

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS EXPERIMENTAL DO LITORAL PAULISTA
UNIDADE DO LITORAL PAULISTA**

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO GENOTÓXICO EM
Ucides cordatus (LINNAEUS, 1763) (CRUSTACEA, BRACHYURA,
OCYPODIDAE) EM DOISMANGUEZAIS DO SUDESTE BRASILEIRO**

Tomás Roman de Toledo

**São Vicente - SP
2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
EXPERIMENTAL DO LITORAL PAULISTA
UNIDADE DO LITORAL PAULISTA**

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO GENOTÓXICO EM
Ucides cordatus (LINNAEUS, 1763) (CRUSTACEA, BRACHYURA,
OCYPODIDAE) EM DOIS MANGUEZAIS DO SUDESTE BRASILEIRO**

Tomás Roman de Toledo

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Antonio Amaro Pinheiro

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Campus Experimental do
Litoral Paulista - UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas,
modalidade Gerenciamento Costeiro.

São Vicente - SP

2007

Toledo, Tomás Roman de

Avaliação do impacto genotóxico em *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) em dois manguezais do Sudeste brasileiro / Tomás Roman de Toledo – São Vicente, 2007
28 p.

Trabalho de conclusão (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres

Supervisor: Prof. Dr. Marcelo Antonio Amaro Pinheiro

1. Ecotoxicologia 2. Manguezais - Brasil 3. Caranguejo uçá

CDD 574.5222

Palavras-chaves: genotoxicidade, impacto ambiental, micronúcleo

Dedico este trabalho a uma pessoa muito especial em minha vida, que estamos construindo juntos o nosso futuro com muito amor, apoio, paciência e colaboração. Gi muito obrigado pela força! Esse trabalho é nosso...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois é Ele quem nos dá toda força necessária para realização do nosso trabalho, e nele eu me inspiro e confio.

Existem pessoas que foram muito importantes que contribuíram para o desenvolvimento desse projeto, embora seja injusto da minha parte ordenar as mesmas. Nenhuma pessoa foi mais importante do que outra, cada uma teve sua colaboração fundamental, que sem ela o desenvolvimento desse projeto ficaria prejudicado.

Agradeço ao meu Professor Rodrigo Torres (Orientador), pois foi ele quem me treinou para analisar e interpretar as lâminas utilizadas no projeto, e também deu todo apoio que precisei quanto a algumas informações adicionais. Ao professor Marcelo Pinheiro (Co-orientador), pela obtenção de minha bolsa de iniciação científica com a FAPESP (Proc. no. 2006/05976-2) e por me agüentar as inúmeras vezes que o procurei para a correção de relatórios, sempre me dando muita força e incentivo em produzir cada vez mais. Aprendi muito com vocês professores, podem ter certeza que fui muito bem orientado e foi de imensa importância na minha formação acadêmica.

Ao Professor Denis que me amparou quando precisei sobre algumas informações específicas em assuntos relacionados ao projeto. E ao Professor Marcos Oliveira, juntamente com o Prof. Denis, que de última hora, eu precisei contar com eles e eles me atenderam com muita atenção para contribuição dos mesmos no fechamento desse Trabalho de Conclusão de Curso.

Uma pessoa que sempre me atendeu muito bem e sempre que precisei dela eu tive um retorno gratificante. Ela poderia estar fazendo o que fosse que pararia e me daria toda atenção, a Conceição (da biblioteca), que eu não sei o que teria sido do meu trabalho sem o auxílio dela.

Ao pessoal do Laboratório Crusta, que quando precisei sempre me deram muita atenção e procuravam sempre atender aos meus questionamentos sobre instrumentos necessários e outras informações. Ainda no Crusta, uma pessoa que eu tenho orgulho de

ter trabalhado e essa pessoa teve colaboração fundamental não somente ao meu, como a maioria dos projetos realizados aqui no Crusta, e também como companheiro nas viradas de noite que passávamos fazendo relatórios e trabalhos: meus sinceros agradecimentos ao Alison. Esse é um cara que é indispensável em qualquer equipe.

Aos meus companheiros de República (Alison e Raphael), que sempre me apoiaram e torceram muito comigo quando muitas coisas deram certo no meu projeto. E também à minha amiga Aline Freire Teixeira, uma ótima pessoa que também tenho certeza de que torceu muito por mim.

À FAPESP, que concedeu a Bolsa de Iniciação Científica a esse projeto, e sem dúvidas essa bolsa foi de grande auxílio para me manter motivado e em condições de realizar o projeto.

Para finalizar os meus agradecimentos, como mencionei no início, não está em último por ter menos importância, pelo contrário, o fechamento é sempre a melhor parte do trabalho. Eu gostaria de agradecer a toda minha família que sempre me apoiou e me deu condições de permanência em São Vicente e de estudar. Pessoas que pude discutir sobre meu projeto e sempre me questionando e me sugerindo idéias que foram de contribuição excepcional ao meu trabalho. Pessoas que sempre acreditaram no meu trabalho: minha mãe (Sandra) e meu pai (Luiz Fernando) sempre me apoiando e me fornecendo a base para tudo que desenvolvi nesse projeto, minha sobrinha (Mayra), Cida e Maurício, minha sogra (Ana Lúcia), minhas cunhadas (Camila e Paulana), namorado da minha cunhada (Gustavo), e minha namorada que segurou todos os problemas ao meu lado (Gisele).

“Se as cidades forem destruídas e os campos conservados, as cidades ressurgirão, mas se queimarem os campos e conservarem as cidades, estas não sobreviverão” (Benjamim Franklín, 1706-1790).

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 2. MATERIAIS & MÉTODOS | 8 |
| 3. RESULTADOS | 13 |
| 4. DISCUSSÃO | 16 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 22 |

RESUMO

O presente estudo visou avaliar a freqüência de células micronucleadas em caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), em dois manguezais da Região Sudeste do Brasil, tendo em vista que o *Ucides cordatus* é uma espécie incluída como sobrexplotada na INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 21 DE MAIO DE 2004 (Ministério do Meio Ambiente) e que grande parte das comunidades presentes nas áreas estudadas sobrevive se alimentando, ou da atividade econômica desses caranguejos. Tal estudo objetiva contribuir ao manejo “in situ” das populações desta espécie, orientando condutas sobre sua conservação e do ambiente que ocupa. Os exemplares foram coletados em fevereiro (10 exemplares coletados na Estação Ecológica Juréia Itatins) e em maio (10 exemplares coletados no Município de Cubatão) de 2007. Após a coleta, foram preparadas três lâminas da hemolinfa de cada exemplar por esfregaço, que após coradas com Giemsa, foram examinadas por contagem 3.000 células/animal, sob aumento de 1000X. A quantidade de micronúcleos encontrados em cada lâmina foi anotada e os resultados empregados em análises estatísticas, utilizando o teste T, para confronto de duas regiões de coleta (Juréia e Cubatão), sendo a primeira aparentemente livre de impacto e a segunda sujeita a contaminantes. Os animais coletados em Cubatão apresentaram média de 5 células micronucleadas/1.000 analisadas (2,3 a 8,7 células micronucleadas/1.000), sendo 2,5 vezes superior a média obtida para a Juréia, que foi 2 células micronucleadas/1.000 analisadas (0,3 a 3,7 micronúcleos/1.000 células). Os dados obtidos corroboram outros estudos “in situ”, que relatam como variação normal até quatro células micronucleadas/1.000 em espécies animais. Os resultados encontrados sugerem que o caranguejo-uçá possa ser utilizado como uma ferramenta para verificar os impactos ambientais existentes na região em estudo.

Palavras-chaves: genotoxicidade, impacto ambiental, micronúcleo.

ABSTRACT

This study aimed to assess the frequency of cells micronucleated in “caranguejo-uçá” *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), in two wetlands of Southeast Region of Brazil, in order that the *Ucides cordatus* is a species listed as subexploited in INSTRUCTION NORMATIVA Paragraph 5, OF 21 MAY 2004 (Ministry of Environment), and that many of the communities present in the areas studied survives is feeding, or the economic activity of these crabs. This study aims to contribute to the management "in situ" of the populations of this species, targeting pipelines on their conservation and the environment it occupies. They were collected in February (10 specimens collected in Ecological Station Juréia Itatins) and in May (10 specimens collected in the municipality of Cubatão). After collection, were prepared triple blade of hemolymph of each specimen by swabs, which after stained with Giemsa, were examined by counting 3,000 cells / animal, a increase of 1000X. The amount of micronucleus found on each blade was annotated and results employed in statistical analysis, using the T test for comparison of two regions of collection (Juréia and Cubatão), and the first apparently free of impact and the second subject to contaminants. The animals collected in Cubatão showed average of 5 cells micronucleated/1.000 analyzed (2.3 to 8.7 cells micronucleated/1.000), and 2.5 times higher than the average obtained for the Juréia, who was 2 cells micronucleated/1.000 analyzed (0.3 to 3.7 micronucleus/1.000 cells). The data corroborate other studies "in situ", which reported as normal variation up to four cells micronucleated/1.000 in animal species. The results suggest that found the “caranguejo-uçá” can be used as a tool to check the environmental impacts existing in the region under study.

Keywords: environmental impact, genotoxicity, micronucleus.

1. INTRODUÇÃO

Durante os anos 80, grande parte da Juréia foi escolhida pela NUCLEBRÁS para implantar duas usinas nucleares - Iguape 4 e Iguape 5 - propiciando proteção às áreas naturais e tampão ao entorno das usinas. Neste contexto, foi criada em 1980 a Estação Ecológica da Juréia, com 23.600 hectares, ficando proibido o acesso de qualquer cidadão que não fosse pesquisador ou cientista. Por outro lado, tal estação ecológica ficava salvaguardada da especulação imobiliária que se originou na década de 70. (MARQUES & DULEBA, 2004).

Por desistência do governo federal, o programa nuclear não foi concretizado e, em 1985 a NUCLEBRÁS retirou-se do local, o que tornou a área susceptível a riscos de degradação. A imensa preocupação quanto ao destino da Juréia levou ambientalistas, cientistas, políticos e organizações não governamentais a reivindicarem providências contra agressões a este paraíso natural. Assim, através do Decreto Estadual nº 24.646, de 20 de fevereiro de 1986, foi criada a Unidade de Conservação - Estação Ecológica de Juréia-Itatins, regulamentada pela Lei nº 5.649, de 28 de abril de 1987, englobando também a Serra dos Itatins, totalizando quase 80.000 hectares (MARQUES & DULEBA, 2004).

Desde então, a Estação Ecológica de Juréia-Itatins é administrada pelo Instituto Florestal (IF), pertencente à Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SEMA).

As Unidades de Conservação (UC) têm sido a melhor forma de proteção da biodiversidade (BRUNER *et al.*, 2001) visto que são áreas geográficas destinadas à preservação dos ecossistemas naturais. Entretanto, com a atual taxa de crescimento populacional humano e a redução dos habitats naturais, tais unidades estão se tornando os únicos locais de sobrevivência da maior parte da biota intolerante à ação humana (KRAMER *et al.*, 1997). Longe da realidade de uma Unidade de Conservação, o Município de Cubatão enfrenta o problema constante da poluição, por seu imponente parque industrial com 84

indústrias, sendo 30 delas consideradas poluidoras pela CETESB (SMA, 1999). Também foram identificadas e caracterizadas as fontes potenciais de poluição existentes na região, incluindo terminais portuários, lixões, aterros sanitários, áreas contaminadas pela disposição inadequada de resíduos tóxicos, estações de tratamento de águas e esgotos, contribuições difusas e lançamentos in natura de esgotos em canais, rios e mar (LAMPARELLI *et al.*, 2001).

Os rios e a região estuarina de Cubatão têm sido utilizados para a pesca profissional e recreativa. SANTOS FILHO *et al.* (1991) observaram que 46,1% das famílias de seis bairros de Cubatão consumiam peixes e/ou outros organismos obtidos na própria região, sendo o maior percentual observado na Vila dos Pescadores (61,7%), que possuía na época cerca de 5.000 habitantes. Cerca de 42% das famílias entrevistadas consideraram a pesca oriunda dos rios de Cubatão imprópria para consumo humano, com 54% afirmando que o consumo de peixes da região poderia causar problemas à saúde. Tais autores também mencionaram que *“...o consumo de peixes e outros organismos dos rios de Cubatão varia na relação inversa ao consumo de outras proteínas de origem animal, o que sugere que os produtos dos rios representam fonte alternativa de proteína animal para as famílias de menor nível sócio-econômico”*.

Apesar do grande esforço para o controle da poluição e melhoria da qualidade ambiental, um levantamento da contaminação nos rios Cubatão, Perequê, Piaçaguera e Casqueiro, realizado em 1988, após a tentativa de implantação de um programa de controle da poluição, concluiu que a região permanecia impactada por concentrações elevadas de metais pesados e compostos organoclorados na água, nos sedimentos e nos organismos aquáticos (peixes, siris e caranguejos) (CETESB, 1990; EYSINK *et al.*, 1991; VARGAS-BOLDRINI *et al.*, 1991). Este trabalho realizou um levantamento sistemático sobre a contaminação ambiental na região da Baixada Santista e, indicou, ainda, os riscos de acumulação dos contaminantes nos organismos que estariam retornando ao ambiente em recuperação, expondo a população ribeirinha ao consumo de pescados comprometidos pela poluição.

Segundo GUTBERLET (1996), a pescaria no Rio Cubatão e nos manguezais era evitada pela população local, pois a maioria dos peixes apresentava a pele manchada, era cega e possuía gosto intragável. Além dos peixes, os siris, caranguejos e mexilhões presentes nos manguezais da região também representam uma atividade econômica importante para a população de menor poder aquisitivo.

Por décadas, a Floresta Atlântica tem sido afetada por poluentes emitidos pelo Complexo Industrial de Cubatão, cujo impacto ainda é evidente sob a vegetação local (DOMINGOS *et al.*, 1998). Segundo LIMA (2000), os poluentes podem provocar estímulos e respostas nos organismos vivos, sendo capazes de indicar o efeito de fatores ambientais, sejam eles naturais ou antrópicos.

Em ambientes aquáticos o lançamento de efluentes contendo substâncias tóxicas pode alterar a qualidade de água e do sedimento, como também alterar a composição das populações. Os sedimentos, a água e a biota de ambientes aquáticos atuam como fonte e depósito de materiais orgânicos e inorgânicos (BURTON & MACPHERSON, 1995; BURTON *et al.*, 2001). Esses ambientes apresentam fundamental importância nos ciclos biogeoquímicos e na base da rede alimentar de vários organismos. A contaminação da cadeia alimentar pode causar efeitos prejudiciais ao ecossistema, sendo alguns mais evidentes e outros discretos ou ainda desconhecidos. A contaminação do sedimento pode ter efeitos indesejados não apenas nos organismos bentônicos, mas em outros elementos da cadeia trófica, uma vez que o sedimento fornece habitat, alimento e locais de reprodução para determinados organismos (BAUDO *et al.*, 1999). Essa contaminação pode ocorrer pela presença de metais pesados na água, nos sedimentos e até mesmo nos organismos, por meio de vários processos físico-químicos e biológicos. Trata-se de metais provenientes de fontes antropogênicas, como despejos industriais, lixo doméstico e emissões atmosféricas (AMADO *et al.*, 1994).

Os macroinvertebrados bentônicos sésseis são extremamente eficientes em refletir o estado de conservação ou degradação de um ecossistema

(ESTEVES, 1988). Vários fatores abióticos são considerados importantes na estrutura da comunidade de macroinvertebrados de rios, vindo a influenciar sua distribuição espacial e temporal (FELDMAN & CONNOR, 1992). A análise das variáveis físicas e químicas, em uma amostragem específica, pode ser suficiente para evidenciar o tipo de *stress* ao qual a comunidade está sujeita, embora não seja tão eficiente na quantificação do impacto de uma substância química no meio aquático. Os métodos biológicos, por sua vez, possuem a vantagem de não refletir apenas uma situação momentânea, mas a história de um determinado ambiente (MARVAN, 1979).

A biota residente nos corpos de água acaba sendo um monitor natural da qualidade ambiental (MISERENDINO & PIZZOLÓN, 2001), por isto os invertebrados aquáticos são ferramentas amplamente utilizadas em estudos de qualidade de água, biomonitoramento (JUNQUEIRA *et al.*, 2000) e integridade ambiental.

Biomonitoramento é definido como o uso sistemático de respostas biológicas para avaliar as mudanças do ambiente, sejam elas causadas naturalmente ou por interferência humana (BUSS *et al.*, 2003). Atualmente uma das metodologias utilizadas para avaliar danos causados por substâncias genotóxicas nos organismos é o teste do micronúcleo. Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de avaliar alterações cromossômicas estruturais ou numéricas em algum momento do ciclo de vida das células (CARRANO & NATARAJAN, 1988).

Nesse sentido, a primeira tentativa de usar a avaliação por micronúcleos como indicadora de deficiências citogenéticas foi efetuada por EVANS *et al.* (1959) *apud* BURGEOT *et al.* (1995).

Os micronúcleos são pequenas massas nucleares delimitadas por membrana, e separadas do núcleo principal. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros não incluídos no núcleo principal, ocorrendo por danos ao DNA, que podem ser causados por

exposição a poluentes que atuam como agentes mutagênicos (STOPPER & MÜLLER, 1997).

A determinação do efeito genotóxico dos poluentes no ambiente marinho transformou-se numa ferramenta essencial para a proteção deste ecossistema. Estudos *in vitro*, que avaliam o efeito mutagênico de efluentes, têm mostrado o valor do ensaio micronúcleo como um potente marcador genotóxico em mamíferos (SHIMADA *et al.*, 1992), anfíbios (JAYLET *et al.*, 1986), peixes de água doce (WILLIAMS & METCALFE, 1992), peixes marinhos (CARRASCO *et al.*, 1990) e em invertebrados (SCARPATO *et al.*, 1990; WRISBERG *et al.*, 1992; BRUNETTI *et al.*, 1988). No caso dos invertebrados, os estudos genotóxicos baseados em ensaio micronúcleo têm sido considerados uma ferramenta extremamente sensível na estimativa de danos genéticos em espécies dos gêneros *Mytilus* e *Balanus*, segundo BARSIGLI (2002) e NIGRO *et al.* (2006), respectivamente, e crustáceos braquiúros como *Ucides cordatus*, conforme NUDI (2005). Além disso, a análise de micronúcleos se apresenta como uma ferramenta que possibilita contribuir ao monitoramento ambiental, bem como a diagnose de áreas e ações de ordenamento para minimização da toxicidade em determinado ambiente.

O presente projeto teve como objetivo analisar a integridade genética de duas populações do caranguejo-uçá por inspeção de células micronucleadas, visando a diagnose do impacto genotóxico em duas áreas de manguezais do sudeste brasileiro (Juréia e Cubatão). Bem como, cada área estudada foi caracterizada quanto aos metais pesados existentes no sedimento e na água, evidenciando sua condição ambiental.

2. MATERIAL & MÉTODOS

A primeira coleta do projeto foi realizada no dia 05/02/2007, no manguezal situado junto ao Rio Verde, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins (24°25' S e 47°15' W) (Fig. 1), em Iguape. Uma Unidade de Conservação, possuindo ampla diversidade de ecossistemas, como Mata Atlântica (Floresta Tropical Pluvial de Encosta e de Planície, Manguezal, Restinga), Praia Arenosa e Costão Rochoso.

A segunda coleta foi realizada no dia 20/05/2007, no Município de Cubatão, no manguezal localizado junto do Canal de Piaçaguera, próximo à COSIPA (23°53' S e 46°22' W), na margem direita (Fig. 2). O município de Cubatão abrange uma área de 148 km². Originalmente, possuía 91 km² recobertos por Mata Atlântica, 24 km² por matas de restingas e 29 km² por manguezais, sendo o restante formado por corpos d'água. No decurso de sua ocupação, o município teve gradativamente descaracterizada grande parte de sua cobertura vegetal. Tal processo iniciou-se com as atividades agrícolas e extrativistas no começo da ocupação, avançando de forma mais acentuada nas últimas quatro décadas, com o desenvolvimento urbano, culminando com a instalação do pólo industrial. Restam atualmente apenas 10 km² de vegetação nativa em bom estado de preservação.

Em cada local, foram coletados 10 animais da espécie (compreendendo exemplares do sexo masculino, em estágio de intermuda, com tamanho de carapaça superior ao mínimo estabelecido na Portaria do IBAMA nº 52/2003, que é de 60mm) pelo método de braceamento (PINHEIRO & FISCARELLI, 2001) (Fig. 3). Os animais foram armazenados e transportados em caixa com gelo picado, promovendo a desaceleração do metabolismo, impedindo a ação do stress na formação de micronúcleos.

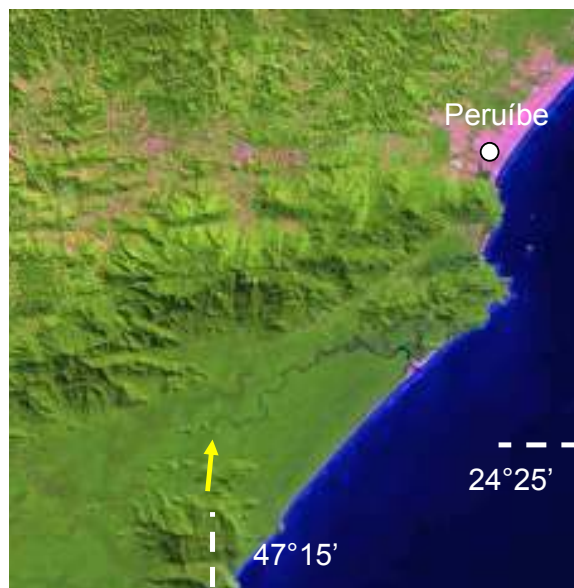


Figura 1. Imagem de Satélite com indicação da área de coleta (seta amarela) dos exemplares de *U. cordatus* na Estação Ecológica Juréia-Itatins. Fonte: Embrapa – link: <http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br>



Figura 2. Imagem de Satélite com indicação da área de coleta dos exemplares de *U. cordatus* no Município de Cubatão. Fonte: Google Maps™ link: <http://www.googlemaps.com>



Figura 3. Catador de caranguejo coletando animais por braceamento.

Coleta e Análise de Água e Sedimento

Foram coletadas, por imersão diretamente no corpo d'água, quatro amostras de água de 25 mL, sendo a primeira colhida no estuário e as três demais no interior de galerias da espécie, distando a 10, 20 e 30m da margem. As amostras foram armazenadas em frascos plásticos separadamente, e transportadas em isopor até o laboratório.

O sedimento foi coletado em três locais pré-estabelecidos (distanciando 5m de um ponto a outro), com obtenção de quatro amostras, sendo uma superficial, e as outras três em profundidades distintas (15, 30 e 45cm). As amostras de sedimento foram coletadas manualmente, sendo armazenado, aproximadamente, 500g de sedimento em frascos de polietileno com boca de diâmetro largo e tampa, com capacidade para 500g por amostra. As mesmas foram rotuladas (indicando o ponto de coleta), transportadas em isopor com gelo até o laboratório, e armazenadas sob refrigeração a 4 °C até o momento da análise.

As amostras de água e sedimento foram descontaminadas através de HNO₃ a 10% e Extran[®] ácido a 10% em água deionizada, e analisadas para a presença de alguns metais (Cobre, Cádmiio, Cromo, Chumbo e Mercúrio) pelos

laboratórios do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), do IB/UNESP de Botucatu, utilizando para preparo da amostra a mineralização por via úmida com ácido nítrico (HNO₃) 65% (BASSET *et al.*, 1981) em forno de microondas (Provecto – DGT – 100 plus) por meio de um programa específico para solo/sedimento, fornecido pelo fabricante do microondas (PROVECTO). A identificação foi realizada pelo método de Espectrofotometria por Absorção Atômica (GBC- 932 AA) (ATHANASOPOULOS, 1994).

Análises de Genotoxicidade – Ensaio da Frequência de Micronúcleos

Coleta da Hemolinfa

Para minimizar possíveis erros na técnica foi utilizado material descartável. No caso das lâminas, estas foram lavadas, secas em estufa (60°C por 15 minutos), e guardadas em uma caixa especial para seu armazenamento.

Em laboratório, uma amostra de 1mL da hemolinfa de cada animal foi coletada com seringa de 1mL munida com agulha de 21 gauge (0,8 x 40mm) tomadas na junta de articulação de um dos apêndices locomotores. Foram transferidas para tubos siliconizados de microcentrífuga, e em seguida alíquotas de 50µL foram espalhadas cuidadosamente sobre cada lâmina com uso de sua ponteira.

Foram utilizadas 30 lâminas, tanto na primeira fase (Estação Ecológica de Juréia-Itatins) quanto na segunda (Município de Cubatão), correspondendo a três esfregaços de hemolinfa/espécime.

Coloração e Análise das Lâminas

O esfregaço de hemolinfa em cada lâmina foi efetuado espalhando-se o material em camada fina e homogênea (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA 1983). Após este procedimento, as lâminas foram secas a temperatura ambiente (20 a 30 min.), visando a adesão das células. A fixação das lâminas foi efetuada por mergulho das mesmas em Metanol Absoluto (6 a 8 min.).

Em seguida, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e coradas com Giemsa, numa diluição de 2,5mL em 15mL de Na_2HPO_4 e 15mL de KH_2PO_4 por 20 a 30 minutos, o que ocorreu no mesmo dia em que foram analisadas, evitando a deterioração celular.

Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água deionizada para remoção do excesso de corante, e secas em temperatura ambiente para posterior análise.

A análise das lâminas, com identificação e contagem das células micronucleadas, ocorreu sob microscópio óptico comum (aumento de 1000x) integrado a um sistema de análise de imagens por computador, utilizando o Software KS-300 Carl Zeiss®. Foram observadas 3.000 células/animal, sendo 1.000/lâmina, identificando-se a frequência de células micronucleadas por animal, a média e o desvio padrão para o grupo amostral analisado. Sendo que as duas populações foram submetidas ao teste T para análises estatísticas.

3. RESULTADOS

O grupo amostral coletado no Estuário do Rio Verde (Estação Ecológica de Juréia-Itatins) apresentou freqüência de células micronucleadas variando de 0,03 a 0,33%, com média de $0,20 \pm 0,11\%$. Já entre os animais provenientes do Canal de Piaçaguera (Cubatão), o grupo amostral coletado apresentou freqüência de células micronucleadas variando de 0,23 a 0,87%, com média de $0,52 \pm 0,18\%$ (Tabela I).

Tabela I. Análise de genotoxicidade de *U. cordatus* (n=10), coletados na Estação Ecológica Juréia-Itatins e no Município de Cubatão (n= número de animais analisados; FMn= freqüência de células micronucleadas em um total de 3.000 células analisadas por exemplar).

| Exemplar | Juréia | | Cubatão | |
|--------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | Mn analisados | FMn (%) | Mn analisados | FMn(%) |
| 1 | 8 | 0,27 | 7 | 0,23 |
| 2 | 11 | 0,37 | 12 | 0,40 |
| 3 | 6 | 0,20 | 13 | 0,43 |
| 4 | 10 | 0,33 | 15 | 0,50 |
| 5 | 3 | 0,10 | 12 | 0,40 |
| 6 | 1 | 0,03 | 19 | 0,63 |
| 7 | 4 | 0,13 | 26 | 0,87 |
| 8 | 4 | 0,13 | 18 | 0,60 |
| 9 | 6 | 0,20 | 14 | 0,47 |
| 10 | 6 | 0,20 | 20 | 0,67 |
| Total | 59 | 0,20 | 156 | 0,52 |

As amostras de sedimento na região da Juréia foram analisadas quanto a concentração de metais pesados, conforme apresentado na Tabela II.

Tabela II. Quantificação dos metais pesados nas amostras de sedimento coletadas na Estação Ecológica de Juréia-Itatins (EEJI) e no Município de Cubatão (Cubatão), relativa aos valores médios e de desvio padrão ($\mu\text{g/g}$).

| Local | Amostras | Cobre | Cádmio | Crômo | Chumbo | Mercúrio |
|---------|------------|-----------|-------------|-----------|-----------|----------|
| EEJI | Superfície | 1,92±0,21 | 0,053±0,005 | 3,17±0,30 | 4,56±0,24 | < 0,001 |
| | 15 cm | 1,30±0,29 | 0,046±0,005 | 3,07±1,06 | 3,18±0,44 | < 0,001 |
| | 30 cm | 1,06±0,21 | 0,043±0,005 | 2,14±0,30 | 2,78±0,92 | < 0,001 |
| | 45 cm | 1,72±0,78 | 0,056±0,011 | 4,37±2,31 | 3,97±1,48 | < 0,001 |
| Cubatão | Superfície | 3,82±0,64 | 0,064±0,015 | 6,39±1,29 | 5,33±0,91 | < 0,001 |
| | 15 cm | 4,05±0,38 | 0,077±0,022 | 6,91±0,69 | 6,18±0,92 | < 0,001 |
| | 30 cm | 3,78±0,36 | 0,063±0,015 | 7,47±2,16 | 5,41±0,37 | < 0,001 |
| | 45 cm | 2,81±0,84 | 0,057±0,015 | 5,24±1,68 | 3,86±1,64 | < 0,001 |

Os recipientes com a água amostrada em cada área puderam ser descritas na Tabela III, na Juréia e em Cubatão.

Tabela III. Quantificação dos metais pesados (em µg/mL), nas amostras de água da Estação Ecológica de Juréia-Itatins (EEJI) e de Cubatão, colhidas em quatro pontos, sendo um no rio e outros no continente. Amostras variando do rio para o continente, com distância de 10m entre amostras.

| Local | Amostras | Cobre | Cádmio | Cromo | Chumbo | Mercúrio |
|---------|----------|--------|--------|--------|--------|----------|
| EEJI | Rio | < 0,05 | < 0,1 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,001 |
| | 10m | < 0,05 | < 0,1 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,001 |
| | 20m | < 0,05 | < 0,1 | < 0,05 | 0,12 | < 0,001 |
| | 30m | < 0,05 | < 0,1 | < 0,05 | 0,28 | < 0,001 |
| Cubatão | Rio | < 0,05 | < 0,1 | < 0,05 | 0,13 | < 0,001 |
| | 10m | < 0,05 | < 0,1 | < 0,05 | 0,12 | < 0,001 |
| | 20m | < 0,05 | < 0,1 | < 0,05 | 0,19 | < 0,001 |
| | 30m | < 0,05 | < 0,1 | < 0,05 | 0,16 | < 0,001 |

Tabela IV. Padrão de Qualidade do sedimento por metais pesados (µg/g), bem como para águas salobras (CLASSE 1) (µg/mL).

| POLUENTE | SEDIMENTO | | ÁGUA SALOBRA(Classe 1)* |
|----------|-----------|-------|-------------------------|
| | TEL | PEL | |
| Cádmio | 0,7 | 4,21 | 0,005 |
| Chumbo | 30,2 | 112 | 0,01 |
| Cobre | 18,7 | 108 | 0,005 |
| Cromo | 52,3 | 160 | 0,05 |
| Mercúrio | 0,13 | 0,696 | 0,0002 |

TEL= "Threshold Effect Level"; PEL= "Probable Effect Level"; * Resolução CONAMA nº, 357/05.

Tabela V. Teste T em amostras da região controle (Juréia) e da região impactada (Cubatão) - para verificar a existência diferença significativa entre as amostras. Utilizando três réplicas para cada ponto.

| Amostras | Cobre | | Cádmio | | Cromo | | Chumbo | |
|------------|-------|------|--------|------|-------|------|--------|------|
| | t | p | t | p | t | p | t | p |
| Superfície | 3,56 | <5% | 0,77 | <50% | 4,41 | <5% | 1,24 | <20% |
| 15 cm | 5,8 | <1% | 1,58 | <20% | 5,02 | <1% | 4,44 | <5% |
| 30 cm | 6,22 | <1% | 2,40 | <10% | 5,87 | <1% | 4 | <5% |
| 45 cm | 2,15 | <10% | 0 | 100% | 0,75 | <40% | 0,11 | <95% |

Os resultados das análises dos sedimentos apresentaram concentrações inferiores das quais não são esperados efeitos adversos sobre organismos aquáticos de acordo com a Legislação Canadense (ENVIRONMENT CANADA, 1999a). Realizamos testes estatísticos para verificarmos se os resultados eram significativamente diferentes, entre as regiões controle (Estação Ecológica de Juréia-Itatins) e impactada (Cubatão). O teste aplicado foi o Teste t, encontrando valores para t e seus respectivos valores de p, sendo apresentados na tabela V.

Analisando a tabela V, observamos que os metais pesados tiveram aumento significativo em Cubatão nas amostras de 15 e 30cm, propiciando altos valores de t (como para Cobre e Crômio), com níveis de significância de $p < 1\%$. Essa diferença tende a diminuir nas amostras de 45 cm de profundidade com $p < 10\%$ para Cobre e valores de p maiores para Cádmio, Crômio e Chumbo ($p < 100\%$, $p < 40\%$ e $p < 95\%$ respectivamente). Cádmio não apresentou nenhum valor significativo. Portanto, as maiores diferenças significativas entre a região controle e a impactada foram encontradas em Cobre (três amostras), em Cromo (três amostras) e em Chumbo (duas amostras).

A Estação Ecológica de Juréia-Itatins apresentou animais com média de 2 micronúcleos/1.000, abaixo do previsto na literatura (SCARPATO et al., 1990; FOSSI et al., 2000) para organismos não afetados por substâncias tóxicas ($< 4/1000$), ocorrendo o inverso para os espécimes de Cubatão, que apresentaram média superior a 5/1.000 (Fig, 4). As médias diferiram significativamente entre as duas regiões analisadas ($t=4,9$; $p < 0,01$).

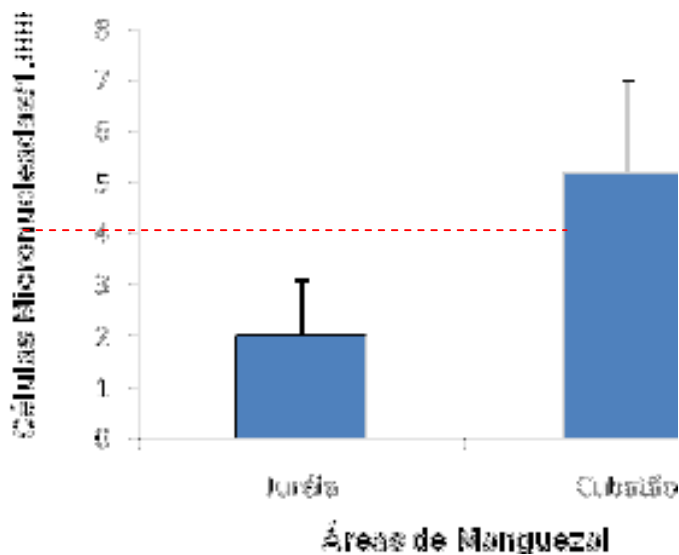


Figura 4. Comparação das médias de células micronucleadas/1.000 células analisadas obtidas para os grupos amostrais da região controle (Juréia) e da região impactada (Cubatão), em relação a média de 4/1.000 (linha tracejada) considerada para organismos não afetados por SCARPATO (1990) e FOSSI (2000).

4. DISCUSSÃO

A legislação ambiental brasileira não dispõe de critérios de qualidade de sedimento, embora existam vários estudos com dados basais para os metais pesados presentes no sedimento das regiões em estudo (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Assim, optamos por utilizar os critérios estabelecidos pela Agência Ambiental Canadense (ENVIRONMENT CANADA, 1999a) e pelo Manual de Desenvolvimento e Avaliação da Qualidade de Sedimento, do Departamento de Proteção Ambiental da Flórida (FDEP, 1994), que apresentam dois níveis de classificação: TEL (“Threshold Effect Level”), concentração abaixo da qual não são esperados efeitos adversos sobre organismos aquáticos; e PEL (“Probable Effect Level”), concentração acima da qual são esperados efeitos adversos severos sobre organismos aquáticos. O quantitativo de metais pesados presentes nas amostras de água salobra foi confrontado aos dados

disponibilizados pela Resolução CONAMA nº. 357/2005 (tabela IV). Utilizamos os valores de referência para Águas Salobras Classe 1, visto que uma das regiões em estudo é uma Unidade de Conservação, possuindo mínima interferência antrópica no local. Para a área de Cubatão, adotamos como Água Salobra Classe 3, sem valores de referência para a mesma.

A quantificação dos metais pesados nos sedimentos da Estação Ecológica de Juréia-Itatins evidencia que as amostras apresentaram valores bem abaixo do limite de concentração indicado pelo TEL. Nas amostras de água, foram encontrados valores abaixo dos níveis de detecção, exceção ocorrida em apenas duas amostras quanto ao Chumbo (amostras de 15 e 30 cm).

Os resultados obtidos para Cubatão não foram muito representativos, visto que apenas os dados para Chumbo superaram o permitido na Resolução CONAMA nº 357/05, mesmo referenciando-se em Águas Salobras de Classe 1. A grande maioria dos resultados obtidos para Cubatão diferiu do histórico conhecido para a região, que está sujeita aos poluentes gerados pelo Pólo Industrial instalado na região, não constatando nenhum valor de metal pesado acima do permitido por lei. No entanto, alguns pontos devem ser observados, como em algumas amostras de sedimento coletadas no local, com valores significativamente diferentes quando comparados com valores obtidos na Estação Ecológica de Juréia-Itatins (chumbo, cobre e cromo). As emissões atmosféricas de chumbo, especialmente no período em que era adicionado à gasolina como anti-detonante, contribuíram para um acréscimo significativo do metal nos solos e nas águas superficiais, refletindo-se, inclusive, nos estuários e oceanos (KENNISH, 1997). O chumbo geralmente está associado às atividades de empilhamento, encaixe de placas e da solda aos terminais de chumbo. A manipulação das placas resulta no desprendimento de grandes quantidades de poeira (partículas), que é constituída por chumbo na forma metálica ou de óxidos, além da emissão de fumaça decorrente do processo de soldagem (QUITERIO, 2000). Estudos em diversos países têm associado à exposição ambiental ao chumbo com efeitos adversos em diferentes sistemas do organismo humano, incluindo alterações nos sistemas neurológico,

hematológico, metabólico e cardiovascular (GALVÃO & COREY, 1989). Por tratar-se de metal de amplo emprego industrial e doméstico, inclusive como fungicida e algicida para piscinas (na forma solúvel de sulfato de cobre) e na forma metálica (tubulações, utensílios e fiação), o cobre está presente no lixo doméstico e nos esgotos em geral. Na indústria, o cobre é encontrado habitualmente em refinarias, siderúrgicas e indústrias de papel e celulose. Na Baixada Santista, o cobre é detectado em efluentes da Companhia Santista de Papel, RPBC-PETROBRÁS, Cosipa, Dow Química e de alguns terminais portuários de granéis líquidos. O metal também está presente no chorume de lixões e aterros sanitários e nos esgotos lançados no mar e nos estuários. (LAMPARELLI *et al.*, 2001). Na região da Baixada Santista, sais de cromo foram largamente utilizados como anti-corrosivo nos sistemas de resfriamento de grande parte das indústrias, provocando um aporte significativo do metal para o sistema hídrico POMPEIA (comunicação pessoal). Em Cubatão os sais de cromo foram substituídos por outras substâncias menos nocivas ao ambiente, a partir da implantação do programa de controle da poluição, em 1984. Mesmo após sua substituição, o cromo ainda foi detectado em efluentes da RPBC-PETROBRÁS, Carbochloro e Cosipa, bem como nos resíduos depositados no Lixão de Pilões. (LAMPARELLI *et al.*, 2001).

A análise dos tecidos dos animais seria muito importante para verificar a acumulação desses metais pesados presentes no meio ambiente.

Para a análise das células micronucleadas (Fig. 5), os animais coletados em Cubatão apresentaram média de 5/1.000 (5 células micronucleadas por 1.000 células analisadas, com variação de 2,3 a 8,7 células micronucleadas /1.000 células), superando o previsto na literatura de 4/1.000, mencionado por SCARPATO *et al.* (1990) e FOSSI *et al.* (2000), que quantificaram a frequência de micronúcleos no bivalve marinho *Mytillus galloprovincialis* e no caranguejo *Carcinus aestuarii*, respectivamente.

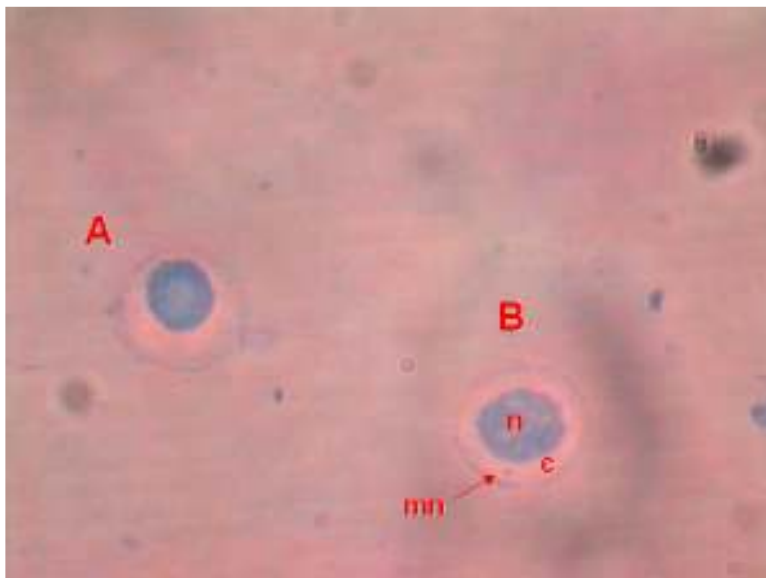


Figura 5 - *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763). Vista geral de uma célula normal (A) e outra com micronúcleo (B), na hemolinfa do exemplar coletado na Estação Ecológica Juréia-Itatins (c = citoplasma; n = núcleo; mn = micronúcleo).

Segundo GUTBERLET (1996), durante décadas as indústrias do Pólo de Cubatão emitiram diferentes tipos de poluentes e resíduos tóxicos para o ser humano, tanto no ar, no solo e nos corpos d'água da região. Tais resíduos se constituem em óxidos de enxofre, óxidos de nitrogênio, monóxido e dióxido de carbono, metano, hidrocarbonetos diversos, diversos tipos de organoclorados e fenóis clorados, fluoretos, aldeídos, ácidos, metais pesados e poeiras (material particulado). Talvez alguns desses compostos químicos, que não foram analisados neste projeto, possam ter influenciado a formação de micronúcleos, como no caso de FOSSI (2000), que encontrou resposta positiva quanto ao teste do micronúcleo em *Carcinus aestuarii*, quando contaminado por Hidrocarbonetos Poli Aromáticos.

No presente estudo optou-se pela análise de 3.000 células/exemplar, visando reduzir possíveis erros do método, visto que diversos estudos anteriores se baseiam numa média de células micronucleadas por 1.000 células analisadas (SCARPATO *et al.*, 1990; ECKERT & STOPPER,

1996; FOSSI *et al.*, 2000). Portanto, o intuito de analisar 3.000 células/exemplar e apresentar resultados referentes a cada 1.000 células foi de aumentar a confiabilidade do estudo e apresentar os dados como previamente mostrados na literatura.

Outro estudo, realizado por TOLEDO & PINHEIRO (2007) avaliou a frequência de células micronucleadas em um animal com malformação do quelípedo (vide Fig. 6), em uma área altamente impactada do Município de São Vicente, entre dois lixões inativos (Sambaiatuba e Alemoa). A análise de micronúcleos no animal apresentou a frequência de 11,5 células micronucleadas/1.000, quase três vezes acima do previsto na literatura para organismos não influenciados por poluição. Embora o estudo tenha sido realizado em apenas um exemplar coletado na região, podemos utilizar como um complemento do presente estudo.



Figura 6. Malformação do dedo fixo do própodo quelar de maior porte, pertencente ao quelípedo esquerdo. (Foto: Marcelo Antonio Amaro Pinheiro).

O presente estudo revela que o caranguejo *Ucides cordatus* pode ser utilizado como uma ferramenta adicional como bio-indicador de genotoxicidade em áreas de manguezal. Tendo em vista que é de extrema importância uma análise físico-química mais detalhada da região em estudo, para que possa ocorrer uma boa interpretação e correlação dos dados obtidos. Desta forma, o método pode ser utilizado no auxílio do biomonitoramento ambiental.

O uso do teste de micronúcleo é de fácil execução e apresentou ótimo resultado aplicado, indicando áreas sob efeito de impacto antrópico industrial. Entretanto, testes complementares de natureza molecular, como na análise da biodiversidade genética entre e dentro as populações (NASH *et al.*, 1998; WALPOLE *et al.*, 2001), devem ser utilizados em consorciação com este método, uma vez que pode existir uma associação positiva entre o maior impacto genotóxico e uma significativa perda de variabilidade genética na espécie. Tal evidência se torna premente, pois reforçaria o quão ameaçadas se encontram as regiões de manguezais da costa brasileira, além de orientar e priorizar medidas de manejo e conservação destes ambientes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADO, G. M., KAREZ, C. S. & PFEIFFER, W. C. Algas e poluição por metais. **Ciência Hoje**, **18**(105): 21-24. 1994.

BARSIENE, J. Genotoxic impacts in Klaipeda Marine port and Butinge oil terminal areas (Baltic Sea). **Marine Environmental Research**, **54**(3-5): 475-479. 2002.

ATHANASOPOULOS, N. **Flame Methods Manual GBC for Atomic Absorption**. Victoria, Australia: 1-11. 1994.

BASSET, J., DENNEY, R.C., JEFFERY, G.H. & MENDHAN, J. Vogel – Análise Inorgânica Quantitativa. **Guanabara Dois**, 4ª edição, Rio de Janeiro. 690p. 1981.

BAUDO, R., BELTRAMI, M. & ROSSI, D. In situ tests to assess the potential of aquatic sediments. **Aquatic Ecosystem Health & Manage**, **2**: 361-365. 1999.

BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLA, I. & BELTRAME, C. The micronucleus test: Examples of application to marine ecology. **Marine Ecology and Progress Series**, **44**: 65-68. 1998.

BRUNNER, A.G.; GULLISON, R.E.; RICE, R.E. & FONSECA, G.A.B. Effectiveness of parks in protecting tropical biodiversity. **Science**, **291**: 125-128. 2001.

BURGEOT, T.; HIS, E. & GALGANI, F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. **Mutation Research**, **342**: 125-140. 1995.

BURTON JR., G. A. & MACPHERSON, C. *Sediment toxicity testing issues and methods*. **Handbook of Ecotoxicology**. Lewis Publishers, Boca Ranton, pp. 70-98. 1995.

- BURTON JR., G. A.; BAUDO, R.; BELTRAMI, M. & ROWLAND, C. Assessing sediment contamination using six toxicity assays. **Journal of Limnology**, **60**(2): 263-267. 2001.
- BUSS, D.F.; BAPTISTA, D.F. & NESSIMIAN, J.L. Bases conceituais para aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno Saúde Pública**, **19**: 473-495. 2003.
- CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T.. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**. **204**: 379-406. 1988.
- CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L. & MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fishery and Aquatic Science**, **47**: 2123-2136. 1990.
- CETESB. Contaminantes na Bacia do rio Cubatão e seus Reflexos na Biotá Aquática. **Relatório Técnico CETESB**. 81p. mais anexos e mapas. 1990.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005**. Brasília: D.O.U., 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Acessado em: 07/07/2007.
- DOMINGOS, M.; KLUMPP, A. & KLUMPP, G. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, Brazil. **Ciência e Cultura**, **50**: 230-236. 1998.
- ECKERT I. & STOPPER H. Genotoxic effects induced by β -oestradiol in vitro. **Toxicology in Vitro**, **10**: 637-642. 1996.
- ENVIRONMENT CANADA. Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. 1999a. **Summary Tables**. <http://www.ec.gc.ca>. Acessado em: 02/04/2007.
- ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência/FINEP, 575p. 1988.

- EYSINK, G.G.J.; LAMPARELLI, M .C.; VARGAS-BOLDRINNI, C.; MARTINS, M.C. Contaminants in the Cubatão Riverbasin and its Estuary (SP, Brazil), relating to the Aquatic Biota. Part 1. Heavy Metals, arsenic and Cyanide. **11th Biennial International Estuarine Reasearch Conference** - San Francisco USA. Session: Inputs and Cycling of Natural and Contaminant Materials in Estuaries. 1991.
- FDEP. Development and evaluation of sediment quality assessment guidelines. Prepared for Florida Department of Environmental Protection, Office of Water Policy, Tallahasee, FL, by MacDonald Environmental Sciences Ltd., Ladysmith, British Columbia. **Approach to the assessment of sediment quality in Florida coastal waters. Vol. 1.** 133p. 1994.
- FELDMAN, R.S. & CONNOR, E.F. The relationship between pH and community structure of invertebrates in streams of the Shenandoah National Park, Virginia, U.S.A. **Freshwater Biology**, **27**: 261-276. 1992.
- FOSSI, M.C.; CASINI, S.; SAVELLI, C.; CORBELLI, C.; FRANCHI, E.; MATTEI, N.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; CORSI, I.; BAMBER, S.; DEPLEDGE, H.M. Biomarker responses at different levels of biological organization in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo[a]pyrene. **Chemosphere**, **40**:861-874. 2000.
- GALVÃO, L. A. & COREY, G. Plomo. Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de la Salud/Centro Americano de Ecología Humana y Salud. **Série Vigilancia. v. 8.** México, DF. 1989.
- GUTBERLET, J. Cubatão: Desenvolvimento, Exclusão Social e Degradação Ambiental. **Editora da Universidade de São Paulo, FAPESP.** 244p. 1996.
- INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 21 DE MAIO DE 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 28 de maio de 2004, **Seção 1**, p.136-142 BRASIL, 2004.

- JAYLET, A.; DEPARIS, P.; FERRIER, V.; GRINFELD, S. & SIBOULET, R. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh water pollution. **Mutation Research**, **164**: 245-257. 1986.
- JUNQUEIRA, M.V.; AMARANTE, M.C.; FRANÇA E.S. & DIAS, C.F.S. Biomonitoramento da qualidade das águas da bacia do Alto Rio das Velhas (MG/Brasil) através de macroinvertebrados. **Acta Limnologica Brasiliensia**, **12**: 73-87. 2000.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia. **Livraria Editora Santos**, São Paulo. 123 p. 1983.
- KENNISH, M.J. Practical handbook of Estuarine and Marine Pollution. **CRC Press**. **Boca Raton**. 524 p, 1997.
- KRAMER, R; van SCHAIK, C. & JOHNSON, J. Last stand: protected areas and the defense of tropical biodiversity. **Oxford, Oxford University Press**, 242p. 1997.
- LAMPARELLI, M. L.; COSTA, M. P.; PRÓSPERI, V. A.; BEVILÁCQUA, J. E.; ARAÚJO, R. P. A.; EYSINK, G. G. L., POMPÉIA, S. Sistema estuarino de Santos e São Vicente. Relatório Técnico da CETESB/SP. 178p. 2001.
- LIMA, J. S. Bioindicação e Biomonitoramento: Aspectos Bioquímicos e Morfológicos. **Techoje. Instituto de Educação Tecnológica - IETEC**, Belo Horizonte / MG, 11p. 2000.
- MARQUES, O.A.V. & DULEBA, W. **Estação Ecológica Juréia-Itatins – Ambiente Físico, Flora e Fauna**. Holos, Editora Ltda-ME, Ribeirão Preto, SP, 384p. 2004.

- MARVAN, P. Algal Assay: an introduction into the problem in Algal Assays and Monitoring Eutrophication. **Stuttgard: Marvan, Pribil & Lhotssky**, 253p. 1979.
- MISERENDINO, M. L. & PIZZOLÓN, L. A. Rapid assessment of river water quality using macroinvertebrates: A family level biotic index for the patagonic andean zone. **Acta Limnologica Brasiliensia**, **11**:137-148. 2001.
- NASH, W.G.; WIENBERG, J.; FERGUSON-SMITH, M.A.; MENNINGER, J.C. & O'BRIEN, S.J. Comparative genomics: Tracking chromosome evolution in the family Ursidae using reciprocal chromosome painting. **Cytogenetics and Cell Genetics**, **83**: 182-192. 1998.
- NIGRO, M.; FALLENI, A.; DEL BARGA, I.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F. & FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, **77**: 339–347. 2006.
- NUDI, A., H. **Avaliação da contaminação de manguezais da Baía de Guanabara utilizando caranguejo *Ucides cordatus* como bioindicador de poluentes de petróleo e desenvolvimento de metodologia de análises**. Tese de Doutorado/ Puc-Rio. 233p. 2005.
- OLIVEIRA, M. L. J. ; VIDAL-TORRADO, P. ; OTERO, X L ; FERREIRA, José Roberto . Mercurio total em solos de manguezais da Baixada Santista e Ilha do Cardoso, Estado de São Paulo. **Química Nova**, v. **30**, p. 519-524, 2007.
- PINHEIRO, M.A.A. & FISCARELLI, A.G. **Manual de apoio à fiscalização do Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*)**. Itajaí: **IBAMA**, 60 p. 2001.
- QUITERIO, S. L. Levantamento dos Níveis de Chumbo nas Circunvizinhanças de uma Fonte Estacionária de Emissão. Dissertação de Mestrado, Rio de

- Janeiro: **Departamento de Físico-Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro**. 2000.
- SANTOS FILHO, E.; SOUZA E SILVA, R.; SAKUMA, A.M.; SCORSAFAVA, M.A.; BARRETO, H.H.C; INOMATA, O.N.K. & LEMES, V.R.R. **Concentrações de metais pesados e pesticidas organoclorados em crianças residentes em bairros situados as margens dos rios do município de Cubatão (SP)**. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. Programa de Saúde e Meio Ambiente. Instituto Adolfo Lutz. 1991.
- SCARPATO, R.; MIGLIORE, L.; ALFINITO-COGNETTI, G. & BARALE, R. Induction of micronucleus in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. **Marine Pollution Bulletin**, **21**(2): 74-80. 1990.
- SHIMADA, H.; SUZUKI, H.; ITOH, S.; HATTORI, C.; MATSURA, Y.; TADA, S. & WATANABE, C. The micronucleus test of benzo[a]pyrene with mouse and rat peripheral blood reticulocytes. **Mutation Research**, **278**, 165-168. 1992.
- STOPPER, H. & MÜLLER, S.O. Micronuclei as biological endpoint for genotoxicity: A minireview. **Toxicology in Vitro** **11**, 661–667. 1997.
- TOLEDO, T.R. & PINHEIRO, M.A.A. Malformação no Caranguejo-Uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae), em São Vicente (SP). **Anais do “I Workshop sobre Crustáceos Decápodos de Áreas Estuarinas do Estado de São Paulo: Conhecimento Atual e Perspectivas”**, pg. 25-26. 2007.
- VARGAS-BOLDRINI, C.; EYSINK, G.G.J.; LAMPARELLI, M.C.; MARTINS, M.C. Contaminants in the Cubatão River basin and its Estuary (SP, Brazil), relating to the Aquatic Biota. Part 2. Organic Compounds. **11th Biennial International Estuarine Research Conference** - San Francisco USA. Session: Inputs and Cycling of Natural and Contaminant Materials in Estuaries. November 1991.

- WALPOLE, M.J.; MORGAN-DAVIES, M.; MILLEDGE, M.; BETT, P. & LEADER-WILLIAMS, N. Population dynamics and future conservation of a free-ranging black rhinoceros (*Diceros bicornis*) population in Kenya. **Biological Conservation**, **99**: 237-243. 2001.
- WILLIAMS, R.C. & METCALFE, C.D. Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, **23**: 193-202. 1992.
- WRISBERG, M.N.; BILBO, C.M. & SPLIID, H. Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. **Ecotoxicol. Env. Saf.**, **23**: 191-205. 1992.