significativamente diferentes perante a comparação com os indivíduos do Pacoti. Os danos no DNA nas células de hemolinfa mostram que vias de detoxificação, apesar de ativas, não estão sendo suficientes para lidar com a contaminação na região do Rio Ceará, ao contrário do Pacoti, onde os mecanismos de detoxificação estão ativos e não foram observados danos, indicando que estes estão sendo eficientes para lidar com a contaminação da região.

A complexidade da contaminação, a ocorrência de compostos acima de TEL, como Cu e HPA (compostos orgânicos comumente genotóxicos), podem responder pelo padrão de dano encontrado no RC.

Muitos estudos demonstram danos genotóxicos relacionados à exposição a contaminantes (tabela 7).

Tabela 7. Danos no DNA em organismos aquáticos relacionados à exposição a contaminantes analisados segundo o Ensaio do Cometa.

Organismo	Tecido	Contaminante	Via de Exposição	Referência
Mexilhão <i>M. falcata</i>	HEMO	n.a.	Campo	David, 2007
<i>M. falcata</i>	HEMO e BRA	Metilmetanosulfonato	Água	David <i>et al.</i> , 2007
<i>L. fortunei</i>	HEMO	Radiação UV	<i>in vitro</i>	Villela <i>et al.</i> , 2006
		Pentaclorofenol e Cu	Água	
<i>L. fortunei</i>	HEMO	Efluente Urbano	Sedimento	Villela <i>et al.</i> , 2007
<i>D. polymorpha</i>	HEMO	Triclosan e Triprymethoprim	<i>in vitro</i>	Binelli <i>et al.</i> , 2009
<i>M. galloprovincialis</i>	BRA	Cr e Fe *	Campo	Nigro <i>et al.</i> , 2006
<i>M. edulis</i>	HEMO e BLO	Estireno	Água	Mamaca <i>et al.</i> , 2005
Peixe <i>S. mellops</i>				
Peixe <i>P. olivaceus</i>	BLO	HPA	Sedimento	Woo <i>et al.</i> , 2006
Camarão <i>P. pugio</i>	EMB	2,metil-1,4-naftoquinona, Cr e Hg	Água	Lee <i>et al.</i> , 2000
Caranguejo <i>C. sapidus</i>	EMB	2,metil-1,4-naftoquinona e 4-nitroquinolina-N-óxido	Água	Lee <i>et al.</i> , 1999

BRA – Brânquias; BLO – Eritrócitos; EMB - Embrião; HEMO – Hemolinfa; * tecido do animal.

Os danos no DNA podem ter efeito dose-dependente, como relatam Binelli *et al.* (2009), ao observarem aumento do índice de dano em hemolinfa do mexilhão zebra acompanhando o aumento da concentração de Triclosan no experimento.

David (2007) considerou que a resposta encontrada para mexilhões no estuário de Santos – SP decorrente da conhecida contaminação da região por compostos genotóxicos como o benzo(a)pireno, um dos principais HPA que ocorrem no meio. O autor discutiu ainda capacidade de reparo nos danos observados pelo ensaio do cometa, visto que para os mesmos pontos onde o dano no DNA foi significativo, não houve diferenças na análise de micronúcleos, técnica que depende da fixação do dano e da divisão mitótica para expressá-lo, sugerindo que a discordância entre os dados da análise de micronúcleos e do ensaio do cometa ocorreu devido ao fato dos danos genotóxicos terem sido reparados antes do processo de divisão dos hemócitos, mostrando eficiência nos mecanismos de reparo.

Os autores Villela *et al.* (2006) também discutiram a capacidade de reparo após a exposição do mexilhão zebra *in vivo* ao pentaclorofenol, destacando o possível reparo por excisão de pares de base. Todos os organismos apresentam mecanismos de reparo contra lesões severas no DNA. A ocorrência de quebras na fita de DNA e formação dos fragmentos se dá, basicamente, durante o processo de reparo, a observação de quebras de fita sugere, conseqüentemente, a existência de várias lesões no DNA (WOO *et al.*, 2006).

Como biomarcador de efeito, o ensaio do cometa indicou, portanto, o comprometimento da qualidade no Estuário do Rio Ceará.

5.3. Avaliação de Risco Ambiental e sua aplicabilidade na ZC – CE

O ambiente aquático (p.ex. rios, estuários, bacias) é normalmente o destino final de uma gama crescente de contaminantes, como HPA, PCB e compostos pesticidas, que são amplamente distribuídos em ambiente terrestre e apresentam fluxo contínuo para o sistema aquático. Esta característica de recepção e concentração de contaminantes dos ambientes estuarinos é o maior desafio das agências regulatórias e gestores costeiros para a proteção da qualidade dos recursos naturais. Esse desafio é particularmente árduo no que concerne aos compostos altamente tóxicos em concentrações abaixo do limite de detecção das técnicas existentes. Mesmo que estes contaminantes possam ser quantificados no meio ou na biota, a sua simples detecção não é suficiente sem o conhecimento dos efeitos biológicos e ecológicos sobre os organismos expostos (JHA, 2008), sendo os efeitos dessas interações avaliados através de métodos como os ensaios ecotoxicológicos.

Em estudos ecotoxicológicos é importante avaliar a resposta ao estresse ambiental pela fauna nativa, buscando espécies indicadoras ou sentinelas perante a contaminação ambiental (PELLACANI *et al.*, 2006).

Mesmo quando não se pode observar efeitos agudos sobre a biota ou sua composição (efeito agudo representando o mais avançado dos efeitos nocivos causados por contaminantes), é possível utilizar abordagens mais sensíveis (*early warning*) e capazes de medir alterações antes que efeitos mais severos aconteçam sobre os processos ecológicos. Assim, a aplicação dos biomarcadores e de testes sub-letais como linhas de evidência pode indicar situações onde o risco ambiental deve ser considerado para a gestão e proteção do meio, permitindo que ações de controle efetivas sejam tomadas, antes que os efeitos se tornem irreversíveis.

Morales-Caselles *et al.* (2008; 2009) ao monitorarem, através das múltiplas linhas de evidência, o impacto de uma derrame de óleo na costa Espanhola, concluíram que, apesar de o combustível não apresentar mais efeitos agudos sobre o ambiente após quatro anos do derrame, este, associado a outros *inputs* antrópicos, continua a provocar efeitos sub-letais nos organismos nas áreas afetadas. O fato, segundo os autores, indica que a mistura de poluentes continua afetando os organismos da região, que deve ser considerada sob potencial risco, demandando medidas mitigadoras para a contaminação existente.

Em relação à inclusão dos biomarcadores como importante linha de evidência, Martín-Díaz *et al.* (2008b) elucidam que a aplicação desta ferramenta vem se tornando cada dia mais importante dentro da avaliação do risco ambiental, e que a mesma deve estar em constante desenvolvimento para se adequar e otimizar o processo de avaliação. Os autores destacam ainda a necessidade do uso de uma combinação de biomarcadores e testes ecotoxicológicos com o compartimento ao qual o organismo esteja exposto, provendo o “diagnóstico” do estresse do organismo.

Nessa linha de pensamento, o presente estudo abordou linhas de evidência biológicas, no caso biomarcadores e testes de toxicidade com sedimentos, com o intuito de avaliar a qualidade de dois estuários da Região Metropolitana de Fortaleza com diferentes graus de contaminação descritos em literatura, e prover informações para a avaliação de risco ambiental da região.

Uma visão qualitativa dos resultados de toxicidade e biomarcadores, e quantitativa das características dos sedimentos é apresentada na tabela 8, fornecendo um resumo dos resultados encontrados neste estudo.

Tabela 8: Sumário dos efeitos nos organismos e características dos sedimentos encontrados neste estudo.

Estação	MO (%)	CaCO ₃ (%)	Lama (%)	ISA	SI	ChE	GST	Cometa
RC1	8,16	10,24	34,87	IT	T	EF	IN	EF
RC2	22,09	12,52	85,78	T	T	NO	IN	EF
RC3	10,45	14,37	67,42	T	T	NO	IN	EF
Pacoti	13,02	22,07	95,51	T	T	NO	IN	NO

EF: efeito; IT: Índice de toxicidade; T: tóxico; NO: efeito não observado; IN: inconclusivo.

Os resultados demonstram um comprometimento da qualidade ambiental dos estuários, tanto pela resposta dos testes de toxicidade, quanto pelos efeitos sobre os biomarcadores analisados no caranguejo *G. cruentata*.

Foram observadas contaminação moderada (dados compilados da literatura disponível) e toxicidade crônica para o estuário do RC, enquanto para o Pacoti ocorreu toxicidade crônica e indícios de aumento da contaminação que, no entanto, foi classificada como inexistente, aplicando aos dados a classificação de contaminação delineada por Carr *et al.* (1996a; 1996b).

A GST foi inconclusiva, sendo considerado o possível efeito sobre a atividade da mesma frente a contaminação descrita para os estuários. Uma vez ativos os mecanismos de depuração, estes não estão sendo suficientes para lidar com a contaminação na região do Rio Ceará, conclusão com base nos efeitos deletérios sobre o DNA observados para o estuário. Ainda em relação aos biomarcadores, a ChE apresentou inibição para a região RC1, estação sob influência de área de policultura.

Assim, o estuário do Rio Ceará por ter apresentado alteração em todas as LOE avaliadas, caracterizando efeito severo sobre a biota, foi considerado sob risco, sendo este proporcionalmente pior que o observado no estuário do Pacoti, demandando ações imediatas (e urgentes) por parte dos gestores para controle dos impactos, além de esforços para a recuperação da área.

Já o Rio Pacoti se apresenta como um estuário menos degradado, pela ausência de efeitos sobre o DNA dos organismos avaliados, e de efeitos sobre a ChE. Porém, visto seu

efeito deletério na reprodução e desenvolvimento de organismos (evidenciado pelos testes de toxicidade crônica) e possível efeito sobre a atividade enzimática da GST, efeitos moderados sobre a biota, aplicando o princípio da prevenção, a área também foi considerada sob risco, demandando esforços no monitoramento, identificação e controle das fontes poluidoras, além de outras ações regulatórias e de mitigação de impacto por parte do órgão ambiental, para frear o quadro de degradação observado pelo presente estudo.

O aumento da pressão antrópica vem ocorrendo em algumas áreas costeiras do NE brasileiro, com o aumento do desenvolvimento baseado na exploração dos recursos hídricos para atividades como pecuária, irrigação, agricultura, aqüicultura e urbanização (LACERDA *et al.*, 2008). Vale lembrar que ambos os estuários foram enquadrados como APA, com o objetivo, segundo CEARA (1999; 2000), de primar pela conservação das regiões e garantir o uso e qualidade dos recursos naturais, preservar a alta diversidade biológica e proteger esses ecossistemas específicos de suma importância na Zona Costeira Cearense.

Segundo o SNUC, a Área de Proteção Ambiental (APA) é uma região em geral extensa, com um certo grau de ocupação humana, dotada de atributos abióticos, bióticos, estéticos ou culturais especialmente importantes para a qualidade de vida e o bem-estar das populações humanas, e tem como objetivos básicos proteger a diversidade biológica, disciplinar o processo de ocupação e assegurar a sustentabilidade do uso dos recursos naturais, podendo ser contituídas por terras públicas ou privadas.

O documento considerado de maior importância para a efetiva implementação da unidade é o Plano de Manejo, que, por exigência do SNUC (BRASIL, 2000), deve ser elaborado e instituído em no máximo cinco anos a partir da data da criação da UC.

Os objetivos pretendidos quando da criação das áreas pelo órgão ambiental não vêm sendo alcançados, principalmente no que concerne a preservar a diversidade biológica, frear a pressão antrópica e a degradação das áreas, ordenar o uso dos recursos naturais e garantir sua qualidade. Um dos principais motivos é a falta de governança por parte do órgão ambiental, tendo como exemplo a não implementação dos planos de manejo das unidades. No caso da APA do Estuário do Rio Ceará existe Plano de Manejo (SEMACE, 2005), mas este ainda não foi publicado em Diário Oficial, invalidando o documento no caso de caráter regulatório. Dentro da própria SEMACE não existe consenso sobre a aplicação do documento até então, já considerado por muitos obsoleto (normalmente ações de revisão e reajuste das diretrizes da

UC são previstas no plano). No caso da APA do Estuário do Rio Pacoti, não existe plano de manejo, mesmo passados 10 anos da criação da APA.

O esforço em criar uma área de preservação em locais impactados de relevância ecológica para o Estado visando garantir um maior controle ambiental (freando impactos, mitigando os existentes e revertendo o quadro de degradação) é louvável, e considerado um primeiro e válido passo em busca de uma melhor qualidade ambiental. Porém, a questão que hoje afeta as APA aqui apresentadas é: como as unidades conseguirão cumprir os seus objetivos de conservação frente a degradação e risco ambiental por este estudo elucidada e a crescente pressão antrópica em suas bacias? A solução possível seria a retomada da governança sobre as regiões, a concretização e implementação real das APA pelo órgão competente (no caso o órgão ambiental do Estado), e a fiscalização por parte da sociedade civil, do terceiro setor e do Ministério Público para que o processo seja realmente implantado.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sedimentos dos estuários do RC e do Pacoti apresentaram toxicidade crônica. Em relação aos biomarcadores aqui avaliados, foi observado efeito deletério sobre a ChE, possivelmente relacionado a ocorrência de pesticidas; a alteração da atividade da GST foi inconclusiva, demandando mais estudos para a elucidação do padrão observado; os danos no DNA foram severos para a região do RC, indicando efeitos genotóxicos na região.

O estuário do Rio Ceará foi considerado mais degradado que o estuário do Rio Pacoti, através das abordagens biológicas aplicadas pelo presente estudo. Ambos os estuários foram identificados como sob risco ambiental, o Rio Ceará com efeitos mais severos e demandando ações urgentes de controle ambiental. A implementação das APA como estratégia para melhoria da qualidade ambiental é interessante, o primeiro passo recomendado a elaboração e validação dos respectivos planos de manejo e a intensificação do monitoramento e fiscalização, visando frear o quadro de degradação por este estudo apresentado.

Em relação a utilização do *Goniopsis cruentata* como organismo-teste, este se apresentou promissor, sendo necessários mais estudos, como a aplicação de outros biomarcadores e a análise de diferentes tecidos, para a validação da espécie como organismo sentinela de estuários tropicais e sub-tropicais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA, D.M.S.** *Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos*. Tese de Doutorado, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 2002, p.290.
- ABESSA, D.M.S.; RACHID, B.R.F.; SOUSA, E.C.P.M.** Preliminary results in the sexual dimorphism determination of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) Echinoidea - Toxopneustidae. *Revista Brasileira de Oceanografia*, v.49, n.1/2, p.133-135, 2001.
- ABESSA, D.M.S.; BÍCEGO, M.C.; SARKIS, J.E.; HORTELLANI, M.A.; SOUSA, E.C.P.M.** Predictive power of sediment quality guidelines for sediments from the Santos Estuarine System. In: HERKOVITZ, J.(Org.) *Salud Ambiental y Humana: una Vision Holistica*. SETAC Latinoamerica, Buenos Aires, p. 55-57, 2006.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.** Toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata; Echinoidea). Norma Técnica NBR no. 15350, São Paulo, 2006, 17p.
- ADAMS, W.J.; KIMERLE, R.A.; BARNETT, J.W.** Sediment quality and aquatic life assessment. *Environmental Science and Technology*, v. 26, n. 10, p. 1864-1875, 1992.
- AGUIAR, J.E. MARINS, R.V. MAIA, S.R.R.** Copper and zinc geochemical distribution in bottom sediments from the Ceará-Maranguapinho river estuary (CE). *Anais do 4th International Symposium Environmental Geochemistry in Tropical Countries*, Buzios, Brazil, 2004.
- AGUIAR, J. E.** *Geoquímica de metais-traço em sedimentos superficiais nos estuários dos rios Ceará e Pacoti, CE*. Monografia, Universidade Federal do Ceará, 2005, 62p.
- AGUIAR, J.E.; MARINS, R.V.; ALMEIDA, M.D.** Comparação de metodologias de digestão de sedimentos marinhos para caracterização da geoquímica de metais-traço na plataforma continental nordeste oriental brasileira. *Geochimica Brasiliensis*, v.21, n.3, p.304 - 323, 2007.
- AKCHA, F.; TANGUY, A.; LEDAY, G.; PELLUHET, L.; BUDZINSKI, H.; CHIFFOLEAU, J-F.** Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. *Marine Environmental Research*, v.58, p.753–756, 2004.
- ALMEIDA, E.A.; BAINY, A.C.D.; LOUREIRO, A.P.M.; MARTINEZ, G.R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L.F.; GARCIA, C.C.M.; PRADO, F.M.; RONSEIN, G.E.; SIGOLO, C.A.; BROCHINI, C.B.; MARTINS, A.M.G.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P.** Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A*, v.146, p.588–600, 2007.
- ANDERSON, B. S.; HUNT, J.W.; PHILLIPS, B.M.; FAIREY, R.; ROBERTS, C.A.; OAKDEN, J.M.; PUCKETT, H.M.; STEPHENSON, M.; TJEERDEMA, R.S.; LONG, E.R.; WILSON, C.J.; LYONS, J.M.** Sediment quality in Los Angeles Harbor, USA: A Triad assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, p.359-370, 2001.
- ARAÚJO, R.P.A.; SHIMIZU, G.Y.; BOHRER, M.B.C.; JARDIM, W.** Avaliação da qualidade de sedimentos. In: Zagatto, P.A.; Bertolotti, E. *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*. RiMa, São Carlos, cap. 13, p. 293-326, 2006.
- ASTLEY, K.N.; MEIGH, H.C.; GLEGG, G.A.; BRAVEN, J.; DEPLEDGE, M.H.** Multi-variate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). *Marine Pollution Bulletin*, v.39, p.145-154, 1999.
- ATWOOD, H.L.** Synapses and neurotransmitters. In: ATWOOD, H.L. & SANDEMAN, D.C. *The Biology of Crustaceans - Neurobiology: Structure and function*. Academic Press, v.3, p.105–150, 1982.
- ÁVILA, F.J.C.** *Modelo de conservação da área de proteção ambiental do Baixo Rio Pacoti, Ceará*. Dissertação de Mestrado, PRODEMA, Pós Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Ceará, 2005, p.170.
- BAINY, A.C.D.; ALMEIDA, E.A.; MULLER, I.C.; VENTURA, E.C.; MEDEIROS, I.D.** Biochemical responses in farmed mussels *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Marine Environmental Research*, v.50, p.411-416, 2000.
- BAUMARD, P.; BUNDZINSKY, P.; GARRIGUES, H.; DIZER, P.; HAMSEN, H.P.D.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research*, v.47, p.17-47, 1999.
- BIANCHINI, A.; MONSERRAT, J.M.; RIBEIRO, C.A.O.** Biomarcadores de poluição em animais aquáticos. In: LANA, P.C.; BIANCHINI, A.; RIBEIRO, C.A.O.; NIENCHESKI, L.F.H.; FILLMANN, G.; SANTOS, C.S.G. *Avaliação ambiental de estuários brasileiros*. Instituto do Milênio, cap.5, p.119-132, 2006.

- BINELLI, A.; COGNI, D.; PAROLINI, M.; RIVA, C.; PROVINI, A.** Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, v.150, p.50–56, 2009.
- BRASIL.** Constituição de 1988. Capítulo 6, artigo 225, parágrafo 4. Define a Zona Costeira como Patrimônio Nacional. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1988a.
- BRASIL.** Lei nº 7661, de 16 de maio de 1988. Institui o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1988b.
- BRASIL.** Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2000.
- BRASIL.** Resolução Conama nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, Edição nº 53 de 18/03/2005.
- BRITO, M.C.W.** *Unidades de conservação: intenções e resultados*. Annablume, FAPESP, São Paulo, 2000, 230p.
- BROWN, R.J.; GALLOWAY, T.S.; LOWE, D.; BROWNE, M.A.; DISSANAYAKE, A.; JONES, M.B.; DEPLEDGE, M.H.** Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, v.66, p.267–278, 2004.
- BRUSCA, G.J.; BRUSCA, R.C.** *Invertebrates*. 2 Ed., Sinauer Associates, 2003, 936 p.
- BURTON, G.A.** Assessing contaminated aquatic sediments. *Environmental Science and Technology*, v.26, n.10, p.1862-1863, 1992.
- CAILLEAUD, K.; FORGET-LERAYC, J.; PELUHET, L.; LEMENACHA, K.; SOUISSI, S.; BUDZINSKI, H.** Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environmental Pollution*, v.157, p.64–71, 2009.
- CAIRRÃO, E.; COUDERCHET, M.; SOARES, A.M.V.M.; GUILHERMINO, L.** Glutathione-S-transferase activity of *Fucus* spp. as a biomarker of environmental contamination. *Aquatic Toxicology*, v.70, p.277–286, 2004.
- CARR, R. S.; CHAPMAN, D. C.; HOWARD, C. L. & BIEDENBACH, J. M.** Sediment quality triad assessment survey of the Galveston Bay, Texas system. *Ecotoxicology*, v.5, p.341-364, 1996a.
- CARR, R. S.; LONG, E. R.; WINDON, H. L.; CHAPMAN, D. C.; THURSBY, T.; SLOANE, G. M. & WOLFE, D. A.** Sediment quality triad studies of Tampa Bay, Florida. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.15, n.7, p.1218-1231, 1996b.
- CAVALCANTE, R.M.; Sousa, F.W.; Nascimento, R.F.; Silveira, E.R.; Freire, G.S.S.** The impact of urbanization on tropical mangroves (Fortaleza, Brazil): Evidence from PAH distribution in sediments. *Journal of Environmental Management*, v.91, p.328–335, 2009.
- CEARÁ (Estado).** Decreto nº 25.413, de 29 de março de 1999. Declara o Estuário do rio Ceará como área de proteção ambiental. *Diário Oficial do Estado do Ceará*, 29/03/1999.
- CEARÁ (Estado).** Decreto nº 25.777, de 15 de fevereiro 2000. Declara Corredor Ecológico do Rio Pacoti como área de proteção ambiental. *Diário Oficial do Estado do Ceará*, 17/02/2000a.
- CEARÁ (Estado).** Decreto nº 25.778 de 15 de fevereiro de 2000. Declara o Estuário do rio Pacoti como área de proteção ambiental. *Diário Oficial do Estado do Ceará*, 17/02/2000b.
- CETESB.** *Relatório de qualidade das águas litorâneas do estado de São Paulo – 2007*. São Paulo, Relatório Técnico, CETESB, 2008, 294p.
- CESAR, A.** *Análisis ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la costa de Murcia: el caso de Portmán, sudeste – España*. Tese de Doutorado. Universidad de Murcia, Departamento de Ecología e Hidrología, 2002, p.252.
- CHAPMAN, P.M.; McDONALD, B.G.; LAWRENCE, G.S.** Weight of evidence frameworks for sediment quality and other assessments. *Human Ecology Risk Assessment*, v.8, p.1489–1515, 2002.
- CHAPMAN, P.M.; WANG, F.; JANSSEN, C.; PERSOONE, G.; ALLEN, H.E.** Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: Binding and re-lease, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Science*, v.55, p.2221–2243, 1998.
- CHESTER, R.** *Marine Geochemistry*, Londres, Chapman & Hall, 1993, 698p

- CHOUERI, R.B.;** CESAR, A.; ABESSA, D.M.S.; TORRES, R.J.; MORAIS, R.D.; RIBA, I.; PEREIRA, C.D.S.; NASCIMENTO, M.R.L.; MOZETO, A.A.; DELVALLS, T.A. Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: Comparison against national and international sediment quality benchmarks. *Journal of Hazardous Materials*, v.170, p.320–331, 2009.
- CLARK, J.R.** *Coastal Seas: the conservation challenge*. Oxford, Blackwell Science, 1998, 131p.
- COBO, V.J.;** FRANSOZO, A. External factors determining breeding season in the red mangrove crab *Goniopsis cruentata* (Latreille) (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) on the São Paulo State northern coast, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.20, n.2, p.213-217, 2003.
- COSTA, T.M.** *Ciclo reprodutivo de Callinectes danae Smith, 1869 (crustacea, decapoda, portunidae) na região de Ubatuba (SP)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005, 94p.
- CUNHA, I.;** MANGAS-RAMIREZ, E.; GUILHERMINO, L. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, v.145, p.648–657, 2007.
- DAVID, J.A.O.** *Estudo de Mytella falcata (Mollusca, Bivalvia) como indicadora de efeitos genotóxicos e citotóxicos no estuário de Santos, SP*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro, Rio Claro, 2007, 205 p.
- DAVID, J.A.O.;** HOSHINA, M.M.; FONTANETTI, C.S. DNA damage in *Mytella falcata* (Mytiloidea, Mytilidae) cells: a new tool for biomonitoring studies in tropical estuarine ecosystems. *Naturalia*, v.31, p.1-7, 2008.
- DEPLEDGE, M.H. & FOSSI, M.C.** The role of biomarkers in environmental assessment (2): Invertebrates. *Ecotoxicology*, v.3, p.161–172, 1994.
- DIXON, D.R. & WILSON, J.T.** Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia*, v.420, p.29–43, 2000.
- DHAWAN, A.;** BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of dna damage in different models. *Cellular Biology and Toxicology*, v.25, p.5–32, 2009.
- ELLMAN, G.L.;** COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical and Pharmacology*. v.7, p.88–95, 1961.
- ELUMALAI, M.;** ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. Effects of single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. *Water, Air, and Soil Pollution*, v.141, p.273–280, 2002.
- ELUMALAI, M.;** ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. *Chemosphere*, v.66, p.1249–1255, 2007.
- ENVIRONMENTAL CANADA** - Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian environmental quality guidelines, 1999. <http://www.ec.gc.ca>, accessed 2007.
- FARIA, M.M.;** SANCHEZ, A.N. Geochemistry and mineralogy of recent sediments of Guanabara Bay (NE sector) and its major rivers - Rio de Janeiro state - Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.73, n.1, 2001.
- FOSSI, M.C.;** CASINI, S.; SAVELLI, C.; CORBELLI, C.; FRANCHI, E.; MATTEI, N.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; CORSI, I.; BAMBER, S.; DEPLEDGE, M.H. Biomarker responses at different levels of biological organisation in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere*, v.40, p.861-874, 2000.
- FULTON, M.H. & KEY, P.B.** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.20, n.1, p.37–45, 2001.
- FUNCEME** – Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. Disponível em: < <http://www.funceme.br/areas/monitoramento> >. Acesso em: 10 de Fevereiro, 2010.
- GALLOWAY, T.S.** Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, v.53, p.606–613, 2006.
- GROSS, M.G.** Carbon determination. In: CARVER, R.E. *Procedures in sedimentary petrology*, Wiley-Interscience, Nova Iorque, p. 573-596, 1971.
- GORAYEB, A.;** SILVA, E.V.; MEIRELES, A.J.A. Impactos ambientais e propostas de manejo sustentável para a planície flúvio-marinha do Rio Pacoti-Fortaleza/Ceará. *Revista Sociedade e Natureza*, Uberlândia, v.17, n.33, p.143-152, 2005.
- GORBI, S.;** LAMBERTI, C.V.; NOTTI, A.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; MOLTEDO, G.; REGOLI, F. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Marine Environmental Research*, v.65, p.34–49, 2008.

- GOWLAND, B.T.G.; MOFFAT, C.F.; STAGG, R.M.; HOULIHAN, D.F.; DAVIES, I.M.** Cypermethrin induces glutathione *S*-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research*, v.54, p.169–177, 2002.
- GUILHERMINO, L.; LOPES, M.C.; CARVALHO, A.P.; SOARES, A.M.V.M.** Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, v.32, n.4, p.727-738, 1996.
- GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M.C.; SOARES, A.M.V.M.** Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?. *Biomarkers*, v.3, p.157–163, 1998.
- HABIG, W.; PABST, M.; JAKOBY, W.** Glutathione *S*-transferases - the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry*, v.249, p.7130–7139, 1974.
- HABIG, C.; Di Giulio, R.T.; Nomeir, A.A.; Abou-Donia, M.B.** Comparative toxicity, cholinergic effects, and tissue levels of *S,S,S*,tri-*n*-butyl phosphorotrithioate (DEF) to channel catfish and blue crabs. *Aquatic Toxicology*, v.9, p.193–206, 1986.
- HERMES-LIMA, M.** *Functional metabolism: Regulation and Adaptation*. In: STOREY, K.B. John Wiley & Sons, p.320-68, 2004.
- IRVING, M.A.; OLIVEIRA, A.M.E.; LIMA, H.H.** Aspectos bioecológicos do Estuário do Rio Pacoti, Ceará, Brasil. *Arquivos de Ciências do Mar*, v.27, p.91-100, 1988.
- JHA, A.N.** Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research*, v.552, p.1–17, 2004.
- JUVÊNCIO, F.J.M.** *Caracterização física e química das águas e determinação de metais-traço nas águas e sedimentos do Estuário do Rio Ceará*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997, 122p.
- KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B.** Mechanism for several activities of the glutathione-*S*-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 251, p. 6183–6188, 1976.
- KENNISH, M.J.** *Ecology of estuaries: anthropogenic effects*, Boca Raton, CRC Press, 1992, 494 p.
- KEHRIGA, H.A.; PINTO, F.N.; MOREIRAS, I.; MALM, O.** Heavy metals and methylmercury in a tropical coastal estuary and a mangrove in Brazil. *Organic Geochemistry*, v.34, p.661–669, 2003.
- LACERDA, L.D. & MARINS, R.V.** Geoquímica de sedimentos e o monitoramento de metais na plataforma continental Nordeste Oriental do Brasil. *Geochemica Brasiliensis*, v.20, n.1, p.123-135, 2006.
- LACERDA, L.D.L.; MOLISANI, M.M.; SENA, D.; MAIA, L.P.** Estimating the importance of natural and anthropogenic sources on N and P emission to estuaries along the Ceará State Coast NE Brazil. *Environmental Monitoring Assessment*, v.141, p.149–164, 2008.
- LEE, R.F.; STEINERT, S.; NAKAYAMA, K.; OSHIMA, Y.** Use of DNA damage (comet assay) and embryo development defects to assess contaminant exposure by blue crab (*C. sapidus*) embryos. In: HENSHEL, D.S.; BLACK, M.C.; HARRASS, M.C. *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment*, v.8, ASTM STP-1364, West Conshohocken, PA, p.341–349, 1999.
- LEE, R.; KIM, G.B.; MARUYA, K.A.; STEINERT, S.A.; OSHIMA, Y.** DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants. *Marine Environmental Research*, v.50, p.553-557, 2000.
- LEE, R.F. & STEINERT, S.** Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, v.544, p.43–64, 2003.
- LEHNINGER, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M.** *Princípios de bioquímica*. 4. ed., São Paulo, Sarvier, 2006, 1202p.
- LIMAVERDE, A. M.; WAGENER, A.L.R.; FERNANDEZ, M.A.; SCOFIELD, A.L.; COUTINHO, R.** Stramonita haemastoma as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. *Marine Environmental Research*, v.64, p.384–398, 2007.
- LIVINGSTONE, D.R.** Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, v.7, p.45–185, 1991.
- LONG, E.R.; MacDONALD, D.D.; SEVERN, G.G.; HONG, C.B.** Classifying probabilities of acute toxicity in marine sediments with empirically derived sediment quality guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.19, n.10, p.2598-2601, 2000.
- LOPES, D.V.; PIMENTA, M.G.R.; SANTOS, J.A.; MARINS, R.V. & LACERDA, L.D.** Contaminação por Cu, Zn e Cd em bivalves nos estuários de Fortaleza. *Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, Ceará, 2005*.
- LORING, D.H.** Normalization of heavy-metal data from estuarine and coastal sediments. *ICES - Journal of Marine*

Sciences, v.48, p.101–115, 1991.

- LORING, D.H. & RANTALA, R.T.T.** Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth-Science Reviews*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, v.32, p.235-283, 1992.
- LOTUFO, G.R. & ABESSA, D.M.S.** Testes de toxicidade com sedimentos total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. *In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M. & Nipper, M.G. Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*, Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, cap.13, p.151-162, 2002.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.;** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. v.193,n.1, p.265-275, 1951.
- LUNDENBYE, A.K.; CURTIS, T.M.; BRAVEN, J.; DEPLEDGE, M.H.** Effects of the organophosphorous pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (ache) activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Aquatic Toxicology*, v.40, p.23–26, 1997.
- MACHADO, W.; SILVA-FILHO, E.V.; OLIVEIRA, R.R.; LACERDA, L.D.** Trace metal retention in mangrove ecosystems in Guanabara Bay, SE, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, p. 1277-1280, 2002.
- MAGNI, P.; DE FALCO, G.; FALUGI, C.; FRANZONI, M.; MONTEVERDE, M.; PERRONE, E.; SGRO, M.; BOLOGNESI, C.** Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environmental pollution*, v.142, n.1, p. 65-72, 2006.
- MAMACA, E.; BECHMANN, R.K.; TORGRIMSEN, S.; AAS, E.; BJØRNSTAD, A.; BAUSSANT, T.; LE FLOCH, S.** The neutral red lysosomal retention assay and comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquatic Toxicology*, v.75, p.191–201, 2005.
- MANAHAN, S.E.** *Fundamentals of environmental chemistry*. CRC Press, Boca Raton, Flórida, 2001, 991p.
- MARACANAÚ – SITE OFICIAL DA CIDADE DE MARACANAÚ.** Disponível em: < <http://www.maracanau.ce.gov.br> >. Acesso em: 10 de Fevereiro, 2010.
- MARTÍN-DÍAZ, M.L.; VILLENA-LINCOLN, A.; BAMBER, S.; BLASCO, J.; DELVALLS, T.A.** An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere*, v. 58, n.5, p.615-626, 2005.
- MARTÍN-DÍAZ, M.L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T.A.** Biomarkers study for sediment quality assessment in spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.53, p.66–76, 2007a.
- MARTÍN-DÍAZ, M.L.; Gagne, F.; Blaise, C.; Delvalls, T.A.** The use of a battery of biomarkers to assess the ecotoxicological effects of pharmaceutical and personal care products (PPCPS) in the mussel *Elliptio complanata*. *ISTA 13 Congress*, Toyama, Japan, 2007b.
- MARTÍN-DÍAZ, M.L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T A.** Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environmental Pollution*, v.151, p.631-640, 2008a.
- MARTÍN-DÍAZ, M.L.; DELVALLS, T.A.; RIBA, I.; BLASCO, J.** Integrative sediment quality assessment using a biomarker approach: review of 3 years of field research. *Cellular Biology and Toxicology*, v.24, p.513–526, 2008b.
- MASSOULIÈ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALETTE, F.M.** Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progress in Neurobiology*. v.41, p.31–91, 1993.
- MASTROTI, R. R.** *Toxicidade e biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar*. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 1997, 111 p.
- MASUI, D.C.; FURRIEL, R.P.M.; McNAMARA, J.C.; MANTELATTO, F.L.M.; LEONE, F.A.** Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na⁺,K⁺)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comparative biochemistry and physiology: toxicology & pharmacology*, v.132, n.4, p.471-482, 2002.
- MASUTTI, M.B.; PANITZ, C.M.N.; PEREIRA, N.C.** Biodisponibilidade e bioconcentração de metais-traço no manguezal do Itacorubi (Florianópolis, SC). *In: ESPINDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ROCHA, O.; CAMINO, M.B. Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. Rima, São Carlos, p.207- 219, 2002.
- MATTOS, J.J.; SÁNCHEZ, G.L.B.; CARVALHO, P.S.M.; BAINY, A.C.D.** Acuidade visual, estresse oxidativo e atividade da acetilcolinesterase em *Poecilia vivipara* expostas ao naftaleno. *In: 9o. Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*. São Pedro - SP, editora e gráfica Vida & Consciência, v. 1, p.151, 2006.
- MAYER, F.L.; VERSTEEG, D.J.; McKEE, M.J.; FOLMAR, L.C.; GRANNEY, R.L.; McCUME, D.C.; RATTNER, B.A.** Physiological and nonspecific biomarkers. *In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR., P.M., BERGMAN,*

- H.L. *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. SETAC, cap.1, p.5-85, 1992.
- MEDEIROS, P.M. & BÍCEGO, M.C.** Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers I. Santos, SP–Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v.49, p.761-769, 2004.
- McLOUGHLIN, N.; YIN, D.; MALTBY, L.; WOOD, R.M.; YU, H.** Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.19, n.8, p.2085–209, 2000.
- McLUSKY, D.S.; ELLIOTT, M.** *The estuarine ecosystem: ecology, threats, and management*, 3 ed., Oxford University Press, 2004, 214 p.
- MELANCON, M.J.; AISCHER, R.; BENSON, W.; KRZYNSKI, G.; LEE, R.F.; SIKKA, H.C.; SPIES, R.B.** Metabolic products as biomarkers. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR., P.M., BERGMAN, H.L. *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. SETAC, cap.2, p.87-123, 1992.
- MELO, G. A. S.** *Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro*. São Paulo, Plêiade, FAPESP, 1996, 604p.
- MENEZES, S.; SOARES, A.M.V.M.; GUILHERMINO, L.; PECK, M.R.** Can the Activities of Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferases of *Crangon crangon* (L.) be Used as Biomarkers of Fuel Oil Exposure?. *Water, Air and Soil Pollution*, v.208, p.317–322, 2010.
- MERSCH, J.; BEAUVAIS, M.-N.; NAGEL, P.** Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutation Research*, v.371, p.47–55, 1996.
- MEYER, J.S.** The utility if the terms “bioavailability” and “bioavailable fraction” for metals. *Marine Environmental Research*, v. 53, p. 417-423, 2002.
- MIRANDA, L.B.; CASTRO, B.M.; KJERFVE, B.** *Princípios de oceanografia física de estuários*, EDUSP, São Paulo, 2002, 414 p.
- MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; AMADO, L.L.; PINHO, G.L.L.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A.** Biomarcadores Bioquímicos. In: LANA, P.C.; BIANCHINI, A.; RIBEIRO, C.A.O.; NIENCHESKI, L.F.H.; FILLMANN, G.; SANTOS, C.S.G. *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros - diretrizes metodológicas*, Museu Nacional, Rio de Janeiro, cap. 5, p.127-131, 2006.
- MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.G.; PINHO, G.L.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A.** Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, v.146, p.221–234, 2007.
- MORALLES-CASSELLES, C.; MARTÍN-DÍAZ, M.L.; RIBA, I.; SARASQUETE, C.; DELVALLS, T.A.** Sublethal responses in caged organisms exposed to sediments affected by oil spills. *Chemosphere*, v.72, p.819–825, 2008.
- MORALLES-CASSELLES, C.; RIBA, I.; DELVALLS, T.A.** A weight of evidence approach for quality assessment of sediments impacted by an oil spill: The role of a set of biomarkers as a line of evidence. *Marine Environmental Research*, v.67, p.31–37, 2009.
- MOREIRA, L.B.** *Avaliação da toxicidade dos sedimentos e da macrofauna bentônica em áreas portuárias: Porto do Mucuripe e Terminal Portuário do Pecém (CE); e Porto de Santos (SP)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008, 130p.
- MOURA, N.F.O. & COELHO, P.A.** Maturidade sexual fisiológica em *Goniopsis cruentata* (Latreille) Crustacea, Brachyura, Grapsidae) no Estuário do Paripe, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.21, n.4, p.1011–1015, 2004
- MOZETO, A.A.; ZAGATTO, P.A.** Introdução de agentes químicos no ambiente. In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*, RiMa, São Carlos, cap. 2, p.15-38, 2006.
- NACCI, D.E.; CAYULA, S.; JACKIM, E.** Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology*, v.35, p.197-210, 1996.
- NASCIMENTO, I. A.; LEITE, M. B. N. L.; MARTINS, L.K.P.** Uso de biomarcadores para diagnósticos ambiental: proteínas de estresse e integridade da membrana lisossômica. In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M. & Nipper, M.G. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*, Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, cap.18, p. 207-216, 2002.
- NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L.** Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: Zagatto, P. A & Bertoletti, E. (Eds.). (Org.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. 1 Ed. São Paulo: Rima, 1, cap. 17, p.413-432, 2006.

- NIGRO, M.;** FALLENI, A.; DEL BARGA, I.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FREN- ZILLI, G. 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquat. Toxicol.* v.77, p.339–347, 2006.
- NILIN, J.,** CASTRO, C.B., PIMENTEL, M.P., FRANKLIN JÚNIOR, W., MATOS, R.F.G., LOTUFO, T.M.C., COSTA-LOTUFO, L.V. Water toxicity assessment of the Ceará river estuary (Brazil). *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.2, n.2, p.107-113, 2007.
- NILIN, J.** *Avaliação da Qualidade do Estuário do Rio Ceará.* Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008, 107p.
- NIPPER, M.G.** The development and application of sediment toxicity tests for regulatory purposes. In Wells, P.G.; Lee, K.; Blaise, C. *Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques and practice*, CRC Press, Flórida, v. 43, p. 631-646, 1997.
- NIPPER, M.G.;** GREENSTEIN, D.J.; BAY, S.M. Short- and long-term sediment toxicity test methods with the amphipod *grandidierella japonica*. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 8, p. 1191-1200, 1989.
- OLIVEIRA, U.O.;** ARAÚJO, A.S.R.; BELLO–KLEINB, A.; SILVA, R.S.M.; KUCHARSKI, L.C. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, v.140, p.51–57, 2005.
- O'NEILL, A.J.;** GALLOWAY, T.S.; BROWNE, M.A.; DISSANAYAKE, A.; DEPLEDGE, M.H. Evaluation of toxicity in tributaries of the Mersey estuary using the isopod *Asellus aquaticus* (L.). *Marine Environmental Research*, v.58, p.327–331, 2004.
- PELLACANI, C.;** BUSCHINI, A.; FURLINI, M.; POLI, P.; ROSSI, C. A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquatic Toxicology*, v.77 p.1–10, 2006.
- PEREIRA, C.D.S.;** ABESSA, D.M.S.; BAINY, A.C.D.; ZARONI, L.P.; GASPARRO, M.R.; BÍCEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; FURLEY, T.H.; SOUSA, E.C.P.M. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.26, n.3, p.462–469, 2007.
- PLAA, G.L.** Present status: toxic substances in the environment. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 60, n. 7, p. 1010-1016, 1982.
- PRÓSPERI, V.A.** *Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos.* Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002, 118p.
- PRÓSPERI, V.A. & ARAÚJO, M.M.S.** Teste de toxicidade crônica com *Lytechinus variegatus*, Lamark 1816, e *Echinometra lucunter*, Linnaeus 1758 (Echinodermata: Echinoidea). In: NASCIMENTO, I.A.; SOUSA, E.C.P.M. & NIPPER, M.G. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*, Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, cap.9, p. 99-110, 2002.
- PROSPERI & NASCIMENTO,** In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*, RiMa, São Carlos, cap. , p., 2006.
- QUEIROZ, A.B.J.** *Análise ambiental do estado de conservação do baixo curso do Rio Pacoti – Ceará.* Dissertação de Mestrado, PRODEMA, Pós Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Ceará, 2005, 117p.
- QUINTANEIRO, C.;** MONTEIRO, M.; PASTORINHO, R.; SOARES, A.M.V.M.; NOGUEIRA, A.J.A.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Environmental pollution and natural populations: A biomarkers case study from the Iberian Atlantic coast. *Marine Pollution Bulletin*, v.52, p.1406–1413, 2006.
- RAND, G.M.;** WELLS, P.G.; McCARTY, L.S. Introduction to Aquatic Toxicology. In: RAND, G.M. *Fundamentals of Aquatic Ecotoxicology*, Taylor & Francis, Flórida, cap.1, p.3-67, 1995.
- RANK, J.;** LEHTONEN, K.K.; STRAND, J.; LAURSEN, M. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology*, v.84, p.50–61, 2007.
- SÁ, S.M.G.;** W.C. VALENTI, F.P. ZANOTTO. Dietary copper absorption and excretion in three semi-terrestrial grapsoid crabs with different levels of terrestrial adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v.148 p.112–116, 2008.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.;** MESQUITA, H.S.L.; CINTRÓN-MOLERO, G. The Cananéia Lagoon Estuarine System, São Paulo, Brazil. *Estuaries*, v.13, n. 2, p.193-203, 1990.

- SKAGGS, H.S & HENRY, R.P.** Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v.133, p.605–612, 2002.
- SEMACE** - Superintendência Estadual do Meio Ambiente. *Cadastro de atores e usuários dos recursos naturais no setor leste da zona costeira do Estado do Ceará*. SEMACE, PNMA, Fortaleza, Ceará, 2003, 138p.
- SEMACE** - Superintendência Estadual do Meio Ambiente. *Unidades de conservação litoral leste do Estado do Ceará*. SEMACE, PNMAII, Fortaleza, Ceará, 2004, 101p.
- SEMACE** - Superintendência Estadual do Meio Ambiente. *Plano de manejo do estuário do Rio Ceará*. SEMACE/FCPC nº 1358, Fortaleza, Ceará, 2005, 355p.
- SEMACE** - Superintendência Estadual do Meio Ambiente. Disponível em: < <http://www.semace.ce.gov.br> >. Acesso em: 10 de Fevereiro, 2010.
- SILVA, Z.S.** *Estratégia reprodutiva do caranguejo Goniopsis cruentata (Latreille, 1803) (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) no Manguezal de Itacuruçá, Baía de Sepetiba, RJ, Brasil*. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L.** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, New York, v.175, n.1, p.184-191, 1988.
- SIU, W.H.L.; CAO, J.; JACK, R.W.; WU, R.S.S.; RICHARDSON, B.J.; XU, L.; LAM, P.K.S.** Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquat.Toxicol.* v.66, p.381–392, 2004.
- SOUZA, L. P.** *Maturidade sexual e relações morfológicas do caranguejo Goniopsis cruentata (Latreille, 1803) (Crustacea: Brachyura: Grapsidae) do estuário do Rio Jaguaribe (Aracati – Ceará)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008, 106.
- SOUZA, L.P. & SILVA, R.F.** Morphology of the female reproductive system of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata* Latreille, 1803). *Scientia Marina*, v.73, n.3, p.527-539, 2009.
- TOGNI, V.G.** *Efeito da salinidade sobre a resposta do sistema antioxidante e expressão de hsp70 em siris (gênero Callinectes)*. Tese de Doutorado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2007, 66p.
- TORRES, R.F.** *Disponibilidade dos metais cobre e chumbo em um canal de maré receptor de efluentes de carcinicultura*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009, 134p.
- TSANGARIS, C.; PAPATHANASIOU, E.; COTOU, E.** Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.66, p.232–243, 2007.
- UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.** Genotoxicidade Ambiental. In: Zagatto, P. A & Bertoletti, E. (Eds.). (Org.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. 1 Ed. São Paulo: Rima, cap. 14, p.327-346, 2006.
- USEPA** – United States Environmental Protection Agency. *Guidelines for Ecological Risk Assessment*. Relatório Técnico, U.S.EPA/630/R-95/002F, Registro Federal 63(93):26846-26924, Maio de 1998, 188p.
- USEPA** – United States Environmental Protection Agency. *Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses: technical manual*. EPA 823-B-01-002, Outubro de 2001, 208p.
- USEPA** – United States Environmental Protection Agency. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*. Relatório Técnico, 3rd. Ed, U.S. EPA-821-R-02-014, Outubro de 2002, 486p.
- VAISMAN, A.G.; MARINS, R.V.; LACERDA, L.D.** Characterization of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, as a biomonitor for mercury in tropical estuarine systems, northeast Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.74, n.3, p.582- 588, 2005.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.13, p.57-149, 2003.
- OOSTEROM, J.V.; KING, S.C.; NEGRI, A.; CRAIG HUMPHREY, C.; MONDON, J.** Investigation of the mud crab (*Scylla serrata*) as a potential bio-monitoring species for tropical coastal marine environments of Australia. *Marine Pollution Bulletin*, v.60, p.283–290, 2010.
- VASQUEZ, M.Z.** Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis*, Mutagenesis Advance Access, p.1–13, 2009.
- VAISMAN, A.G.; MARINS, R.V.; LACERDA, L.D.** Characterization of the Mangrove Oyster, *Crassostrea rhizophorae*, as a Biomonitor for Mercury in Tropical Estuarine Systems, Northeast Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.74, p.582–588, 2005.

- VIARENGO, A.;** LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.146, p.281–300, 2007.
- VIDAL-LIÑÁN, L.;** BELLAS, J.; CAMPILLO, J.A.; BEIRAS, R. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis* for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere*, v.78, p.265–272, 2010.
- VIEIRA, L.R.;** GRAVATO, C.; SOARES, A.M.V.M.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*, v.76, p.1416–1427, 2009.
- VILLELA, I.V.;** OLIVEIRA, I.M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J.A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research*, v.605, p.78–86, 2006.
- VILLELA, I.V.;** OLIVEIRA, I.M.; SILVEIRA, J.C.; DIAS, J.F.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Gua'íba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research*, v.628, p.76–86, 2007.
- WENTWORTH, C.K.** A scale of grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology*, v. 30, p.377-392, 1922.
- WILKENS, J.L. & YOUNG, R.E.** Regulation of pulmonary blood flow and of blood pressure in a mangrove crab (goniopsis cruentata). *Journal of Exploratory Biology*, v.163, p.297-316, 1992.
- WINSTON, G.W.;** MOORE, M.N.; STRAATSBURG, I.; KIRCHIN, M. Lysosomal stability in *Mytilus edulis* L.: potential as a biomarker of oxidative stress related to environmental contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.21, p.401–408, 1991.
- WOO, S.;** Kim,S.; Yum, S.; Yim, U.H.; Lee, T.K. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, v.52, p.1768–1775, 2006.
- WRIGHT, D.A. & WELBOURN, P.** *Environmental toxicology*. Cambridge Environmental Series, n.11, Cambridge University Press, 2002, 657p.
- ZANETTE, J.;** MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three brazilian estuaries. *Comparative biochemistry and physiology - Part C*, v.143, p.187–195, 2006.
- ZAR, J.H.** *Biostatistical analysis*, 3rd ed. Nova Jersey, Prentice-Hall, 1996, 662p.
- ZEE** - Zoneamento Ecológico-Econômico. *Identificação de Metais nos sedimentos dos estuários do Estado do Ceará*. SEMACE/LABOMAR, Fortaleza – CE, 2005, 18p.
- ZHOU, J.;** WANG, W.; WANG, A.; HE, W.; ZHOU, Q.; LIU, Y.; XU, J. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 150, p. 224-230, 2009.