FERNANDO CESAR PERINA

Avaliação de Risco Ecológico devido à contaminação por metais no
setor sul do Complexo Estuarino-Lagunar Cananéia-Iguape

Tese apresentada ao Instituto
Oceanográfico da Universidade de
São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências, Programa de
Oceanografia, área de concentração
Oceanografia Biológica

Orientador: Denis Moledo de Souza
Abessa

São Paulo

2016

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Avaliação de Risco Ecológico devido à contaminação por metais no
setor sul do Complexo Estuarino-Lagunar Cananéia-Iguape

FERNANDO CESAR PERINA

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências, área de concentração: Oceanografia Biológica.

Julgada em ____/____/____

_____ Prof(a). Dr(a).	_____ Conceito
_____ Prof(a). Dr(a).	_____ Conceito
_____ Prof(a). Dr(a).	_____ Conceito
_____ Prof(a). Dr(a).	_____ Conceito
_____ Prof(a). Dr(a).	_____ Conceito

AGRADECIMENTOS

Durante o período de desenvolvimento desta tese, obstáculos de cunho pessoal foram superados graças a importantes contribuições. Por este motivo, seguem os agradecimentos, que não poderiam estar limitados apenas aos colaboradores em âmbito profissional:

Acima de tudo, a Deus;

À minha querida e amada Elaine pelo amor, imensa paciência e dedicação, principalmente nas horas mais difíceis, me incentivando a seguir em frente, por muitas vezes ter abdicado de seus próprios compromissos para estar em São Vicente me ajudando, inclusive, em atividades no laboratório;

Aos meus pais Flávio e Rosni, que não mediram esforços para que eu e meus irmãos pudéssemos estudar e avançar cada vez mais em nossa formação profissional, por deles ter herdado a capacidade de superar as adversidades, pela motivação e amparo carinhoso nos momentos que mais precisei;

Aos meus irmãos Flavio, Fabiano, Francisco e Francine pela amizade e força nos momentos de dificuldade, sendo possível a transposição das barreiras durante mais esta jornada da minha carreira;

Ao meu orientador Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa, pela amizade e confiança em mim depositada, pela paciência e apoio pessoal nos momentos em que minha saúde esteve abalada, pela dedicação e entusiasmo na transmissão de conhecimentos e valores éticos, contribuindo grandemente para minha formação profissional;

Ao meu querido amigo Elias, pelas conversas construtivas, conselhos e orientação espiritual;

Ao meu grande amigo Riguel, parceiro desde os tempos de graduação, por todo auxílio prestado durante esses anos, desde a inscrição na seleção do programa até os detalhes finais para depósito da tese e, juntamente à sua esposa Camila, pela hospitalidade e assistência nos momentos que estive em São Paulo (e pelas correrias para me ajudar quando não pude estar);

Aos meus grandes amigos e colegas de República, que sempre fizeram da PERESTROIKA o nosso lar harmonioso: Bodeia, pelos momentos de descontração e correrias em São Paulo; Bicudo, pelas longas conversas

nos momentos difíceis e pelo incentivo a seguir em frente; Geleia, pela paciência nos momentos em que mais precisei de apoio, pela parceria nas exaustivas coletas nos manguezais e nas intermináveis atividades em laboratório;

A todos os colegas do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) da UNESP - São Vicente pelo companheirismo, ótimo convívio no laboratório e pela compreensão nos momentos que não pude prestar auxílio. Expresso meus agradecimentos especiais àqueles que auxiliaram diretamente nas atividades relacionadas a este trabalho: Bruno Campos-Sinhá, pela disposição em ajudar nos momentos que precisei; Carol, por viabilizar as análises no UFF e pelo auxílio no laboratório; Malária, pela dedicação no início das análises bioquímicas; Paloma, por transmitir seus conhecimentos e auxílio nas análises dos biomarcadores; Isabella por viabilizar a digestão piloto das amostras; Mariana, pelo auxílio nas etapas iniciais e, especialmente, por emprestar o homogeneizador de tecidos; Lucas, por viabilizar a digestão das amostras no NEPEA, pela parceria nas atividades finais de extração e pela viabilização das análises de metais com parceiros externos;

Ao Prof. Dr. Wilson Thadeu Machado e equipe do Laboratório de Geoquímica Ambiental da Universidade Federal Fluminense pela cooperação nas análises de SEM/AVS.

Ao Prof. Dr. Rubens Cesar Lopes Figueira e equipe do Laboratório de Química Inorgânica (LaQIMar) do Instituto Oceanográfico da USP pela cooperação nas análises de metais deste estudo.

Aos profissionais da Secretaria de Pós-Graduação do IOUSP, sempre prestativos e solícitos no esclarecimento de dúvidas, especialmente à Letícia, que por diversas vezes se dispôs a “resolver os meus problemas”.

Aos funcionários da Base Sul (Cananéia) do IOUSP por todo apoio, principalmente ao Clovis (a quem eu chamo de “Crovinho”) pela disposição e paciência durante as longas jornadas de voadeira pelo estuário.

À Profa. Dra. Yara Schaeffer-Novelli pela atenção e carinho com que fui recebido em suas aulas, por ter me motivado ainda mais no estudo e preservação dos manguezais e pelo exemplo de profissional que contribui efetivamente para transformações na área ambiental.

Aos antigos e preciosos amigos, que apesar do meu distanciamento, nunca deixaram de me apoiar.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Estudos e Pesquisas Aquáticas (FUNDESPA) pelas bolsas de estudos concedidas, possibilitando a dedicação necessária para o desenvolvimento deste estudo.

“É junto dos bão que a gente fica mió!”

*Guimarães Rosa,
Grande Sertão: Veredas*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Relevância do Tema.....	1
1.2 Contextualização do Trabalho	3
1.2.1 O ecossistema manguezal e sua vulnerabilidade às ações antrópicas	3
1.2.2 Efeitos Biológicos dos Metais	4
1.2.2.1 <i>Espécies Reativas de Oxigênio induzidas por metais</i>	6
1.2.3 Estudos ecotoxicológicos em ambientes aquáticos.....	7
1.2.4 Biomarcadores como ferramenta em estudos de contaminação ambiental.....	10
1.2.5 Uso de Bivalves em Estudos de Biomonitoramento	12
1.2.6 Avaliação de Risco Ecológico	13
2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E ANTECEDENTES.....	16
2.1 Área de Proteção Ambiental de Cananéia-Iguape-Peruíbe e O Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape.....	16
2.1.1 Clima	17
2.1.2 Hidrografia e dinâmica hidrológica.....	18
2.1.3 Produtividade Biológica.....	20
2.1.4 Aspectos socioambientais.....	20
2.1.5 Impactos Ambientais sobre o CELCI	21
2.1.5.1 <i>A Abertura do Canal do Valo Grande</i>	21
2.1.5.2 <i>O Vale do Rio Ribeira de Iguape e o Histórico de Contaminação por Metais</i>	23
2.1.5.3 <i>Influências Climáticas no Transporte de sedimentos e Contaminantes para o CELCI</i> 28	
2.1.6 Presença de Metais no CELCI	31
3 HIPÓTESES.....	35
4 OBJETIVOS.....	35

4.1	Objetivo Geral	35
4.2	Objetivos Específicos	35
5	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1	Modelos biológicos	37
5.2	Protocolo Amostral	38
5.2.1	Coleta de Sedimentos	38
5.2.2	Coleta do material biológico	39
5.2.3	Extração de tecidos dos bivalves	40
5.3	Análises sedimentológicas	41
5.3.1	Granulometria	41
5.3.2	Quantificação de matéria orgânica	41
5.3.3	Teor de carbonato de cálcio total (CaCO_3)	42
5.3.4	Determinação Química	42
5.3.5	Modelo SEM/AVS	42
5.3.6	Preparo das amostras para quantificação de metais em sedimento (extração ácida forte) e amostras biológicas	44
5.4	Ensaio de toxicidade	46
5.4.1	Coleta e Aclimação dos Organismos-teste	46
5.4.2	Procedimento Experimental	46
5.5	Biomarcadores Bioquímicos	48
5.5.1	Homogeneização dos tecidos	48
5.5.2	Quantificação de Proteínas Totais	49
5.5.3	Análises dos Biomarcadores Bioquímicos	49
5.5.3.1	<i>Metalotioneína (MT)</i>	49
5.5.3.2	<i>Concentração de tióis não proteicos reduzidos (GSH)</i>	50
5.5.3.3	<i>Glutathione-S-transferase (GST)</i>	50
5.5.3.4	<i>Glutathione Peroxidase (GPx)</i>	51
5.5.3.5	<i>Glutathione Redutase (GR)</i>	52
5.5.3.6	<i>Acetil Colinesterase (AChE)</i>	52
5.5.3.7	<i>Peroxidação lipídica (LPO)</i>	52

5.5.3.8	<i>Danos em DNA</i>	53
5.6	Tratamento dos dados e análises estatísticas	53
5.6.1	Integração dos dados	54
6	RESULTADOS	56
6.1	Caracterização dos Agentes Estressores	56
6.2	Caracterização da Exposição	58
6.2.1	Sedimentologia.....	58
6.2.2	Modelo SEM/AVS.....	59
6.2.3	Contaminação dos sedimentos	60
6.2.4	Bioacumulação.....	65
6.2.4.1	<i>Arsênio (As)</i>	67
6.2.4.2	<i>Cádmio (Cd)</i>	67
6.2.4.3	<i>Cromo (Cr)</i>	68
6.2.4.4	<i>Cobre (Cu)</i>	69
6.2.4.5	<i>Níquel (Ni)</i>	70
6.2.4.6	<i>Chumbo (Pb)</i>	71
6.2.4.7	<i>Zinco (Zn)</i>	72
6.3	Caracterização dos efeitos	75
6.3.1	Ensaio de Toxicidade	75
6.3.2	Biomarcadores Bioquímicos	76
6.3.2.1	<i>Metalotioneínas (MT)</i>	76
6.3.2.2	<i>Tióis não proteicos reduzidos (GSH)</i>	77
6.3.2.3	<i>Glutathione S-transferase (GST)</i>	77
6.3.2.4	<i>Glutathione peroxidase (GPx)</i>	78
6.3.2.5	<i>Glutathione redutase (GR)</i>	79
6.3.2.6	<i>Acetilcolinesterase (AChE)</i>	80
6.3.2.7	<i>Peroxidação lipídica (LPO)</i>	81
6.3.2.8	<i>Danos em DNA</i>	82
6.4	Integração dos dados	84
6.4.1	Abordagem Ecotoxicológica.....	84

6.4.2 Abordagem bioquímica	87
7 DISCUSSÃO	93
8 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Etapas da Reação de Fenton na presença de íons ferro e (b) Reação de Harber-Weiss.....	6
Figura 2: Área de Proteção Ambiental de Cananéia-Iguape-Peruíbe (APA-CIP) e Visão geral do Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape (CELCL).....	17
Figura 3: Vale do Rio Ribeira de Iguape mostrando os locais em que os resíduos de mineração foram depositados.....	25
Figura 4: Precipitação mensal ocorrida no Alto Vale do Rio Ribeira de Iguape (áreas de mineração) e no município de Cananéia durante o período entre as amostragens. As setas indicam os meses em que estas foram realizadas (agosto de 2012, março e setembro de 2013).	38
Figura 5: Setor sul do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape. Localização dos pontos amostrais em áreas de manguezais do Mar de Cubatão (1 - 3), Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, na Ilha do Cardoso (Referência).	40
Figura 6: Variação espaço-temporal das concentrações de metais e arsênio em sedimentos superficiais de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref). As linhas duplas correspondem aos limiares de efeito provável e as linhas simples aos limiares de efeito possível (Choueri <i>et al.</i> , 2009).	63
Figura 7: Variação espacial das concentrações de metais e arsênio, durante a estação com chuvas moderadas, em sedimentos superficiais de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref). As linhas duplas correspondem aos limiares de efeito provável e as linhas simples aos limiares de efeito possível (Choueri <i>et al.</i> , 2009).	64
Figura 8: Concentrações de Arsênio (As) nos tecidos de bivalves das espécies <i>Mytella guyanensis</i> , <i>M. falcata</i> e <i>Crassostrea</i> sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($16 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998).....	67
Figura 9: Concentrações de cádmio (Cd) nos tecidos de bivalves das espécies <i>Mytella guyanensis</i> , <i>M. falcata</i> e <i>Crassostrea</i> sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($3,7 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998).....	68
Figura 10: Concentrações de cromo (Cr) nos tecidos de bivalves das espécies <i>Mytella guyanensis</i> , <i>M. falcata</i> e <i>Crassostrea</i> sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($2,5 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998).....	69
Figura 11: Concentrações de cobre (Cu) nos tecidos de bivalves das espécies <i>Mytella guyanensis</i> , <i>M. falcata</i> e <i>Crassostrea</i> sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões ($10 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998). O indicativo para ostras ($300 \mu\text{g g}^{-1}$) não está representado.	70
Figura 12: Concentrações de níquel (Ni) nos tecidos de bivalves das espécies <i>Mytella guyanensis</i> , <i>M. falcata</i> e <i>Crassostrea</i> sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de	

Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($3,4 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998)..... 71

Figura 13: Concentrações de chumbo (Pb) nos tecidos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea* sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($3,2 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998)..... 72

Figura 14: Concentrações de zinco (Zn) nos tecidos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea* sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha contínua corresponde à concentração indicativa de contaminação em ostras ($4000 \mu\text{g g}^{-1}$), a linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões ($200 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998). 73

Figura 15: Percentuais de mortalidade ($\pm$ desvio padrão) de *Tiburonella viscana* nos ensaios de toxicidade aguda com sedimentos coletados nas estações de clima seco e chuvoso. (*) Indica as amostras com diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles experimentais. 75

Figura 16: Concentração de Metalotioneína (MT) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos. 76

Figura 17: Concentração tióis não proteicos reduzidos (GSH) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos. 77

Figura 18: Atividade enzimática de Glutathione S-transferase (GST) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). *falcata* As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos. 78

Figura 19: Atividade da enzima Glutathione peroxidase (GPx) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos. 79

Figura 20: Atividade da enzima Glutathione redutase (GR) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos. 80

Figura 21: Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos. 81

Figura 22: Peroxidação lipídica nas brânquias de <i>M. guyanensis</i> e <i>M. falcata</i> coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.	82
Figura 23: Danos em DNA (quebra das fitas) nas brânquias de <i>M. guyanensis</i> e <i>M. falcata</i> coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.	83
Figura 24: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos nos manguezais do Mar de Cubatão (P1 - P3), Mar de Cananéia (A - E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período seco.	85
Figura 25: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos nos manguezais do Mar de Cubatão (P1 - P3), Mar de Cananéia (A - E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período chuvoso.	86
Figura 26: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos e <i>M. guyanensis</i> no Mar de Cananéia (A - E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período seco.	88
Figura 27: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos e <i>M. falcata</i> no Mar de Cananéia (A - E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período seco.	90
Figura 28: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos e <i>M. guyanensis</i> no Mar de Cananéia (A - E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período de chuvas moderadas.	92
Figura 29: Modelo conceitual de risco ecológico com base nos dados obtidos para o setor sul do Complexo Estuarino Lagunar Cananéia-Iguape.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições operacionais para o ICP OES utilizadas na determinação de metais em extratos de sedimento.	43
Tabela 2: Concentrações de metais Arsênio e determinadas nos materiais de referência certificados para sedimentos e amostras bióticas.	45
Tabela 3: Máximas concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de metais e As reportadas em sedimentos do Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape.	57
Tabela 4: Percentual de Areia, finos (silte e argila), matéria orgânica (M.O.) e carbonato de cálcio (CaCO_3) nos sedimentos provenientes de manguezais do Mar de Cubatão (P1 - P3), do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref).	58
Tabela 5: Concentrações de metais nos sedimentos e resultados das análises pelo modelo SEM/AVS, para as amostras de sedimentos provenientes de manguezais do Mar de Cubatão (P1, P2 e P3), do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref). Valores de SEM/AVS com potencial de toxicidade (acima de 1) estão realçados.	59
Tabela 6: Concentrações de arsênio (As) e metais determinados via extração ácida forte (USEPA, 1996), nos sedimentos superficiais de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), durante o período de chuvas moderadas.	62
Tabela 7: Concentrações de metais em base seca (b.s.) e arsênio (AS) em <i>Crassostrea</i> sp. (<i>Crs</i>), <i>M. guyanensis</i> (<i>M.g</i>) e <i>M. falcata</i> (<i>M.f</i>) coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref).	66
Tabela 8: Correlação de Pearson entre concentrações de metais nas partes moles dos bivalves (<i>Crassostrea</i> sp., <i>Mytella guyanensis</i> e <i>M. falcata</i>) e nos sedimentos das áreas de coleta para cada campanha da amostragem. As correlações significativas ($p < 0,05$) estão realçadas.	74
Tabela 9: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos e toxicidade dos sedimentos coletados durante a estação seca. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.	85
Tabela 10: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos e toxicidade dos sedimentos coletados durante a estação chuvosa. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.	86
Tabela 11: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos, toxicidade dos sedimentos, bioacumulação e biomarcadores bioquímicos em mexilhões da espécie <i>M. guyanensis</i> coletados durante a estação seca. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.	88
Tabela 12: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos, toxicidade dos sedimentos e biomarcadores bioquímicos em mexilhões da espécie <i>M. falcata</i> coletados durante a estação seca. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.	90
Tabela 13: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos, toxicidade dos sedimentos e biomarcadores bioquímicos em mexilhões da espécie <i>M. guyanensis</i> coletados durante a estação com chuvas moderadas. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.	92

Tabela 14: Concentrações de metais e As reportados na biota do Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape. Concentrações em base úmida (média $\pm$ DP) expressos em ppm. Os valores mínimos e máximos também são apresentados quando disponíveis..... 103

Tabela 15: Síntese dos resultados obtidos por cada linha de evidência na Avaliação de Risco Ecológico no setor sul do Complexo Estuarino-Lagunar Cananéia-Iguape, tendo como escopo a contaminação por metais advindos das antigas áreas de mineração do Vale do Ribeira. ... 116

RESUMO

O histórico de contaminação por metais no Vale do Rio Ribeira de Iguape é bem conhecido, com evidências de transporte destes contaminantes ao Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape (CELCI), adsorvidos ao material em suspensão. Assim, os metais podem alcançar o setor sul do CELCI, podendo acumular nos sedimentos e nos organismos filtradores. Neste estudo foi realizada uma avaliação de risco ecológico no CELCI associado à presença de metais oriundos das antigas áreas de mineração do Alto Ribeira, utilizando diferentes linhas de evidência. Os resultados foram avaliados de forma integrada, incluindo análises geoquímicas e biológicas (ensaios de toxicidade aguda, medidas de bioacumulação e biomarcadores bioquímicos em brânquias de bivalves). Os sedimentos apresentaram níveis moderados a altos de metais e toxicidade aguda, a qual foi associada, especialmente, com as concentrações de Cu, Pb e Zn. Da mesma forma estes metais foram encontrados em concentrações altas nos tecidos de bivalves. Os biomarcadores bioquímicos (MT, GSH, GST, GPx, GR, AChE, LPO e danos em DNA) indicaram a ocorrência de efeitos significativos nos bivalves. Portanto, os resultados mostram que os metais estão sendo carregados para a porção sul do estuário, causando bioacumulação e efeitos nos organismos aquáticos e, portanto, gerando riscos ecológicos para o CELCI.

Palavras-chave: Risco Ecológico, APA-CIP, bivalves, biomarcadores, poluição.

ABSTRACT

The historic of contamination by metals in the Valley of Ribeira de Iguape River is well known, and there are evidences that these chemicals are carried to the Estuarine Complex of Cananeia-Iguape (ECCI), adsorbed on the suspended particles. Metals can thus reach the south of the ECCI, where they may accumulate in the sediments and filter feeding organisms. This study aimed to evaluate the ecological risks associated to the metals originated from the former mining areas of the upstream Ribeira de Iguape River, by using different lines of evidence, which included geochemical and biological analysis (acute toxicity tests, bioaccumulation and biochemical biomarkers in bivalves' gills). The sediments presented moderate to high levels of metals and acute toxicity, which was correlated with the concentrations of metals (Cu, Pb and Zn). These elements were found in high concentrations in the bivalves soft tissues. The biochemical biomarkers (MT, GSH, GST, GPx, GR, AChE, LPO, and DNA damage) indicated the occurrence of significant effects in the bivalves. Therefore, the results showed that metals are carried into the South portion of the estuary, accumulating in the biota and causing negative effects to the aquatic organisms, producing thus ecological risks to the ECCI.

Key words: Ecological Risk, APA-CIP, bivalves, biomarkers, pollution.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do Tema

Estuários são zonas costeiras de transição entre água doce (fluvial) e água salgada (marinha), que apresentam gradientes de parâmetros abióticos conspícuos, ocasionados principalmente pelas descargas fluviais e regime de marés. Portanto, uma ampla variação de salinidade, pH, temperaturas e condições geoquímicas podem ocorrer nestes ambientes transicionais. Estas condições podem ser encontradas mesmo em escalas temporais e espaciais relativamente pequenas (Elliott e McLusky, 2002). As características hidrodinâmicas dos estuários favorecem a retenção de nutrientes e a produção primária, fazendo com que estes ambientes figurem entre os ecossistemas costeiros mais produtivos em termos biológicos (Miranda *et al.*, 2002; McLusk e Elliot, 2004).

Historicamente, o homem tem utilizado os corpos d'água como receptores de seus resíduos. Além disso, as regiões costeiras tendem a apresentar uma intensa ocupação humana, ocasionando forte pressão sobre os ecossistemas que aí se encontram. No Brasil, por exemplo, das 25 regiões metropolitanas, 14 estão situadas regiões estuarinas, onde se localizam os principais polos petroquímicos e sistemas portuários do país (Lamparelli *et al.*, 2001). Portanto, estes ecossistemas estão expostos à intensa ação antrópica, que pode causar a redução de recursos naturais, comprometimento da biota (Kennish, 1991; Mclusky e Elliott, 2004) e, conseqüentemente, perda da biodiversidade dos ecossistemas oceânicos (Worm *et al.*, 2006).

A deposição de sedimentos e materiais de origem antrópica é potencializada nos estuários, uma vez que estes ambientes apresentam aspectos físico-químicos e geomorfológicos favoráveis (Du Laing *et al.*, 2009). Os contaminantes podem deslocar-se entre os diferentes compartimentos da matriz sedimentar, como água intersticial, fase sólida (sedimento, material particulado em suspensão e biota) e interface sedimento-água (Jickells e Rae, 1997). Dentre os aspectos que controlam a mobilidade dos contaminantes, estão incluídos mudanças na salinidade, temperatura, pH e potencial de oxirredução. Estes fatores são responsáveis, por exemplo, pela retenção e

liberação dos metais associados à fração mais fina, matéria orgânica, óxidos de ferro e sulfetos nos sedimentos (Rae, 1997).

A presença de metais nos estuários pode ser oriunda de fontes naturais, tanto pela composição geológica local quanto pela lavagem de solos e rochas presentes nas bacias de drenagem. Porém, a maior contribuição advém de fontes antrópicas, tais como efluentes domésticos e industriais, aplicação de pesticidas na agricultura (Ebrahimpour e Mushrifah, 2008), precipitação atmosférica (Pereira *et al.*, 2006) e principalmente atividades de mineração. Cabe ressaltar que mesmo quando realizada em áreas distantes dos estuários, a mineração pode afetar estes ecossistemas (Johnson *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2005; Masson *et al.*, 2006; Osher *et al.* 2006), em especial devido ao transporte de resíduos e sedimentos contendo metais adsorvidos.

Os sedimentos podem ser considerados uma das matrizes mais complexas existentes nos ecossistemas aquáticos, sendo importantes indicadores de qualidade ambiental (Power e Chapman, 1992). Porém, qualquer consideração sobre a qualidade ambiental de estuários, com base em concentrações de metais em sedimentos, também deve abordar a variabilidade destas concentrações no espaço e no tempo (Rae, 1997). As análises químicas podem fornecer informações sobre a natureza e as concentrações ambientais de contaminantes, as quais se estiverem em formas biodisponíveis, podem levar à toxicidade e bioacumulação (USEPA, 2004). Entretanto, diferentes tipos de associações dos contaminantes com os sedimentos podem alterar a sua biodisponibilidade (Araújo *et al.*, 2006).

Nesse sentido, uma avaliação da contaminação dos sedimentos realizada exclusivamente por análises químicas frequentemente não é suficiente para estimar danos aos organismos que compõem os ecossistemas aquáticos. Esta abordagem realizada isoladamente apenas quantifica as concentrações presentes no ambiente e não fornece informações quanto a sua biodisponibilidade e possíveis efeitos à biota. Dessa forma, estudos ecotoxicológicos (i.e., sobre os efeitos biológicos dos contaminantes) são de extrema importância para avaliar, de forma complementar ou isolada, a qualidade de sedimentos (Chapman e Long, 1983).

1.2 Contextualização do Trabalho

1.2.1 O ecossistema manguezal e sua vulnerabilidade às ações antrópicas

O manguezal é um ecossistema próprio de regiões estuarinas tropicais e subtropicais e ocupa aproximadamente 70% da área costeira tropical. No ano de 2000, a área total de manguezais do mundo foi estimada em 137.760 km², em 118 países (Giri *et al.*, 2011). O maior percentual de manguezais é encontrado entre as latitudes 5°N e 5°S, mas esses ecossistemas ocorrem em toda extensão latitudinal entre 32°N e 38°S (Morrisey *et al.*, 2010; Friess *et al.*, 2012).

A cobertura vegetal típica dos manguezais, genericamente conhecida como mangue, coloniza depósitos sedimentares formados por vasas lamosas, argilosas ou arenosas, ocupando a faixa do entremarés até o limite superior das preamares equinociais. As correntes de marés permitem um constante intercâmbio de água, nutrientes, sedimentos e organismos com as regiões costeiras adjacentes (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2000). Além de proporcionar um ambiente ecológico único para promoção da biodiversidade (Hogarth, 2007), os manguezais apresentam teias alimentares relativamente complexas, com intrincadas relações com os habitats vizinhos (Kathiresan e Bingham, 2001; Nagelkerken *et al.*, 2008). Assim, o manguezal apresenta grande valor ecológico que extrapola o do próprio ecossistema, com extrema importância na manutenção da alta diversidade biológica, estrutural e funcional das zonas costeiras e marinhas (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2000).

O baixo hidrodinamismo, que normalmente ocorre em áreas de manguezais, facilita a retenção de materiais particulados em suspensão e substâncias dissolvidas na água, podendo acarretar em um acúmulo pontual, o que faz dos sedimentos destes ambientes um repositório de substâncias orgânicas e inorgânicas, principalmente metais (Rae, 1997). Uma vez nos sedimentos, os contaminantes podem afetar diretamente a biota bentônica, mas também podem retornar à coluna d'água por diferentes processos físicos, químicos e biológicos acarretando em um risco ecológico ainda maior (Nipper *et al.*, 1989). A ressuspensão de sedimentos, contaminados ou não, pode ocorrer naturalmente, como os observados na zona de turbidez máxima, que

ocorrem principalmente em estuários de cunha salina e parcialmente estratificados. Nestes locais são observados altos níveis de sedimentos em suspensão, podendo ser 100 vezes superiores aos de regiões à montante e à jusante (Postma, 1967). Estes aspectos fazem dos estuários áreas bastante sensíveis e estudos atuais os consideram entre os ecossistemas costeiros mais afetados pela ação antrópica (Lewis *et al.*, 2011).

As espécies de mangue são consideradas tolerantes à presença de metais (Walsh *et al.*, 1979; Chiu e Chou, 1991). As características adaptativas destas espécies são responsáveis por parte desta tolerância, devido aos mecanismos de íon-exclusão, acumulação e translocação, presentes em suas raízes (Walsh *et al.*, 1979; MacFarlane *et al.*, 2007). Entretanto, estes contaminantes podem causar efeitos adversos a diferentes organismos, e esses efeitos possivelmente irão ocorrer em diferentes concentrações, dependendo da espécie exposta.

Há pouco mais de 30 anos foram reconhecidos os efeitos antrópicos sobre os ecossistemas estuarinos, especialmente os manguezais (FAO, 2007). Além disso, cerca de 35% de cobertura de mangue global havia sido destruída até o final do século 20 (Valiela *et al.*, 2001) e estudos recentes apontam para uma continuidade desta perda (Polidoro *et al.*, 2010). Apesar destas informações, apenas 6,9% das áreas de mangue são protegidas atualmente (Giri *et al.*, 2011).

1.2.2 Efeitos Biológicos dos Metais

A absorção de metais ocorre através de membranas celulares, e pode envolver mais de um mecanismo para um mesmo elemento (Foukles, 2000). Alguns mecanismos que contribuem para a homeostase dos metais têm sido recentemente identificados em níveis moleculares, incluindo proteínas que mediam a entrada de metais essenciais nas células. Algumas dessas proteínas presentes nas membranas biológicas aparentemente possuem alta seletividade por um dado metal essencial ao passo que outras possuem pouca especificidade e interagem com diferentes elementos, incluindo metais não essenciais (Ballatori, 2002). A proteína de membrana DCT1 (divalente cationtransporter-1), por exemplo, é uma transportadora de metais multiespecífica pertencente à família das NRAMP (*natural resistance-*

associated macrophage protein) e demonstram ser altamente conservativas, estando presentes desde leveduras até humanos (Zhou e Gitschier, 1997). A DCT1 é responsável pelo principal mecanismo de absorção de Fe^{2+} , sendo ainda extremamente eficiente no transporte de vários cátions divalentes (Fe, Zn, Mn, Co, Cd, Cu, Ni, e Pb) por meio de mecanismos acoplados com o bombeamento de prótons. É importante salientar que entre os possíveis substratos para esta proteína incluem-se metais não essenciais (Gunshin, 1997).

Outra maneira importante pela qual os metais não essenciais podem atravessar a membrana celular e produzir danos é na forma de complexos que mimetizam moléculas endógenas. Como exemplo estão o arsenato e o vanadato que podem assumir os sítios de ligação destinados ao fosfato (Clarkson, 1993), bem como o cromato, selenato e o molibdato, os quais são estruturalmente semelhantes ao sulfato, podendo mimetizá-lo em sistemas biológicos (Kavanaugh e kabat, 1996). Aparentemente, os canais de entrada de íons não contribuem tanto para entrada de metais não essenciais, entretanto podem existir algumas exceções dependendo do tipo celular. Em tecidos excitáveis, por exemplo, Cd^{2+} e Pb^{2+} podem entrar via canais de voltagem-sensível (Hinkle, *et al.*, 1987; Simons e Pocock, 1987).

Os íons metálicos são quimicamente muito reativos, apresentando alta afinidade por grupos sulfidrilas de cisteínas (comuns em proteínas) e por outras biomoléculas, como os peptídeos e fosfolipídios. Consequentemente, os metais podem afetar criticamente a função dos sistemas biológicos e, devido a sua alta reatividade, é improvável que íons metálicos (a não ser que extremamente transientes) possam existir de forma livre em sistemas biológicos. Assim, a transferência de metais através das membranas celulares geralmente envolve transferência de complexos metálicos, havendo, portanto, interação com seus constituintes (Foukles, 2000). Deste modo, nos fluídos biológicos e nos tecidos os metais estão preferencialmente complexados. A ligação entre metais não essenciais e enzimas, tais como metalotioneínas, ferritinas, transferinas, lactoferrinas, melanotransferinas, hemosiderinas, ceruloplasminas e peptídeos como a glutathiona, ou ainda aminoácidos, como a cisteína, constitui um mecanismo de defesa das células (Ballatori, 2002). Dessa maneira a disponibilidade de metais é largamente regulada pela concentração relativa dos

ligantes biológicos, bem como a capacidade dos complexos formados servirem como substrato para diversos transportadores de solutos presentes nas membranas celulares (Ballatori, 1994).

1.2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio induzidas por metais

A contaminação por metais é extremamente danosa aos organismos, devido, em parte, a sua grande probabilidade na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO incluem espécies radicalares ou radicais livres, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, representadas pelo radical hidroxila [$\text{HO}^\bullet$] e o ânion super-óxido [$\text{O}_2^{\bullet-}$]. Além disso, também podem ser espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Di Giulio e Meyer, 2008). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, porém é altamente reativo; seu poder oxidativo é indireto podendo gerar $\text{OH}^\bullet$ por meio da reação de *Fenton*. Esta reação ocorre em duas etapas e requer um metal de transição, sendo que o exemplo clássico é aquela em que ocorre na presença de íons ferro (figura 1a). Outra forma de ação indireta é a interação com $\text{O}_2^{\bullet-}$, conhecida como reação de *Harber Weiss*, que ocorre sem a necessidade da presença de ânions (figura1b).

Figura 1: (a) Etapas da Reação de Fenton na presença de íons ferro e (b) Reação de Harber-Weiss.

Diversas substâncias podem dar origem aos radicais livres, no entanto, a molécula de água é aquela mais implicada, devido a sua abundância nos sistemas vivos. A maioria das ERO é altamente tóxica e pode promover a oxidação diversas biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As células possuem mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio, com diferentes sistemas protetores e reparadores. Estes sistemas são classificados em três categorias: (I) sistemas queladores de metais, os

quais previnem a formação de ERO inibindo reações como a de Fenton, que geram $\text{OH}^\bullet$; (II) compostos de baixo peso molecular e enzimas antioxidantes, os quais são capazes de reagir com ERO antes que haja dano às biomoléculas; e (III) sistemas de reparo que representam a última defesa contra o estresse oxidativo, os quais são capazes de remediar os danos causados por ERO às biomoléculas.

Dentre os mecanismos que respondem pela primeira via de defesa da célula, estão as metalotioneínas (MT), as quais apresentam maior conservação dentre os mais diversos organismos (Ngu e Stillman, 2009; Wang e Fowler, 2008; Lynes *et al.*, 2006). As MT constituem uma família de proteínas de baixo peso molecular (~6-14 kDa) ricas em resíduos de cisteína (podem representar até 30% dos amino ácidos).

A segunda frente envolvida na inibição da formação de radicais hidroxilas é representada pelas enzimas antioxidantes, que respondem pela decomposição das ERO (Findlay *et al.*, 2005). O ânion superóxido pode ser dismutado a H_2O_2 espontaneamente ou através da ação da enzima Superóxido dismutase (SOD), (Culotta *et al.*, 2008; Jayakumar *et al.*, 2006). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser decomposto por uma série de enzimas celulares entre elas estão: as Tiorredoxinas peroxidases (TPx), que atuam em conjunto com as SOD, catalisando a redução dos peróxidos através de cisteínas altamente reativas presentes em seus sítios ativos (Fourquet *et al.*, 2008); Catalase (Cat), que realiza uma dismutação, ou seja, o substrato age tanto como agente redutor como oxidante (Jayakumar *et al.*, 2006); Glutathione Peroxidase (GPx) catalisa a redução de hidróxidos orgânicos e inorgânicos através da glutathione reduzida (GSH) - um tripeptídeo antioxidante (γ -L-Glutamil-L-cisteinil-L-glicina) abundante nas células - formando a glutathione oxidada (GSSG) e H_2O e paralelamente à GPx, a enzima Glutathione Redutase (GR) catalisa a redução do GSSG a GSH (Fourquet *et al.*, 2008).

1.2.3 Estudos ecotoxicológicos em ambientes aquáticos

Devido à crescente preocupação em salvaguardar os ambientes marinhos e estuarinos, a toxicologia aquática foi uma das ciências que mais se desenvolveu a partir do final do século XX, pois fornece subsídios para a integração de informações ambientais. Os princípios da toxicologia ambiental

são baseados na toxicologia humana e fundamentados na capacidade do homem em estimar efeitos deletérios de certas substâncias sobre os organismos vivos (Zakrzewski, 1991), podendo integrar diferentes informações com base no peso de evidências (Chapman, 2007). O termo Ecotoxicologia surgiu em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, na qual o toxicologista francês René Truhaut definiu a Ecotoxicologia como “a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os seres vivos vivem num contexto integrado” (Truhaut, 1977).

De maneira simplificada, a Ecotoxicologia pode ser apresentada como a integração da toxicologia com a ecologia, ou conforme apresentado por Chapman (2002), a "ecologia na presença de substâncias tóxicas". Segundo este autor a Ecotoxicologia difere da Toxicologia Ambiental na medida em que integra os efeitos estressores sobre todos os aspectos de organização biológica, desde níveis bioquímicos e moleculares até níveis mais elevados como comunidades e ecossistemas. Em contrapartida, a Toxicologia Ambiental estaria centrada apenas nos efeitos sobre o indivíduo.

Conforme apresentado anteriormente a avaliação da qualidade de sedimentos realizada exclusivamente por análises químicas frequentemente não é suficiente para estimar danos aos organismos que compõem os ecossistemas aquáticos. A principal dificuldade é quanto biodisponibilidade dos contaminantes. Dentre as técnicas empregadas para avaliar a biodisponibilidade de contaminantes, aqueles baseados no equilíbrio de partição são amplamente utilizados (USEPA, 2005; 2008). Para metais, a técnica comumente utilizada emprega sulfetos volatilizáveis em ácido (AVS – do inglês *acid volatile sulfides*) e considera sua relação com os metais extraídos simultaneamente (SEM – do inglês *simultaneously extracted metals*) (Allen *et al.*, 1993a; USEPA, 2007a).

Desde a década de 1990 diversos estudos apontaram para a relação entre a disponibilidade biológica dos metais à concentração de sulfetos (Carlson *et al.*, 1991; Brumbaugh, *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1993b; Casas e

Crecelius, 1994; Ankley, 1996). Deste modo, os sulfetos têm um papel importante na disponibilização biológica e mobilização dos metais, uma vez que os complexos sulfetos-metálicos são constituídos de precipitados estáveis e quimicamente pouco reativos (Craig e Bartlett, 1978; Morse e Cornwell, 1987; Morse, 1994). Segundo Di Toro *et al.* (1992), a disponibilidade de sítios de sulfeto está diretamente relacionada à complexação dos metais, diminuindo sua toxicidade.

Segundo o modelo SEM/AVS, é possível inferir o grau de toxicidade de um sedimento contaminado com metais, quando as concentrações destes excedem aos complexados aos sulfetos. Conforme esta premissa, quanto maior a presença de complexos sulfeto-metálicos, menor será a biodisponibilidade dos metais e, conseqüentemente, menor a toxicidade. Nos sedimentos, a maior parte dos sulfetos não é encontrada na forma livre, assim sendo, apresenta-se complexado principalmente com ferro. Entretanto, o sulfeto férrico tem um produto de solubilidade (K_{ps}) baixo, em relação aos outros sulfetos metálicos. Deste modo, os metais que apresentam K_{ps} mais elevados tendem a substituir o ferro nos complexos de sulfeto. No caso do modelo do SEM/AVS, os metais considerados como substituintes do ferro são Zn, Cd, Cu, Pb e Ni.

Em monitoramentos ambientais, análises químicas e ensaios de toxicidade têm sido empregados para avaliar os níveis de contaminação de uma área e os efeitos biológicos dessa contaminação. Além disso, a complexidade química no ambiente, frente às baixas concentrações de algumas substâncias, dificulta a detecção e avaliação de seus efeitos. Em um ambiente aquático contaminado, os organismos estão geralmente expostos a níveis subletais dos agentes tóxicos, devido a fatores de diluição exercidos sobre esses compostos químicos. Este tipo de exposição, por sua vez, não levará o indivíduo à morte num curto período de tempo, mas poderá causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais nestes organismos (Depledge, 1993).

Portanto, além dos efeitos letais em curto e longo prazo, efeitos adversos dos metais podem ser subletais, podendo ser identificados danos nos níveis fisiológicos, celulares, bioquímicos e moleculares (Depledge, 1993). Assim, a identificação das respostas biológicas às agressões ambientais não

deve ser restrita à estrutura do ecossistema, como populações biológicas e comunidades, mas também nos níveis mais basais de organização, desde as reações bioquímicas intracelulares (Bayne *et al.*, 1985). Estas alterações podem ser avaliadas através de parâmetros biológicos mensuráveis experimentalmente, os quais são denominados biomarcadores. Deste modo, é possível antecipar danos potenciais em níveis mais elevados de organização biológica (Cheung *et al.*, 1997).

1.2.4 Biomarcadores como ferramenta em estudos de contaminação ambiental

Os biomarcadores são indicadores biológicos que evidenciam efeitos resultantes da exposição a um estressor, geralmente em nível de sub-organismo. Deste modo, pode ser interpretado como um evento adaptativo ou como uma séria alteração de um evento funcional, dependendo da toxicocinética e do mecanismo de ação do estressor (Decaprio, 1997). Tal alteração pode envolver perturbações de processos bioquímicos e moleculares no interior das células, originando efeitos em níveis maiores de organização. Portanto, os biomarcadores são considerados como respostas biológicas que podem ser medidas no próprio organismo ou nos seus produtos.

Existem biomarcadores em diversos níveis de organização biológica, desde o molecular até o reprodutivo, passando pelos níveis bioquímico, citológico, histológico, fisiológico e comportamental. Dentre as características mais importantes dos biomarcadores, destacam-se o fato de permitir identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos, bem como a possibilidade da mensuração de efeitos subletais. Assim sendo, o uso de biomarcadores em estudos ecotoxicológicos é de extrema importância, visto que a detecção prévia de estresse (*early-warning*) em níveis subletais fornece subsídios para a gestão ambiental (Nascimento *et al.*, 2006), em especial a detecção de sinais prévios de stress.

Os biomarcadores podem atuar como indicadores de exposição, os quais representam qualquer alteração biológica mensurável que evidencie a exposição dos organismos a um contaminante específico ou agente estressor. Deste modo, os biomarcadores podem ser classificados de acordo com os parâmetros analisados, sendo dois os principais em estudos de qualidade

ambiental. Os *Biomarcadores de Exposição*, que consistem na detecção de substâncias exógenas e/ou seus metabólitos, bem como na detecção de produtos resultantes da interação de um xenobiótico com moléculas-alvo no organismo e; os *Biomarcadores de Efeito*, os quais são caracterizados por medidas bioquímicas, fisiológicas ou alterações de componentes de um organismo (i.e. tecidos, fluidos corporais), associadas ao comprometimento do estado de saúde. Estes também são conhecidos como biomarcadores não específicos, já que inúmeros fatores podem afetar o parâmetro analisado (Mayer *et al.*, 1992; Zanette *et al.*, 2006). Cabe o registro de um terceiro tipo, os Biomarcadores de Susceptibilidade, que correspondem à capacidade inerente ou adquirida de um organismo em responder a exposição à xenobióticos, os quais incluem fatores genéticos e danos nos receptores, alterando a sensibilidade do organismo (NRC, 1987; WHO, 2001).

Enzimas relacionadas ao sistema de defesa dos organismos representam importantes biomarcadores como linhas de evidência da qualidade ambiental. Em relação aos xenobióticos orgânicos geralmente são avaliadas respostas bioquímicas através do monitoramento da atividade enzimática de duas vias de detoxificação. A primeira via é chama de Fase I, que consiste na biotransformação dos contaminantes catalisada, principalmente, pelo sistema oxigenase de função mista (MFO). As MFO atuam nas reações oxidativas de xenobióticos, dentro das quais está o complexo multienzimático denominado Citocromo P450 (CYP), largamente estudado em diversos organismos aquáticos (Stegeman e Livingstone, 1998; Van der Oost *et al.*, 2003). Por conseguinte, a segunda via é a Fase II, na qual ocorre a conjugação de compostos modificados na Fase I, o que facilita sua dissolução em meio aquoso para viabilizar sua excreção (Schlenk *et al.*, 2008).

Em determinadas circunstâncias os mecanismos de defesa podem ser sobrepostos pelos mecanismos pró-oxidantes, devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em quantidade superior à capacidade do organismo realizar sua depuração. Deste modo, o estresse oxidativo pode induzir efeitos como a inativação enzimática, a peroxidação lipídica e danos em DNA (Cheung *et al.*, 2001). Na peroxidação lipídica podem ocorrer modificações estruturais e de comportamento químico das membranas celulares e de organelas devido ao comprometimento dos ácidos graxos poliinsaturados presentes nestas

estruturas (Janero, 1990; Di Giulio e Meyer, 2008). Além dos danos celulares promovidos pelo estresse oxidativo, os contaminantes podem comprometer a integridade do DNA. Alteração na estabilidade das fitas da molécula de DNA pode causar sua quebra (*strand breaks*) ocasionando efeitos genotóxicos e, na ausência de mecanismos de reparos, podem ocasionar apoptose (Everaarts, 1995; Cory e Adams, 2002).

A expressão de enzimas antioxidantes e de resposta ao estresse oxidativo ocasionado pela contaminação ambiental é bem estudada em diversos organismos marinhos ou estuarinos. Estes mecanismos representam potentes biomarcadores para o monitoramento de organismos, vertebrados ou invertebrados, em áreas sujeitas à contaminação, inclusive por metais. Estes biomarcadores são determinados por análises de processos bioquímicos, os quais podem identificar a atividade enzimática, e quantificar as proteínas envolvidas na quelação dos metais, como Metalotioneínas (homeostase de metais no interior das células), bem como os tióis não proteicos reduzidos (GSH). Dentre as enzimas, podem ser utilizadas como biomarcadores a resposta daquelas apresentadas anteriormente (tópico 1.1.1 Espécies Reativas de Oxigênio induzidas por metais) SOD, TPx, Cat, GPx e GR. Além disso, a avaliação da atividade glutathione S-transferase (GST), que participa dos mecanismos de conjugação de compostos modificados com a glutathione reduzida, tem sido usada recentemente como biomarcadores de exposição a metais (Liu *et al.*, 2001). Adicionalmente, inibição de enzimas como a acetilcolinesterase (AChE), identificação de peroxidação lipídica (LPO) e danos em DNA (quebra das fitas) (Hartwig, 1995) também são empregados como biomarcadores de efeito a estes contaminantes (Roméo e Gnassia-Barelli, 1997; Hartwig e Schwerdtle, 2002; Vieira *et al.*, 2009).

1.2.5 Uso de Bivalves em Estudos de Biomonitoramento

Segundo Matthews *et al.* (1992), biomonitoramento é o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antrópicas. Dentre os organismos utilizados em estudos de monitoramento ambiental, os bivalves têm se destacado nas últimas décadas, sendo considerados organismos sentinela. Estes animais apresentam características altamente desejáveis em estudos

ecotoxicológicos, como hábito sésil e filtrador, o que favorece a bioacumulação de poluentes orgânicos e metais (Rittschof e McClellan-Green, 2005). Deste modo, a natureza sedentária, o conhecimento sobre sua biologia e sensibilidade a diversas classes de contaminantes resultou no desenvolvimento de programas internacionais de monitoramento como o “*International Mussel Watch*”, que utiliza os bivalves filtradores na avaliação da qualidade dos ambientes aquáticos (NOAA, 1995).

Apesar do enorme conjunto de dados disponíveis sobre os níveis de contaminantes nos bivalves em todo o mundo, há pouca informação sobre contaminantes e/ou respostas bioquímicas em bivalves na costa brasileira. Entretanto, na última década, estudos têm demonstrado o potencial de algumas espécies de mexilhões de nativos em estudos com biomarcadores, como os mitílídeos *Perna perna* (Almeida *et al.* 2007; Pereira *et al.*, 2007a; 2014), *Mytella guyanensis* (Torres *et al.*, 2002) e *Mytella falcata* (David, 2007). Esses trabalhos enumeraram uma série de biomarcadores que foram aplicados com sucesso nesses animais, dentre eles, marcadores moleculares, citológicos, histológicos e fisiológicos, o que mostra a versatilidade e amplitude de informações que os bivalves podem fornecer.

1.2.6 Avaliação de Risco Ecológico

A Avaliação de Risco Ecológico (ARE) é um processo que avalia a probabilidade de efeitos ecológicos poderem ocorrer ou estarem ocorrendo como resultado da exposição a um ou mais agentes estressores (USEPA, 1992). As ARE tem por finalidade determinar impactos ecológicos causados pelas atividades antrópicas, sendo estas um fator de estresse ambiental e que podem induzir efeitos adversos sobre os organismos, populações, comunidades ou ecossistemas (USEPA, 1998). Assim, a ARE concentra-se em avaliar os efeitos adversos gerados, envolvendo a avaliação de estressores ou aspectos químicos, físicos e biológicos (Campos *et al.*, 2016).

Normalmente, as ARE são conduzidas como uma abordagem escalonada, pois o processo de avaliação oferece mais informações e contribui para decisões científicas e legislativas. Deste modo, a ARE identifica os agentes estressores, suas origens e suas interações com as variáveis ecológicas, sendo também usada para avaliar os efeitos ecológicos gerados

por tais estressores (USEPA, 2000). Embora a ARE possa ser utilizada para avaliar os riscos produzidos por diferentes tipos de agentes, ela tem sido usada como ferramenta para avaliar riscos associados com a contaminação de ecossistemas aquáticos (Choueri *et al.*, 2010; Chapman e Anderson, 2005).

As relações causa-efeito entre contaminantes e efeitos biológicos são desafios nos estudos ecotoxicológicos e avaliações de risco ecológico (Walker *et al.*, 2012). Deste modo, para alcançar este objetivo é importante avaliar os efeitos dessa exposição em diferentes níveis de organização biológica (Adams *et al.*, 1989). Segundo Bartell (2006), para reduzir as incertezas quanto à significância das concentrações dos contaminantes, o uso dos biomarcadores como indicadores de efeito em nível de sub-organismo e o seu uso integrado com indicadores em outros níveis de organização como mortalidade e reprodução, fornece subsídios para aperfeiçoar a caracterização dos riscos ecológicos.

Adicionalmente, os riscos ecológicos dependem da natureza dos estressores e de suas interações com os componentes bióticos e abióticos de cada ecossistema. Portanto, cada ARE deve ser conduzida seguindo métodos específicos (Campos *et al.*, 2016). Entretanto, a USEPA (1998) aponta os elementos principais que devem estar sempre presentes em uma avaliação de risco ecológico: (1) caracterização dos estressores - Consiste no levantamento de informações do ambiente subsidiando o objetivo da avaliação e identificando os potenciais agentes estressores, fontes poluidoras e os componentes ecológicos relevantes como alvos em potencial; (2) caracterização da exposição aos estressores - Envolve a definição das formas e pontos de contato dos alvos (organismos, populações e ecossistemas) com os contaminantes e a determinação e caracterização espacial e temporal dos efeitos ecológicos adversos, associados à exposição aos fatores de estresse; e (3) caracterização dos efeitos e risco - Integração de dados e resultados dos critérios anteriores para caracterização e apresentação dos riscos. (USEPA, 1998).

Considerando os pressupostos acima, deve-se reconhecer que, nos sistemas aquáticos, os contaminantes podem permanecer por curtos períodos na coluna d'água, sendo adsorvidas ou associando-se nos sólidos em suspensão, sais e carbono orgânico, e posteriormente precipitando nos

sedimentos de fundo. Assim, o sedimento pode ser considerado o mais adequado compartimento do ecossistema para indicar efetivamente a qualidade ambiental, dada sua capacidade de acumulação ao longo do tempo e, assim, ser o principal destino de substâncias introduzidas no ambiente.

Estudos geoquímicos, no campo ou laboratório, têm mostrado que o sedimento apresenta potencial de formar associações com várias classes de contaminantes (Chapman, 1989) e assim, atuando como um reservatório para estes compostos. Portanto, a avaliação da qualidade dos sedimentos suma importância na avaliação dos riscos ecológicos em estuários. Entretanto, estes ambientes podem apresentar significativa variabilidade sazonal e espacial, bem como processos que podem afetar a biodisponibilidade e toxicidade de contaminantes em sedimentos (Chapman e Wang, 2001). Além disso, alta reatividade dos elementos-traço dissolvidos faz com que eles sejam rapidamente adsorvidos em material particulado em suspensão ao entrar em estuários. Esta influência é mais intensa na zona de turbidez máxima, onde ocorre maior interação entre as partículas em suspensão (Kennish, 1997), o que torna a avaliação da qualidade dos sedimentos ainda mais complexa.

2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E ANTECEDENTES

2.1 Área de Proteção Ambiental de Cananéia-Iguape-Peruíbe e O Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape

Área de Proteção Ambiental (APA) é definida pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) como “Um espaço geográfico claramente definido, reconhecido, consagrado e gerido, por todos os meios eficazes, jurídicos ou outros, a fim de assegurar, em longo prazo, a conservação da natureza, bem como os serviços do ecossistema e os valores culturais a ele associados” (Day *et al.*, 2012). Na zona costeira do Brasil existe uma extensa rede de APA, que formam amplos corredores ecológicos abrangendo áreas terrestres, estuarinas e marinhas. A Área de Proteção Ambiental de Cananéia-Iguape-Peruíbe (APA-CIP) está inserida neste sistema, tendo sido criada em 1984, pelo decreto nº 90.347, que abrange os municípios de Cananéia, Iguape, Peruíbe, Itariri, Pedro de Toledo e Miracatu (IBAMA/SMA-SP, 1996).

Na APA-CIP encontra-se Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape (figura 2), parte da região conhecida como Lagamar, que integra a Reserva da Biofera da Mata Atlântica, assim reconhecida pela UNESCO em 1991 (Lino *et al.*, 2011). Desde 2000, a região faz parte da lista de sítios declarados pela UNESCO como "Patrimônio Mundial" (Abdulla *et al.*, 2013). Adicionalmente, a APA-CIP é considerada uma área prioritária para futura inclusão na lista brasileira de zonas úmidas de importância internacional, no escopo da Convenção de Ramsar (Brasil, 2012).

O Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape (CELCI), localizado no litoral sul da costa do estado de São Paulo, compreende os municípios de Iguape, Ilha Comprida, e Cananéia, aí incluída também a Ilha do Cardoso. Com 100 km de extensão e uma área aproximada de 200 km², este complexo está assentado sobre uma planície costeira arenosa e possui um conjunto intrincado de canais estuarinos e lagunares (figura 2). O CELCI foi formado em cinco etapas de transgressão e regressão ao longo de 120.000 anos (Suguio e Martin, 1978). A configuração atual foi obtida há cerca de 5.100 anos, quando o nível médio do mar era 4 metros acima do atual e começou a regredir, formando o atual sistema de canais (Suguio *et al.*, 1988).

Figura 2: Área de Proteção Ambiental de Cananéia-Iguape-Peruíbe (APA-CIP) e Visão geral do Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape (CELCI).

2.1.1 Clima

O clima da região do Lagamar é classificado como subtropical úmido (Cfa), sendo a média anual de temperatura de 21,2°C e umidade relativa do ar em torno de 88%. No período entre primavera e verão as massas de ar tropical prevalecem, enquanto que no outono e no inverno o predomínio é de massas polares (Schaeffer-Novelli *et al.*, 1990). A precipitação anual média excede 2.200 mm, com os maiores índices registrados de janeiro a março (média mensal de 266,9 mm) e mínima em julho e agosto (média de 95,3 mm) (Mishima *et al.*, 1986; Silva, 1989).

2.1.2 Hidrografia e dinâmica hidrológica

Os ciclos de maré associados às descargas dos rios e à precipitação atmosférica causam uma variação na amplitude da salinidade ao longo do CELCI. O Rio Ribeira de Iguape (RRI) é o principal curso de água doce com influência mais significativa na salinidade das águas lagunares e também recebe a contribuição de uma vasta rede de rios menores. Os principais rios são Cordeiro (setor norte) Taquari, Minas e Itapitanguí (setor sul), contribuindo com uma descarga média anual de $43 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (Bonetti-Filho e Miranda, 1997). Com a abertura de um canal artificial (Canal do Valo Grande, apresentado adiante) o aporte ao fluvial passou a ser determinado, basicamente, pela bacia do RRI, cuja descarga é cerca de 10 vezes superior (média anual $418.17 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). A vazão do RRI responde sincronicamente à variação pluviométrica, sendo mínima em junho, com média de $218 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, e triplicando no período chuvoso, com média de $634 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (DAEE, 2015).

O estuário está conectado com o oceano ao norte pela Barra de Icapara, pela Barra de Cananéia ao sul e pela Barra do Ararapira entre a Ilha do Cardoso e o estado do Paraná (figura 2). O gradiente longitudinal de densidade da água e a descarga fluvial são as principais forçantes da circulação estacionária no CELCI, as quais são determinadas, predominantemente, pelas marés (Myao e Harari, 1989) e, em menor escala pelos ventos (Miranda *et al.*, 1995). As marés no estuário são semi-diurnas, com inequidades diurnas e amplitudes máximas de 1,25 m (Bernardes e Miranda, 2001).

O gradiente médio anual de salinidade ao longo do CELCI possui mesma estrutura espacial tanto nas áreas marginais dos corpos hídricos (definido, aproximadamente, entre 0 e 2 m) quanto no fundo ($> 2 \text{ m}$). Este gradiente inicia-se na abertura do Valo Grande e segue para as barras de Icapara e de Cananéia, ramificando-se em dois canais entre a Ilha de Cananéia. Estes canais são conhecidos como Mar de Cubatão e Mar de Cananéia. A baía do Trapandé faz ligação do Mar de Cananéia ao oceano Atlântico entre a Ilha Comprida e Ilha do Cardoso (Barra de Cananéia), sendo a zona de maior influência marinha no estuário. Nesta porção a salinidade média no verão é de 28 e >30 no inverno. Apesar de evidências indicarem relativa

persistência sazonal na cunha salina da baía (Miyao *et al.*, 1986), pulsos episódicos de descarga continental podem provocar sua retração à jusante (Mahiques *et al.*, 2009; Conti *et al.*, 2012). Exposição à ondulação e ação das correntes de maré são maiores na foz do que na área interna da baía, onde as velocidades médias das correntes de maré enchente e vazante atingem 2 m s^{-1} e 1 m s^{-1} , respectivamente (Tessler e Souza, 1998; Conti *et al.*, 2012).

Os canais principais do CELCI são conhecidos como Mar Pequeno, Mar de Cubatão e Mar de Cananéia. O Mar Pequeno é delimitado pela barra de Icapara e pela confluência entre os três canais no meio do estuário. Nele encontra-se a abertura do Canal do Valo Grande. O encontro das ondas de maré ocorre na região da Pedra do Tombo, localizada na região central deste corpo hídrico (Miyao *et al.*, 1986). A maré entra no sistema com uma defasagem de 40 minutos entre as duas barras, que posteriormente propaga-se ao longo dos canais (Miyao e Harari, 1989; Miyao *et al.*, 1986). A coluna d'água entre a confluência dos três canais e o Valo Grande é mais homogênea do que o setor sul (Miyao *et al.*, 1986). Entre o Valo Grande e a barra de Icapara é caracterizado por um abrupto gradiente salino e forte hidrodinamismo devido à proximidade com o oceano (Barrera-Alba *et al.*, 2007).

O Mar de Cubatão se estende do norte da baía do Trapandé até a confluência entre os três canais na extensão mediana do estuário. A profundidade média é de 5 m, com máximos de 10 m na conexão com a baía do Trapandé (Tessler e Furtado, 1983; Tessler e Souza, 1998). Caracteriza-se como um canal polihalino, cuja salinidade média é de aproximadamente 21,3. A descarga dos rios Taquari, Mandira, das Minas, Itapitanguí faz com que exista uma evidente estratificação, sendo atenuada gradualmente em direção ao Mar Pequeno. As velocidades das correntes de marés variam entre $0,7$ a $1,0 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Miyao e Harari, 1989).

O Mar de Cananéia é delimitado pelo Mar Pequeno e pela porção sul da baía do Trapandé, apresentando profundidade média de 6 m. Neste corpo hídrico é identificado um aumento gradual da profundidade do Mar Pequeno à baía do Trapandé, onde pode atingir 15 m (Tessler e Souza, 1998; Bernardes e Miranda, 2001). Segundo Miyao *et al.* (1986), a estrutura vertical de salinidade do Mar de Cananéia sofreu alteração após da abertura do Canal do Valo Grande, sendo classificado como parcialmente misturado e fracamente

estratificado. A salinidade média é de aproximadamente 22,5, sendo classificado como um canal polihalino.

O comportamento desigual da onda de maré provoca correntes de indução em sentidos opostos entre o Mar de Cananéia e de Cubatão, com variação de velocidade entre 0,8 a 1,0 m² s⁻¹ (Miyao *et al.*, 1986). Esta característica leva a implicações importantes na distribuição e deposição de materiais.

2.1.3 Produtividade Biológica

A disposição das baías e desembocaduras de rios dentro do CELCI proporciona grande concentração de nutrientes, o que permite elevada produtividade primária (Tundisi e Matsumura-Tundisi, 2001), essencial para a manutenção das cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos. O aporte de nutrientes (matéria orgânica particulada e dissolvida, bem como compostos inorgânicos) é proveniente, sobretudo dos manguezais (Schaeffer-Novelli *et al.*, 1990). A produção fitoplanctônica é uma importante fonte de carbono particulado, principalmente durante o verão chuvoso (Tundisi e Matsumura-Tundisi, 2001). Por esta razão o CELCI é um importante estuário em termos de produtividade primária (Kelleher *et al.*, 1995; Costa-Neto *et al.*, 1997).

Adicionalmente, as taxas de produção secundária do zooplâncton e zoobentos exibem claras variações sazonais influenciadas principalmente pela interação entre águas costeiras e elevada concentração de nutrientes e matéria orgânica das águas estuarinas (Ara, 2004). Os canais estão cercados por abundante vegetação de mangue, servindo de berçário para as espécies marinhas economicamente importantes e abrigam uma diversidade de espécies exploradas comercialmente. (Mendonça e Katsuragawa, 2001; Mendonça e Miranda, 2008). Portanto, além de sua indiscutível função ecológica, o CELCI apresenta importante função socioeconômica e cultural (Costa-Neto *et al.*, 1997; Barcellini *et al.*, 2013).

2.1.4 Aspectos socioambientais

Os indicadores de renda familiar e nível de escolaridade são relativamente baixos, bem como o produto interno bruto municipal das três cidades que fazem parte do CELCI (Cananéia, Iguape e Ilha Comprida). A

economia da região é baseada principalmente na pesca, turismo, cultivo e extração de ostras, bem como pequenas propriedades com agricultura de subsistência (Mendonça e Katsuragawa, 2001). Além disso, essa região atualmente é a que está mais distante da implementação de um plano de Gerenciamento Costeiro no estado de São Paulo, carecendo de estudos que abordem esse tema (Morais e Abessa, 2014).

A densidade demográfica dos municípios que compreendem o CELCI é baixa quando comparada com o restante do litoral do Estado de São Paulo. De acordo com Moraes e Abessa (2014), essa situação também decorre do fato de Iguape e Cananéia possuírem as maiores áreas territoriais do litoral paulista. Entretanto, devido aos seus atrativos turísticos, as cidades do CELCI sofrem uma variação sazonal de suas populações em períodos de dois a três meses ao ano, porém não existem dados oficiais disponíveis sobre esta flutuação.

Em regiões onde há o aumento considerável da população ocorre também um aumento na geração de resíduos e aporte de efluentes urbanos para os corpos hídricos. Cabe ressaltar que até 2009 os resíduos sólidos dos municípios não tinham uma destinação adequada e a partir desse ano passaram a ser enviados a aterros situados em outros municípios (CETESB, 2010a). Além disso, os sistemas de saneamento e de saúde pública não são adequados e um número relevante de habitações não é atendido pelo sistema de coleta de esgotos (Morais e Abessa, 2014).

2.1.5 Impactos Ambientais sobre o CELCI

2.1.5.1 A Abertura do Canal do Valo Grande

A foz natural do Rio Ribeira de Iguape (RRI) situa-se dentro da APA-CIP, ao norte do CELCI. O RRI possui 470 km de comprimento entre a sua nascente no Estado do Paraná (Serra de Paranapiacaba) até o desaguar no Oceano Atlântico, no Estado de São Paulo (Município de Iguape). Com uma área de aproximadamente 25.000 km² a Bacia Hidrográfica do RRI encontra-se distribuída basicamente entre o Planalto Atlântico e a Província Costeira. Esta região exhibe extensas áreas de relevo serrano, sendo caracterizada por declividades e várzeas encaixadas, além de apresentar planícies costeiras, terraços marinhos e fluviais (SIG-RB, 2012).

O RRI é o principal contribuinte de sedimentos em suspensão, nutrientes e contaminantes para o CELCI (Barcellos *et al.*, 2009). De acordo com Mahiques *et al.* (2013), o CELCI sofreu mudanças ambientais significativas nos últimos 150 anos, devido à construção de um canal artificial de 4 km, ligando o Rio Ribeira de Iguape ao interior do estuário. A obra que foi iniciada em 1827 e concluída em 1852, teve como objetivo diminuir os custos com transporte de produtos agrícolas até o principal porto de exportação da região localizado no município de Iguape. Quando foi construído, o canal era chamado de Valo do Rocio, porém, décadas depois de sua abertura passou a ser conhecido como Valo Grande, devido às dimensões que o canal adquiriu. Originalmente o canal apresentava 4,4 m de largura e 2 m de profundidade, transcorridos mais de 150 anos de existência, a largura passou a ser de aproximadamente 300 m, e em alguns locais a profundidade pode atingir 7 m.

O canal do Valo Grande foi fechado em 1978, com o intuito de minimizar as perdas financeiras para a agricultura nas áreas localizadas a montante do RRI. No entanto, durante um grande evento de El Niño em 1983, a barragem construída com pedras e areia foi destruída devido às grandes inundações. A planície costeira, onde o canal foi escavado, sofreu um processo de erosão, levando ao assoreamento das áreas portuárias de Iguape e deposição de sedimentos nas áreas lagunares adjacentes. Além disso, cerca de 70% do fluxo principal do Ribeira foi transferido para o CELCI, levando à diminuição da salinidade (Mahiques *et al.*, 2013). Na cidade de Cananéia, por exemplo, localizada a 60 km ao sul da foz do canal, pode ser encontrada salinidade zero durante o verão (Mahiques *et al.*, 2009).

Há evidências de que a alteração de salinidade afetou a biota local após a abertura do Canal do Valo Grande, com registros para a ictiofauna (Barcellini *et al.*, 2013), fitoplâncton (Kutner e Aidar-Aragão, 1986), foraminíferos (Mahiques *et al.*, 2009) e halófitas (Schaeffer-Novelli *et al.*, 1990; Cunha-Lignon *et al.*, 2011). De acordo com Martinez *et al.* (2013), uma mudança brusca na composição geral da fauna de moluscos do CELCI ocorreu após a abertura deste canal. Nesse trabalho, os autores avaliaram a composição faunística em testemunhos sedimentares abrangendo um período de quase dois séculos e constataram que outra mudança ocorreu por volta de 1977 ± 1 ano. Nesse período, foi observada uma diminuição na mortandade de

moluscos, provavelmente, uma consequência do fechamento do canal artificial. Cinco anos mais tarde houve a ruptura da barragem e o registro sedimentar deste período evidenciou assembleias de moluscos mortos. Os autores concluíram que os registros de mortandade de moluscos coincidentes com as aberturas do canal são reflexos do aporte de água doce e contaminantes.

O impacto pelo aporte do RRI é maior no trecho do Mar Pequeno, que apresenta maior persistência de condições atípicas de baixa salinidade; maior desestruturação física dos habitats; substituição dos manguezais por macrófitas dulcícolas e pela redução generalizada na profundidade pelo intenso assoreamento (Cunha-Lignon *et al.*, 2009; Cunha-Lignon *et al.*, 2011; Mahiques *et al.*, 2013). De acordo com Saito *et al.* (2001a), a taxa de deposição de sedimento neste trecho é em torno de $0,5 \text{ cm ano}^{-1}$. Portanto, o Valo Grande afetou de forma inequívoca os padrões de sedimentação e as características físico-químicas do estuário, havendo elevada exportação de silte e argila do RRI ao setor sul do CELCI (Bercellos *et al.*, 2009). Mais drasticamente, passou a direcionar metais oriundos das áreas de mineração do Vale do Rio Ribeira de Iguape para o interior do CELCI, conforme descrito a seguir.

2.1.5.2 O Vale do Rio Ribeira de Iguape e o Histórico de Contaminação por Metais

A região do vale do Rio Ribeira de Iguape (Vale do Ribeira) possui uma área de aproximadamente 28.000 km^2 , sendo que 39% da área estão na região nordeste do Estado do Paraná e 61% no sudoeste do Estado de São Paulo, onde ocupa aproximadamente 17.000 km^2 (Theodorovicz e Theodorovicz, 2007). O Vale do Ribeira concentra o maior remanescente de Mata Atlântica contínua do país, sendo que dos 7% restantes deste bioma em território nacional, 21% estão na área. Por este motivo, em 1999 a região foi considerada pela UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e a Cultura), como Patrimônio Natural da Humanidade e cerca de 50% do Vale do Ribeira constitui-se como Área Proteção Ambiental (Santos e Tatto, 2008).

O Vale do Ribeira é uma região pouco desenvolvida do ponto de vista socioeconômico, apresentando o menor índice de desenvolvimento humano do Estado de São Paulo. Entretanto, devido a sua peculiar geologia, o Vale do Rio

Ribeira foi uma das regiões mais importantes para o Brasil em termos geoquímicos (Morgental *et al.*, 1975). A mineração no curso superior do rio (Alto Vale do Ribeira) teve início no século XVII com a mineração manual de ouro e prata. Em 1945, teve início a exploração de chumbo em escala industrial e, secundariamente durante a fundição, o zinco associado (Lopes Jr., 2007).

As atividades de mineração são reconhecidas como altamente impactantes, devido à geração de resíduos tóxicos e drenagens ácidas ou alcalinas provenientes da extração e do beneficiamento dos minérios (Benedicto *et al.*, 2008; Besser *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014). Além disso, o descarte inadequado desses resíduos no ambiente pode provocar contaminação do solo, das águas subterrâneas e superficiais (Corsi e Landim, 2003; Riba *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2012). Segundo Guimarães e Sígolo (2008a), os resíduos da mineração constituem fontes de contaminação primárias para o RIR, na forma de rejeitos do processamento de minério, bem como dos resíduos metalúrgicos (escórias).

A exploração de chumbo no Vale do Ribeira foi encerrada em 1995, devido ao esgotamento das reservas, dificuldades tecnológicas e fatores econômicos e ambientais. Entretanto, os resíduos de duas das principais minas que operavam na região (Rocha e Panelas) permanecem depositados ao longo das margens do Rio Ribeira e de um de seus afluentes (figura 3). Os rejeitos da mina do Rocha foram depositados próximo do Ribeirão Rocha, apresentando um volume de aproximadamente 3.000 m³. O volume de resíduos proveniente de Panelas (Plumbum S/A) é de aproximadamente 89.000 m³ (Franchi, 2004) e ainda podem ser encontrados próximos à margem direita do RRI. Estes materiais podem ser lixiviados e até mesmo erodidos para dentro do rio (Abessa, *et al.*, 2014).

Figura 3: Vale do Rio Ribeira de Iguape mostrando os locais em que os resíduos de mineração foram depositados.

Um aspecto que deve ser ressaltado é que o rejeito concentrado, proveniente de atividades metalúrgicas realizadas pela empresa Plumbum S/A, foi despejado diretamente no leito do RRI por mais de 40 anos. Em 1991, o despejo direto foi interrompido e o material tóxico passou a ser depositado juntamente com rejeitos das minas nas margens do RRI, totalizando pelo menos 200.000 m³ (Franchi, 2004). Estes resíduos apresentam em sua composição alumínio (Al), arsênio (As), bário (Ba), cálcio (Ca), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), níquel (Ni), manganês (Mn), magnésio (Mg), sódio (Na), chumbo (Pb), silício (Si) e zinco (Zn) (Guimarães e Sígolo, 2008a; Abessa *et al.*, 2014). A disposição destes materiais no solo foi realizada sem nenhum tratamento e, aparentemente, sem qualquer preocupação com a contaminação, de tal forma que, concentrações significativas de metais foram encontradas no RRI após 1995.

Em estudos realizados durante o período das atividades de mineração e de beneficiamento do minério, foram constatados altos teores de Pb nas águas e sedimentos do Rio Ribeira de Iguape e de seus afluentes. Como exemplo, Eysink *et al.* (1988) reportaram que o Ribeirão do Rocha chegou a

apresentar $2.750 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb em água e $1.440 \mu\text{g g}^{-1}$ em sedimento. No RRI, os autores encontraram altos níveis de Pb em sedimentos, chegando a $4.000 \mu\text{g g}^{-1}$. Além disso, foram encontrados níveis de Pb acima de $500 \mu\text{g g}^{-1}$ em sete das doze estações de amostragem que este estudo avaliou ao longo do rio. Os mesmos autores apontaram altos níveis de Pb, Zn e Cu nos sedimentos ao longo do leito do RRI, com um predomínio maior nas proximidades das áreas de mineração. Nesta época, os sedimentos coletados próximos das mineradoras apresentavam valores na ordem de $10^2 - 10^3 \mu\text{g g}^{-1}$, enquanto que esta variação era de 10 a $10^2 \mu\text{g g}^{-1}$ próximo ao estuário (Eysink *et al.*, 1987; Eysink *et al.*, 1988). Em outro estudo, Eysink *et al.* (1991) reportaram concentrações de Pb em sedimentos do RRI entre 105 a $358 \mu\text{g g}^{-1}$.

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) publicou um documento sobre a avaliação da qualidade do rio Ribeira de Iguape e afluentes, com base em dados obtidos em 1998, reportando concentrações de chumbo entre $41,7 \mu\text{g g}^{-1}$ e $389 \mu\text{g g}^{-1}$ em sedimentos (CETESB, 2000). A partir de 2002 a CETESB passou a incluir a avaliação da qualidade dos sedimentos no “Programa de Monitoramento de Águas Superficiais do Estado de São Paulo”. Como no Brasil não há um padrão para concentrações de contaminantes em sedimentos, a CETESB utiliza os critérios de qualidade estabelecidos pela legislação canadense (*Canadian Council of Ministers of the Environment* - CCME, 2002). Este guia estabelece dois tipos de valores orientadores para limites de substâncias tóxicas, um para o efeito limiar (ISQG – *Interim Sediment Quality Guidelines*, também conhecido como TEL – *Threshold Effect Level*) e outro, acima do qual, são observados efeitos prováveis (PEL – *Probable Effect Level*). Segundo os relatórios publicados pela agência ambiental de São Paulo, desde que foi iniciado o monitoramento dos sedimentos do RRI, apenas nos anos de 2002 e 2009 os níveis de metais não estiveram acima do ISQG/TEL (CETESB 2003; CETESB, 2010b). Em 2004 e 2006 foram registrados valores acima de PEL para Pb e As, respectivamente. Os metais Al, Mn e Fe sempre estiveram presentes em altas concentrações nos sedimentos do RRI (CETESB, 2005; CETESB, 2007), devido à origem da matriz sedimentar da bacia do rio. Com relação aos ensaios ecotoxicológicos, apenas um ponto é analisado por ano. Até o momento não foi observada

toxicidade aguda para o anfípodo bentônico *Hyalella azteca* (organismo-teste utilizado pela CETESB no monitoramento).

Estudos mais recentes demonstraram que os efeitos da mineração e da metalurgia de Pb ainda se faziam presentes no RRI e seus afluentes (Corsi e Landim, 2002; Moraes *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2005; Guimarães e Sígolo, 2008a). Esses trabalhos apontaram concentrações de metais em sedimentos, em especial o Pb que se apresentou acima dos níveis de concentração de base da região (*background*) propostos por Morgental *et al.* (1978). O valor de *background* proposto foi determinado pela média geométrica dos níveis obtidos em 1292 amostras de sedimentos da bacia hidrográfica do RRI. Segundo os autores, a faixa do teor de Pb antes da ação antrópica é de 12 a 16 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Cunha *et al.* (2005) encontraram concentrações de Pb em até 175,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ sedimentos do RRI e 527,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ em um de seus afluentes (Rio Betari, próximo ao município de Iporanga, SP). Entretanto, os autores observaram diminuição das concentrações de Pb nos sedimentos do RRI e de seus afluentes quando comparados com os resultados de estudos pretéritos (Eysink *et al.*, 1988; Eysink *et al.*, 1991; CETESB, 2000). Lopes Jr. *et al.* (2007), também sugerem uma diminuição nas concentrações de Pb, ao longo do tempo tanto nas águas quanto nos sedimentos do RRI. Além disso, a CETESB (2007) considerou que o Rio Ribeira de Iguape passa por um processo de recuperação ambiental natural, induzido pelas ações de controle impostas pelos órgãos ambientais. De fato, Abessa *et al.* (2012) apontaram ausência de toxicidade aguda sobre o cladóceros *Daphnia similis*. Neste estudo os organismos foram expostos às amostras brutas de água e aos sedimentos (pela interface sedimento-água), coletados em seis pontos amostrais do trecho superior do RRI entre os anos de 2009 e 2010. Moraes *et al.* (2013), analisaram a presença dos metais Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn nas amostras de sedimentos coletadas em 2010 por Abessa *et al.* (2012) e reportaram concentrações abaixo dos limites estabelecidos pela CCME (2002), adotados como orientadores.

Embora a literatura indique que o RRI esteja passando por um processo de recuperação ambiental, estudos recentes apontam a persistência dos metais nos compartimentos abióticos (Guimarães e Sígolo, 2008a; Melo *et al.*, 2012) e na biota (Guimarães e Sígolo, 2008b; Rodrigues *et al.*, 2012).

Portanto, existem registros de que a contaminação ainda não foi totalmente resolvida, o que foi corroborado por estudos relacionados com a liberação dos metais pelos solos da região (Buschle *et al.*, 2010; Kummer *et al.*, 2011).

O processo de recuperação implica no retorno do ecossistema a um estado similar ao observado antes do impacto (Bradshaw, 1997; Garten e Ashwood, 2004). No caso do RRI, tal processo está relacionado com a remoção dos resíduos contaminados por meio da dinâmica hidrológica e por sua diluição, decorrente das características físico-químicas da bacia hidrográfica. As águas do RRI são levemente alcalinas e marcadamente oxidantes (Eh entre 320 e 440 mV), o que favorece a associação dos metais ao material particulado. Este material pode ser facilmente remobilizado para a coluna d'água e transportado à jusante (Corsi e Landim, 2002; Melo *et al.*, 2012). De fato, Guimarães e Sígolo (2008b) ressaltaram que os metais estão migrando ao longo do curso da drenagem do RRI, sendo incorporados ao material em suspensão e biodisponibilizados para moluscos filtradores, como observado para a espécie dulcícola *Corbicula fluminea*.

Moraes *et al.* (2004) utilizaram traçadores isotópico de chumbo para identificar as fontes de metais nos sedimentos do curso baixo do RRI e do CELCI. Os autores concluíram que a contaminação encontrada é oriunda das minas do Alto Vale do Ribeira. Segundo esse estudo, os sedimentos carregados podem representar uma mistura de vários tipos e solos erodidos no Vale do Ribeira, mas as assinaturas isotópicas coincidem com a do minério dos rejeitos descartados às margens do RIR. O trabalho sugere também, que o transporte de Pb e de outros metais associados tenha ocorrido por partículas sólidas do minério, bem como adsorvidas em minerais da fração fina dos sedimentos.

2.1.5.3 *Influências Climáticas no Transporte de sedimentos e Contaminantes para o CELCI*

Conforme demonstrado por vários autores, os metais presentes no Vale do Ribeira podem ser transportados à jusante do RRI (Moraes, 1997; Corsi e Landim, 2002; Guimarães e Sígolo, 2008b; Melo *et al.*, 2012) e assim, alcançar o CELCI (Moraes *et al.*, 2004). Segundo Costa *et al.* (2009), as tempestades desempenham papéis importantes relacionados à remoção superficial de contaminantes ao longo da bacia hidrográfica do RRI. Em

especial, os episódios de tempestades extremas, além de transportar contaminantes, podem produzir significativas mudanças na paisagem e geomorfologia do CELCI. Tais eventos podem mobilizar o solo e sedimentos ao longo da bacia de drenagem e redistribuí-los, intensificando ou iniciando processos erosivos, bem como novas áreas de deposição (Jonasson e Nyberg, 1999; Coppus e Imeson, 2002).

Os impactos geomorfológicos de um evento extremo estão intimamente relacionados a fatores como a erodibilidade do material de origem, topografia, cobertura vegetal e do uso da terra (Bull *et al.*, 2000; Belmonte e Beltrán, 2001). Estudos relataram o aumento do aporte de sedimentos para as bacias hidrográficas devido às tempestades (Jonasson e Nyberg, 1999; Coppus e Imeson, 2002). Além disso, o maior do volume de água aumenta a energia do fluxo, podendo ressuspender as partículas de fundo e incrementar o transporte de sedimentos através da bacia (Morgan *et al.*, 1998).

O regime climático representa o fator principal para regular o equilíbrio hidrológico de bacias hidrográficas, uma vez que controla a quantidade de água que flui para os rios tanto por escoamento superficial quanto pela drenagem subterrânea (Morgan *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004). A vazão do RRI em seu curso baixo varia de 300 a mais de $1.200 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, com a variação no fluxo fortemente influenciada pelo clima subtropical úmido (segundo a classificação de Köppen). A região do Vale do Ribeira apresenta concentração de chuvas no verão, porém, não apresenta estação seca definida. As médias de precipitação pluviométrica anual da região variam em torno de 1.200 a 2.700 mm (SSE/SP, 2010). No entanto, frequentemente a vazão do RRI ultrapassa $2.500 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, já tendo sido registrada em 1999 a marca de $4.250 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ em seu curso baixo (SIG-RB, 2012).

Não são raros os episódios de enchentes na bacia do RRI, já que as condições climáticas da região são altamente favoráveis à ocorrência de chuvas do tipo frontal, de grande intensidade e duração. Adicionalmente, as características morfológicas da bacia também favorecem a ocorrência de grandes cheias. No trecho superior e médio, o RRI e seus afluentes correm por vales encaixados, com uma declividade elevada. No curso inferior, além de receber contribuição de outros rios, o RRI apresenta-se como um rio típico de planície, recortando os terrenos alagadiços de baixada, com declividade muito

baixa. A superposição desses dois fatores constitui a causa básica das cheias de grande magnitude, tanto em termos de vazão de pico como de volume (DAEE, 1998).

Com relação à contaminação ambiental, já foi relatado que o escoamento de águas pluviais pode arrastar uma série de contaminantes depositados no solo ou associado a partículas de sedimentos (Bay *et al.*, 1996; Allert *et al.*, 2009). Estes contaminantes tendem a ser depositados em áreas de baixa energia, como nas várzeas e nos estuários (Du Laing *et al.*, 2009). Nestes locais, as características físico-químicas podem alterar a dinâmica dos metais e, conseqüentemente, a biodisponibilidade causando problemas ambientais nas áreas de deságue (Carr *et al.*, 2000). As enchentes no RRI têm potencial para causar um impacto ainda maior, pois as áreas em que estão resíduos da mineração podem ser erodidas e os contaminantes transportados em grande quantidade de para o CELCI.

Abessa *et al.* (2014) compararam as concentrações de metais nos sedimentos coletados ao longo do RRI em diferentes condições climáticas. As coletas foram realizadas em outubro de 2010, durante um período com baixos índices de precipitação (inferior a 35 mm em 20 dias); em agosto de 2011, após um evento extremo em que foi registrada precipitação acima de 220 mm em 24 horas; em abril de 2012, após um regime moderado de precipitações (aproximadamente 65 mm em sete dias). As concentrações de metais foram maiores nos sedimentos finos coletados após o episódio de chuvas intensas, e a uma distância de aproximadamente 150 km das áreas em que foram depositados os resíduos das atividades de mineração.

Os resultados obtidos por Abessa *et al.* (2014) evidenciaram concentrações de metais muito mais baixas nos sedimentos coletados durante o período de seca, ficando abaixo de TEL (ou ISQG) e PEL, critérios de qualidade adotados como orientadores (CCME, 2002). Tais concentrações estavam até mesmo abaixo dos valores de *background* da região do Vale do Ribeira (Morgental *et al.*, 1978). Após o período de chuvas moderadas, foram verificadas concentrações de Cr e Pb acima do TEL. Já nas amostras coletadas após a enchente de 2011, as concentrações de Cr também excederam o TEL e as de Pb foram superiores ao PEL. Merece destaque o fato

de que em agosto de 2011, o nível do rio chegou a subir 14 metros em 24 horas, sendo a segunda maior inundao da histria da regio (SIG-RB, 2012).

Aps a enchente de 2011, foram coletadas amostras de lama depositadas fora do leito do RRI, aps suas guas terem voltado ao nvel normal. Esta coleta foi realizada a uma distncia de aproximadamente 180 km das antigas reas de minerao. As anlises qumicas evidenciaram nveis de Cu, Pb e Zn acima do TEL (Abessa, 2016). Estes resultados sugerem que as enchentes podem contribuir para um enriquecimento de metais nos sedimentos do CELCI, principalmente pelo transporte e a deposio das fraes granulomtricas mais finas, que potencialmente carregam maiores quantidades de metais.

2.1.6 Presena de Metais no CELCI

Os setores norte e sul do complexo estuarino esto sujeitos a diferentes presses antrpicas e de diversas origens. Na regio norte, os efeitos so causados predominantemente pelas atividades de minerao ocorridas no Alto Vale do Ribeira. Alguns autores sugerem que a presena de uma mina de ouro abandonada prxima poro norte do esturio e uma fbrica de fertilizantes localizada no municpio de Iguape tambm so importantes fontes de metais neste setor (Azevedo *et al.*, 2012a). No setor sul, existe uma grande influncia da rea urbanizada da Ilha de Canania (Cruz *et al.*, 2014). As fontes de metais podem ser diversas, por exemplo, marinas (principalmente tintas anti-incrustantes, resduos de soldagens, e combustveis), postos de abastecimento, esgotos domsticos e drenagem urbana. O aporte de contaminantes pode ter influncia sazonal, uma vez que a regio possui atributos tursticos e a populao sofre flutuaes ao longo do ano (Morais e Abessa, 2014). Esta sazonalidade foi observada por Amorim *et al.* (2008), que apontaram diferenas nas concentraes de elementos trao entre as campanhas de vero e inverno, em sedimentos prximos cidade de Canania. O setor sul tambm pode estar sujeito influncia das atividades de minerao e ser discutido a diante.

As primeiras avaliaes dos nveis de metais nos sedimentos do CELCI foram realizadas na dcada de 1980, durante o perodo das atividades de minerao no Vale do Ribeira. Em meados desta dcada, foram encontradas

concentrações de Pb de até $160 \mu\text{g g}^{-1}$ em sedimentos das áreas internas do estuário (Piva-Bertoletti e Padua, 1986). Eysink *et al.* (1988), reportaram a presença de $82 \mu\text{g g}^{-1}$ de Pb em amostras de sedimentos do estuário próximo à foz natural RRI. Em direção ao setor sul, Tessler *et al.* (1987) estudaram os sedimentos das áreas internas do CELCI e encontraram concentrações de Pb variando de $0,30$ a $247 \mu\text{g g}^{-1}$, além de $1,4$ a $105 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn e $0,05$ a $292 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cu. Segundo esses autores, elevados teores de metais teriam sido transportados com sedimentos finos pelo RRI até o estuário. Em um estudo mais recente, Moraes *et al.* (2004) utilizaram isótopos de Pb e corroboraram os estudos geoquímicos realizados anteriormente, que atribuíram as altas concentrações de metais nos sedimentos do CELCI às atividades de mineração realizadas no Alto Vale do Ribeira.

Estudar o histórico de sedimentação do CELCI é um aspecto particularmente interessante, devido transformações ocasionadas pelo Canal do Valo Grande. Saito *et al.* (2001b) avaliaram geocronologia da sedimentação do CELCI utilizando a datação com ^{210}Pb e constataram grande influência do RRI na deposição de sedimentos. O norte da Ilha de Cananéia, apesar de não receber descarga direta do RRI, recebe grande contribuição dos sedimentos em suspensão do Mar pequeno, oriundos, principalmente, do RRI pelo Valo Grande (Saito *et al.*, 2001a). Já ao sul da Ilha de Cananéia a sedimentação é mais influenciada pelas correntes de maré que podem ressuspender os sedimentos finos provenientes dos rios (Saito *et al.*, 2001b).

A avaliação do perfil sedimentar permite uma visão histórica da entrada de contaminantes em diferentes camadas de sedimentos, o que reflete os valores específicos para determinados períodos (Trefry e Presley, 1976). Em especial para os ambientes costeiros, esta técnica tem sido muito utilizada para avaliar variabilidade temporal de contaminantes (Deely e Fergusson, 1994; Chan *et al.*, 2001; Zourarah *et al.*, 2007; Mahiques *et al.*, 2009; Hosono *et al.*, 2010). Mahiques *et al.* (2013) analisaram o perfil sedimentar nas áreas internas do CELCI e encontraram registro de aporte de metais antropogênicos em um ponto localizado a 20 km da foz Valo Grande (em direção à Ilha de Cananéia). Nesse estudo, pôde ser identificado um registro de 150 anos da entrada de metais de origem antrópica no estuário. Segundo os autores, os níveis mais altos de contaminação ocorreram entre as décadas de 1940 e 1990. Esta

época corresponde ao período em que a mineração era realizada em escala industrial na região do Alto Vale do Ribeira, a cerca de 300 km de distância do Canal do Valo Grande. As concentrações de Pb identificadas em testemunhos coletados próximos à saída do canal já indicaram valores duas vezes maiores do que os encontrados em sedimentos contaminados do estuário de Santos, localizado em uma zona costeira altamente industrializada (Mahiques *et al.*, 2009).

Atualmente altos níveis de Pb continuam a ser identificados na porção norte do CELCI mesmo em sedimentos superficiais. Cruz (2014) encontrou valores superiores a $51 \mu\text{g g}^{-1}$ no Mar Pequeno. Esta contaminação é preocupante quando comparada aos valores orientadores propostos pela CCME (2002), sendo o ISQG (TEL) definido em $30,2 \mu\text{g g}^{-1}$ para sedimentos costeiros. Estes níveis são semelhantes aos encontrados em áreas com alto grau de degradação, como o Sistema Estuarino de Santos - São Vicente (Abessa *et al.*, 2008) e Baía de Aratu (Estado da Bahia) (Onofre *et al.*, 2007).

Na porção sul do CELCI, Amorim *et al.* (2008) coletaram sedimentos no entorno da Ilha de Cananéia e avaliaram os teores dos metais Cr, Hg, Zn e do metaloide As, os quais foram comparados com os valores orientadores propostos pela CCME (2002). Em geral, a maioria das amostras apresentou elementos traço com valores abaixo do ISQG. Entretanto, dois pontos (um no Mar de Cananéia e outro ao sul da ilha, na baía de Trapandé) apresentaram altas concentrações de As e Cr, excedendo os valores de ISQG.

Em outro estudo realizado no entorno da Ilha de Cananéia, Aguiar *et al.* (2008) encontraram altas concentrações de Pb ($19 - 56 \mu\text{g g}^{-1}$), Cd ($4 - 6,1 \mu\text{g g}^{-1}$) e Cr ($35 - 280 \mu\text{g g}^{-1}$). Os mais altos teores de Pb foram correspondentes aos sedimentos com maiores frações de silte e argila, provenientes da drenagem continental. A maior concentração de Pb ($56 \mu\text{g g}^{-1}$) foi encontrada ao norte da Ilha de Cananéia, no ponto amostral localizado na conexão entre o Mar de Cananéia e o Mar Pequeno, evidenciando influência do RRI. Nesse estudo, os autores encontraram altos níveis de Cd, com o valor máximo de $6,1 \mu\text{g g}^{-1}$ encontrado no Mar de Cubatão. Além disso, os níveis de Cr obtidos também foram elevados, chegando a $280 \mu\text{g g}^{-1}$ no Mar de Cananéia (parte norte). Os autores utilizaram como base os valores de abundância média dos elementos nas grandes unidades de crosta lítica da Terra (padrão do folhelho)

(Turekian e Wedepohl, 1961). Com base neste padrão, os valores máximos encontrados para Pb, Cd e Cr. ultrapassam as médias do folhelho ($20 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ e $90 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) com destaque para o concentrações de Cd encontradas no Mar de Cananéia, que foram até 12 vezes superiores ao padrão do folhelho.

Embora Aguiar *et al.* (2008) tenham encontrado níveis de Cd extremamente elevados no Mar de Cananéia, o mesmo não se refletiu no Mar de Cubatão em estudo realizado por Barros e Barbieri (2012). Os autores reportaram ausência deste metal em sedimentos superficiais, e as concentrações de Pb, Cu e Zn foram inferiores a dos trabalhos supracitados (valores apresentados na seção Resultados: “Caracterização dos Agentes Estressores”). Estas diferenças podem ser devido às metodologias analíticas de cada estudo, especialmente em função da extração ácida utilizada na digestão da matriz sedimentar. Não obstante, os autores apontam a predominância de Pb em 75% das amostras avaliadas e é importante destacar que este é o principal elemento relacionado a atividades de mineração na bacia do RIR.

Neste contexto, é importante investigar o grau dos efeitos relacionados ao aporte de metais ao Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape utilizando diferentes linhas de evidência. Estes contaminantes podem atingir o setor o setor sul do estuário associado às partículas finas oriundas do Rio Ribeira de Iguape. Portanto, é de extrema importância estudar de forma integrada a qualidade ambiental dos sedimentos das áreas de deposição e os riscos associados.

3 HIPÓTESES

O histórico de contaminação por metais no Vale do Rio Ribeira de Iguape é bem conhecido, com evidências de transporte destes contaminantes ao Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape (CELCI), principalmente associados aos finos. Assim sendo, a hipótese avaliada no presente estudo é que o setor sul do CELCI recebe aportes de metais provenientes do Rio Ribeira de Iguape, principalmente na zona de turbidez máxima do Mar de Cananéia, estando sujeito à acumulação nos sedimentos. Além disso, uma vez associados aos finos, os metais podem produzir efeitos adversos sobre espécies de hábito filtrador, bem como bioacumular nestes organismos. Portanto, bivalves residentes nos sedimentos estuarinos podem ser importantes indicadores da qualidade ambiental da área de estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os riscos ecológicos no setor sul do Complexo-Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape (CELCI) relacionados à contaminação por metais em sedimentos de manguezais, utilizando múltiplas linhas de evidência.

4.2 Objetivos Específicos

Caracterização dos agentes estressores:

Levantamento de dados secundários para identificar e caracterizar as fontes de contaminação por metais para o CELCI e a presença destes contaminantes nos sedimentos;

Caracterização da exposição e efeitos ao agente estressor:

Bioacumulação: Verificar a existência de transferência dos contaminantes do ambiente para os organismos, através das determinações dos níveis de metais nos tecidos vivos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea* sp.;

Abordagem Ecotoxicológica: (I) Avaliar a qualidade dos sedimentos do setor sul do CELCI mediante ensaios de toxicidade aguda em sedimento integral com o anfípodo escavador *Tiburonella viscana* e; (II) relacionar a toxicidade com a concentração de metais nos sedimentos mediante ao método SEM/AVS.

Abordagem bioquímica: Identificar efeitos subletais sobre os bivalves coletados no Mar de Cananéia utilizando biomarcadores bioquímicos em brânquias de mexilhões do gênero *Mytella* – expressão de enzimas encarregadas de (I) imobilizar e eliminar os contaminantes; (II) expressão de enzimas responsáveis pelo combate aos radicais livres formados a partir de reações de bioativação e conjugação; (III) identificação de peroxidação lipídica e danos em DNA;

- **Análise de Risco Ecológico:** Integração dos dados de contaminação, toxicidade e do conjunto de biomarcadores bioquímicos a fim de estimar efeitos ecológicos decorrentes da exposição aos contaminantes. Estabelecer possíveis relações entre as fontes de estresse ambiental e os potenciais receptores.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Modelos biológicos

As principais espécies de mexilhões estuarinos com ocorrência no CELCI são *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819), conhecida como bico de ouro e *M. falcata* (d'Orbigny, 1846), descrita originalmente como *M. charruana* popularmente conhecida como sururu. Estes animais são considerados adultos quando atingem tamanho superior a 20 mm para *M. guyanensis* e 10 mm para *M. falcata* e (Nascimento, 1968; Cruz e Villalobos, 1993), podendo atingir 80 mm e 50 mm, respectivamente (Boffi, 1979). No CELCI as comunidades tradicionais que praticam a extração destes animais comercializam *M. guyanensis* com tamanho superior a 40 mm e *M. falcata* com tamanho superior a 30 mm, tamanhos inferiores são considerados com baixo rendimento de carne (Pereira *et al.*, 2003). Assim no presente estudo os animais só foram coletados acima destas faixas de tamanhos.

Pereira *et al.* (2003) estimaram a distribuição dos bancos naturais destes organismos no estuário de Cananéia e constataram alta densidade das duas espécies, porém, distribuídos em bancos distintos. Segundo os autores, *M. guyanensis* ocorre na zona entremarés, majoritariamente debaixo de árvores de mangue, com uma menor distribuição junto à vegetação *Spartina* sp. A ocorrência de *M. falcata* estaria restrita à zona entremarés, apenas debaixo dos manguezais, porém, no presente estudo também foi encontrada esta espécie junto à vegetação *Spartina* sp.

Em um levantamento realizado em todo o sistema estuarino, Pereira *et al.*, (2007b) apontaram um declínio das populações de *M. falcata* ao longo dos anos. Naquele estudo, embora tenha havido grande densidade de *M. guyanensis*, o número de indivíduos da espécie *M. falcata* foi considerado desprezível (apenas 23 indivíduos) numa extensão de 90 km. No entanto, no presente estudo esta espécie foi encontrada na maioria dos pontos amostrais, havendo variações sazonais para as duas espécies estudadas.

5.2 Protocolo Amostral

Com o intuito de verificar possíveis variações sazonais, as coletas de sedimentos e bivalves ocorreram em períodos climáticos distintos, com três diferentes regimes de chuva. A primeira campanha amostral foi realizada durante um período seco (agosto de 2012), a segunda ocorreu durante um período chuvoso (março de 2013) e, terceira foi realizada em um período com regime de chuvas moderadas (2013). A figura 4 ilustra os índices de pluviosidade ocorridos no Alto vale do Ribeira (região em que se encontram os resíduos de mineração) e a área de estudo. Estas informações foram compiladas posteriormente a partir do banco de dados CIIAGRO online (Instituto Agrônômico/CIIAGRO, 2015).

Figura 4: Precipitação mensal ocorrida no Alto Vale do Rio Ribeira de Iguape (áreas de mineração) e no município de Cananéia durante o período entre as amostragens. As setas indicam os meses em que estas foram realizadas (agosto de 2012, março e setembro de 2013).

5.2.1 Coleta de Sedimentos

Sedimentos foram coletados em cinco pontos amostrais em áreas de manguezais nas margens do Mar de Cananéia e três do Mar de Cubatão (figura 5). O sedimento de um manguezal localizado no extremo sul da ilha do Cardoso, conhecido como Pontal, foi utilizado com área de referência. Em cada

local de coleta, foram retirados aproximadamente 5 cm da porção superficial do sedimento com o auxílio de espátula não-metálica. Os materiais recolhidos foram dispostos diretamente em recipientes plásticos e mantidos em caixas isotérmicas até a chegada ao laboratório. Os sedimentos utilizados nos ensaios de toxicidade foram mantidos refrigerados a 4°C, enquanto que aqueles destinados às análises geoquímicas foram armazenados a -20°C.

5.2.2 Coleta do material biológico

Mexilhões das espécies *Mytella guyanensis* e *M. falcata* foram coletados manualmente do substrato lamoso de manguezais distribuídos em cinco pontos ao longo do Mar de Cananéia. Ostras *Crassostrea* sp. também foram coletadas, quando observada a ocorrência destes animais em contato com os sedimentos próximos as bancos de mexilhões. As ostras foram utilizadas apenas para bioacumulação. Como referência foram utilizados bivalves provenientes do Pontal (sul da Ilha do Cardoso) (figura 5). Os bivalves não foram coletados no Mar de Cubatão devido à baixa densidade destes animais no local. Os animais coletados foram transportados em baldes plásticos com água do ponto amostrado.

Foram observadas variações sazonais das populações de *M. guyanensis* e *M. falcata* entre os pontos amostrados no Mar de Cananéia. Na primeira campanha (período seco), as duas espécies foram encontradas em todos os pontos amostrais, porém, com número limitado de indivíduos de *M. falcata* nos pontos D e E. Já na segunda campanha (período chuvoso) esta espécie foi mais abundante, entretanto, sem ocorrência no ponto de referência. Neste período, foi observada uma menor densidade de indivíduos nos bancos naturais de *M. guyanensis*, estando completamente ausentes (ou em quantidades desprezíveis) nos pontos A e B. Na terceira campanha (chuvas moderadas), *M. falcata* esteve ausente nos pontos E e Referência, enquanto que a ausência de *M. guyanensis* se repetiu no ponto A.

Figura 5: Setor sul do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape. Localização dos pontos amostrais em áreas de manguezais do Mar de Cubatão (1 - 3), Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, na Ilha do Cardoso (Referência).

5.2.3 Extração de tecidos dos bivalves

Em laboratório as brânquias de *Mytella guyanensis* e *M. falcata* foram extraídas com auxílio de bisturi e pinça cirúrgica, sendo transferidos para tubos criogênicos e armazenados em ultrafreezer a -80°C . Para estas análises os tecidos foram agrupados em 10 *pools* por ponto amostral, contendo de 3 a 5 pares de brânquias em cada.

Os organismos destinados às análises químicas (bioacumulação) foram mantidos submersos em água do local de coleta, com aeração constante por 24 horas, antes da retirada dos tecidos. Tal procedimento teve por objetivo

permitir a expulsão de material sedimentar ingerido, o qual poderia influenciar nas análises químicas do material biológico. Para cada ponto amostral foram utilizados 10 animais inteiros por espécie (partes moles sem as conchas), os quais foram armazenados em tubos *falcon* e mantidos em ultrafreezer a -80°C até a realização das análises.

5.3 Análises sedimentológicas

5.3.1 Granulometria

As amostras foram secas em estufa a 60°C, durante três dias, e posteriormente desagregadas. A análise granulométrica foi realizada com base no protocolo proposto por Mudroch e MacKnight (1994). Os sedimentos foram molhados e peneirados através de uma malha 0,062 µm para separar os finos (silte e argila). O material retido na peneira foi seco em estufa a 60°C e pesado novamente. A diferença entre os valores obtidos nas pesagens inicial e final corresponde à fração de finos. Posteriormente, o material foi peneirado por 10 minutos em agitador *RO-TAP*, utilizando-se jogo de peneiras “*granutes*”, as quais apresentam diferentes malhas seguindo os intervalos >2 mm; 1 mm; 0,5 mm; 0,25 mm; 0,125 mm; 0,063 mm e < 0,063 mm. A massa das frações granulométricas retidas em cada peneira foi quantificada em balanças digital e analítica. Com base nos resultados, o tipo de sedimento predominante foi classificado de acordo com a escala de Wentworth (1922): areia grossa (fração > 0,5 mm), areia média (fração > 0,25 mm), areia fina (>0,125 mm), areia muito fina (> 63 µm) e silte/argila (< 63 µm).

5.3.2 Quantificação de matéria orgânica

Para a avaliação do teor de matéria orgânica total foi aplicado o método descrito por Loring e Rantala (1992). Três sub-amostras de 5 g dos sedimentos previamente secos em estufa (60°C por três dias) foram transferidos para cadinhos de porcelana e incinerados a 500°C por 3 horas. O cálculo do percentual de matéria orgânica foi feito através da diferença entre as médias das pesagens iniciais e finais.

5.3.3 Teor de carbonato de cálcio total (CaCO_3)

Para estimar o teor de carbonato de cálcio (CaCO_3) presente no sedimento, foi seguido o método descrito por Gross (1971). A amostra foi seca em estufa a 60°C por 3 dias. Em seguida, três frações de 5 gramas foram pesadas e transferidas para béqueres, aos quais foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico a 10% por 2 dias, para eliminação do CaCO_3 . Em seguida, as amostras foram retidas em papel filtro previamente pesado, onde foram lavadas com água destilada. O material foi seco em estufa a 60°C por 2 dias e novamente pesado. A diferença entre o peso final e inicial forneceu a estimativa do teor de carbonato de cálcio.

5.3.4 Determinação Química

Neste estudo foram utilizadas duas abordagens para extração dos metais dos sedimentos. A primeira foi via extração ácida fraca, utilizando o modelo SEM/AVS (Metais Simultaneamente Extraídos / Sulfetos Volatilizáveis em Ácido). Esta abordagem foi utilizada para tentar inferir o grau de toxicidade dos sedimentos segundo a premissa do método e comparar com os resultados dos ensaios de toxicidade. Os sedimentos coletados nas duas primeiras campanhas de coleta (período seco e chuvoso) foram analisados por essa técnica. No entanto, o método descrito acima não se mostrou consistente (como será discutido adiante) e na terceira campanha de coleta (pluviosidade moderada) foi preferível realizar extração ácida forte (USEPA, 1996), que possibilita comparar os resultados com os valores de qualidade de sedimentos internacionais.

5.3.5 Modelo SEM/AVS

As análises de metais foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Ambiental da Universidade Federal Fluminense, pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Wilson Thadeu Machado. A determinação de sulfetos volatilizáveis em ácido (AVS) e dos metais selecionados que são dissolvidos por uma acidificação fraca (metais simultaneamente extraídos) foi realizada com base no protocolo adotado pela USEPA (Allen *et al.*, 1993a).

O procedimento de extração do AVS foi realizado através da aplicação de 20 mL de ácido clorídrico HCl 6 mol L^{-1} em recipiente fechado. O gás

sulfídrico (H_2S) resultante da decomposição dos sulfetos ácido-voláteis foi purgado com nitrogênio e reoxidado a sulfato em um lavador de gases de hidróxido de sódio (NaOH) a 1 N. A solução de NaOH foi analisada para sulfatos, dando a concentração de AVS. O extrato de lixiviação com HCl a 6 L^{-1} foi filtrado e os metais dissolvidos (Cd , Cr , Cu , Fe , Mn , Ni , Pb e Zn) foram determinados por espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES). As condições operacionais estão apresentadas na tabela 1.

A quantificação foi realizada por interpolação a partir de curvas analíticas com quatro soluções-padrão soluções-padrão para a calibração. As soluções de Cd , Cr , Cu , Fe , Mn , Ni , Pb e Zn foram geradas a partir de diluição de soluções-padrão estoque *SpecSol* de concentração 1 g L^{-1} , utilizando água ultrapura obtida de um sistema Elga (modelo *PURELAB Ultra Analytic*). As análises de SEM/AVS foram realizadas em amostras úmidas, portanto, paralelamente foram realizadas as quantificações gravimétricas da concentração de água de cada amostra. Com estes dados foi possível a apresentação de um resultado em base seca.

Tabela 1: Condições operacionais para o ICP OES utilizadas na determinação de metais em extratos de sedimento.

Parâmetro	Valor
Potência incidente (W)	1200
Vazão de gás do plasma (L min^{-1})	12
Vazão de gás de revestimento (L min^{-1})	0,2
Vazão de gás de nebulização (L min^{-1})	0,02
Pressão do nebulizador (bar)	1,0
Vazão de introdução de amostra (mL min^{-1})	1,0
Tempo de integração (s)	1
Resolução	Alta
Comprimento de onda (nm)	Cd: $\lambda = 226,502$
	Cr: $\lambda = 205,552$
	Cu: $\lambda = 324,750$
	Fe: $\lambda = 259,940$
	Mn: $\lambda = 257,610$
	Ni: $\lambda = 231,604$
	Pb: $\lambda = 220,353$
	Zn: $\lambda = 213,856$

5.3.6 Preparo das amostras para quantificação de metais em sedimento (extração ácida forte) e amostras biológicas

As amostras de sedimentos foram secas em estufa a 60°C, durante três dias, e posteriormente maceradas. A extração ácida para sedimentos foi baseada no Método 3050B USEPA (1996). Após atingir uma textura homogênea, 1 g de sedimento de cada amostra foi transferido para tubos de vidro. Todo o procedimento foi realizado em bloco digestor a 95°, onde foram adicionados aos tubos 5 mL de HNO₃ (1:1) e aguardado de 10 a 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de HNO₃ concentrado. Transcorridos 90 minutos, foram adicionados 1 mL de H₂O₂ e 1,5 mL de água ultrapura (Milli-Q®) e aguardado 120 minutos. Após este período, os tubos contendo as amostras receberam 1 mL de H₂O₂ a cada 15 minutos, até atingir o volume de 5 mL. Por fim, foram adicionados 5 mL de HCl e mantidos no bloco digestor por mais 15 minutos, quando foram retirados do aquecimento. Após o resfriamento, o volume foi ajustado para 50 mL com água ultrapura (Milli-Q®) e as amostras filtradas, sendo mantidas sob-refrigeração até as análises. Como controle e garantia de qualidade, amostras contendo materiais de referência certificados, bem como “brancos” contendo apenas os reagentes, foram submetidas aos mesmos procedimentos.

As amostras biológicas foram liofilizadas por 72 horas e, em seguida, maceradas para serem submetidas à digestão ácida. O processo de digestão foi adaptado de Moreira (2010). Neste procedimento, 0,35 g de amostra foram transferidos para tubos de vidro e adicionados 4 mL de HNO₃ e aguardado um período de 8 horas até a adição de este 1 mL de H₂O₂ (30%). As misturas permaneceram em pré-digestão por 15 horas em temperatura ambiente. Transcorrido este período, os tubos foram tampados com vidros de relógio e o material foi aquecido em bloco digestor a 90°C, sendo mantido nesta temperatura por 3 horas. Após atingir a temperatura ambiente, o volume foi ajustado para 35 mL com água ultrapura (Milli-Q®) e as amostras filtradas, sendo mantidas sob-refrigeração até as análises. Amostras de tecido de referência NIST SRM1566a e SRM 2976 (padrões *Oyster Tissue* – tecido de ostra e *Mussel Tissue* – tecido de mexilhão, respectivamente) e “branco” (apenas reagentes) foram submetidas aos mesmos procedimentos.

A determinação do metalóide As e dos metais Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, e Zn nas amostras bióticas e de sedimentos foram realizadas no Laboratório de Química Inorgânica (LaQIMar) do Instituto Oceanográfico da USP, coordenado pelo Prof. Dr. Rubens Cesar Lopes Figueira. A quantificação dos elementos foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Os resultados da análise dos materiais certificados, bem como os percentuais de recuperação estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Concentrações de metais Arsênio e determinadas nos materiais de referência certificados para sedimentos e amostras bióticas.

Amostra	Amostras sedimento		Amostras biológicas	
	<i>Estuarine sediment</i>	<i>SS2 soil</i>	<i>Padrão Mussel Tissue</i>	<i>Padrão Oyster tissue</i>
[As] mg/Kg	13,29	71,31	11,78	4,15
Certificado	14,30	75,00	13,00	7,65
recuperação (%)	92,93	95,09	90,62	54,31
[Cd] mg/Kg	1,54	2,13	0,72	2,22
certificado	0,67	2,00	0,82	2,48
recuperação (%)		106,54	88,33	89,38
[Cr] mg/Kg	111,17	27,54	0,48	0,30
certificado	178,00	34,00	0,50	Não certificado
recuperação (%)		80,99	96,70	Não certificado
[Cu] mg/Kg	57,52	180,59	4,53	67,90
certificado	60,00	191,00	4,20	71,60
recuperação (%)	95,87	94,55	107,81	94,83
[Ni] mg/Kg	69,77	36,71	0,90	1,14
certificado	128,00	54,00	0,93	1,04
recuperação (%)		67,97	96,96	109,55
[Pb] mg/Kg	37,93	80,65	1,30	0,42
certificado	31,90	126,00	1,19	0,31
recuperação (%)	118,91	64,01	109,50	134,78
[Zn] mg/Kg	110,35	339,63	129,12	1401,21
certificado	175,00	467,00	137,00	1424,00
recuperação (%)	63,06	72,72	94,25	98,40
[Fe] mg/Kg	36402,66	8032,69		
certificado	44800,00	21046,00		
recuperação (%)	81,26	38,17		

5.4 Ensaios de toxicidade

5.4.1 Coleta e Aclimação dos Organismos-teste

Os anfípodes da espécie *Tiburonella viscana* foram coletados no Município de Ilhabela, litoral Norte de São Paulo, no nível superior do infralitoral da Praia do Engenho D'Água. A coleta dos organismos foi realizada com auxílio de uma draga especial para coleta de anfípodes, construída segundo modelo usado pela USEPA¹. Os anfípodes coletados foram acondicionados em frascos de polietileno (volume aproximado de 1,8 L), aos quais haviam sido adicionados 2 cm de sedimento e água do mar do local. O transporte para o laboratório foi conduzido em caixas de isopor, visando preservar a temperatura e diminuir o estresse sobre os animais.

Em laboratório, os indivíduos foram introduzidos em uma bacia contendo água do mar e uma camada de 1 cm de sedimento proveniente do local de coleta, sendo mantidos em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob iluminação e aeração constantes, por um período de até quatro dias, a fim de minimizar a atividade dos animais. Estes procedimentos são necessários para aclimação dos anfípodes, conforme recomendado pela *Environment Canada* (1998).

5.4.2 Procedimento Experimental

A metodologia utilizada para a condução dos testes de toxicidade aguda com fase sólida em sedimentos foi descrita por Melo e Abessa (2002). Os organismos selecionados para o uso nos ensaios apresentavam movimentação normal dos apêndices e estavam sem anomalias morfológicas. Complementando a avaliação dos indivíduos, também foi feita uma observação comportamental, pois estes organismos devem responder a estímulos externos contraindo o corpo e, quando colocados em contato com sedimento, devem enterrar-se em até uma hora (Melo, 1993).

Os ensaios foram conduzidos em recipientes de polietileno de alta densidade, os quais receberam os sedimentos, formando uma camada de aproximadamente 200 mL, sendo preenchido o volume com água de diluição

¹ O modelo da draga foi fornecido à CETESB pelo Prof. Dr Richard C. Swartz (USEPA), durante visita técnica ao Brasil.

(600 mL). Após a preparação os sistemas permaneceram em sala climatizada (25°) por 24 horas, para que o sedimento estudado e a água de diluição entrassem em equilíbrio. Deste modo, após o período de repouso das amostras, foram introduzidos 10 anfípodes previamente identificados como adultos e com a mesma faixa de tamanho em cada réplica (sendo usadas três réplicas para cada amostra).

Durante os experimentos os animais não receberam alimentação e permaneceram em aeração suave, iluminação constante e temperatura controlada (25°C). Foram utilizados dois grupos controle, sendo um com o sedimento proveniente do local de coleta dos anfípodes e outro com sedimento do ponto de referência dos bivalves (sul da Ilha do Cardoso, conhecido como Pontal). Periodicamente, foram verificados os parâmetros físico-químicos da água sobrenadante em cada réplica. Para determinar a concentração de oxigênio dissolvido foi utilizado um oxímetro; a salinidade foi verificada com auxílio de um refratômetro; e o pH determinado com pHmetro digital.

Transcorridos 10 dias, o sedimento de cada réplica foi peneirado numa malha de 0,5 mm parcialmente mergulhada em uma bandeja plástica contendo água do mar filtrada. Este procedimento faz com que os indivíduos fiquem expostos na superfície da água, de onde foram retirados com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidos para placas de Petri.

A mortalidade foi quantificada por meio da observação dos anfípodes em estereomicroscópio, sendo considerados mortos aqueles que não apresentaram movimento dos apêndices, nem contrações no tubo digestivo. Quando a soma final dos organismos em determinada réplica não atingiu 10, aqueles não encontrados foram considerados mortos.

5.5 Biomarcadores Bioquímicos

5.5.1 Homogeneização dos tecidos

No dia da homogeneização, os tecidos previamente congelados (-80°C) foram transferidos para temperatura de -20°C, onde permaneceram por 12 horas, a fim de manter a integridade das amostras. Após este período, foram mantidos a 4°C para o completo descongelamento e procedimento de pesagem. As amostras de brânquias foram pesadas e homogeneizadas utilizando um homogeneizador motorizado do tipo *Tissue Tearorna*, na proporção 1:4 (massa/volume), com tampões específicos para cada tipo de análise.

A homogeneização das amostras utilizadas na análise de Metalotioneínas foi conduzida com o tampão Tris-Sacarose, acrescido de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) a 0,1 M e β -mercaptoetanol a 100%, sendo este último um agente redutor, utilizado para evitar a oxidação das metalotioneínas e a formação de pontes dissulfeto intermoleculares (produtos de alta massa molecular). Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 15.000 g durante 45 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 50 μ L do sobrenadante foi separada para a determinação do conteúdo de proteína total.

Para as análises de atividades enzimáticas, peroxidação lipídica (LPO) e danos em DNA (quebra das fitas) foi utilizado o tampão Fosfato de Potássio (0,1 M, pH 7.2), acrescidos de 0,5 mM de EDTA e fluoreto PMSF a 1% (agente antiproteolítico). Após a homogeneização foram retirados de cada amostra 400 μ L para as análises de LPO, danos em DNA (biomarcadores de efeito) e determinação de proteína total. O volume remanescente foi centrifugado a 15.000 g durante 15 minutos sob temperatura controlada de 4 °C, obtendo-se assim a fração S15 (sobrenadante de 15.000g). Esta fração corresponde à porção celular citoplasmática, com a qual foram analisadas as atividades enzimáticas. Adicionalmente, 50 μ L da fração S15 foram separados para a determinação do conteúdo de proteínas, uma vez que os valores obtidos nas análises de atividades enzimáticas são normalizados e expressos por mg de proteína total.

5.5.2 Quantificação de Proteínas Totais

As concentrações de proteínas totais dos homogenatos teciduais e da fração S15 foram determinadas igualmente para todos os ensaios bioquímicos, seguindo o protocolo descrito por Bradford (1976). Este método baseia-se na mudança de coloração do reagente *Comassie Brilliant Blue G-250*, passando de avermelhado para azulado, quando este corante liga-se a proteínas. A partir das amostras previamente separadas foram retiradas alíquotas (2 a 20 µL, dependendo da concentração da amostra) e adicionado o meio contendo reagente de Bradford (corante *Comassie Brilliant Blue G-250* em etanol 95% e H_3PO_4 85%). As amostras foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente por 20 minutos. A quantificação foi feita com base nos valores de absorbância obtidos pelas leituras das amostras por espectrofotometria a 595 nm. Estes valores foram transformados em concentrações de proteínas totais (expressos em mg mL^{-1}) através da dos valores de absorbância referentes leitura de curvas padrão de albumina de soro bovino (BSA).

5.5.3 Análises dos Biomarcadores Bioquímicos

5.5.3.1 Metalotioneína (MT)

A concentração de metalotioneína foi estimada com base no protocolo descrito por Viarengo *et al.* (1997). O método consiste em avaliar o conteúdo de resíduos de grupo sulfidríla (SH) utilizando o reagente de *Ellman*, uma solução contendo tampão Na_2HPO_4 / NaCl (pH 8,0) e Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A quantificação foi avaliada utilizando uma fração parcialmente purificada de metaloproteína, a qual foi obtida através de sucessivas etapas. Inicialmente 285 µL de uma solução contendo 93% de etanol e 7% de clorofórmio foram adicionados ao material homogeneizado (tampão específico para esta análise) e centrifugado a 6.000 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida 490 µL do sobrenadante obtido foi transferido para um novo frasco e adicionado 1502 µL de uma solução contendo 97,8% de etanol e 2,2% HCl e mantidos a -20°C por 1 hora. Transcorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 6.000g por 10 minutos a 4°C. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e o precipitado agitado com 1 mL de uma solução contendo 87% de etanol, 1% de clorofórmio e 12% de tampão tris-HCl, seguida

da centrifugação a 6.000g por 10 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com 50 µL uma solução de NaCl (1,5 %) em água Milli-Q®. Após agitação vigorosa foi adicionado 50 µL de uma solução contendo 10% de EDTA e 0,15% de HCl (preparada em água Milli-Q®) seguida de nova agitação. Por fim, foi adicionado 1 mL da solução de *Ellman* e levado centrifugado 3.000g por 5 minutos a 4°C. Foram retirados 200 µL do sobrenadante obtido na centrifugação final e transferidos para a placa multicavidade, para leitura das absorbâncias a 412 nm. Com os valores de absorbância foram quantificados os conteúdos de resíduos de SH, uma vez que as metalotioneínas são caracterizadas por um alto conteúdo de cisteínas (20-30%) quando comparadas a outras proteínas presentes nos extratos etanólicos. Os resultados foram expressos em µg de Metalotioneína mg⁻¹ de proteínas, com base em uma curva padrão de glutatona em sua forma reduzida (GSH).

5.5.3.2 Concentração de tióis não proteicos reduzidos (GSH)

O método para determinação de GSH foi baseado no protocolo proposto por Sedlak e Lindsay (1968). O princípio do método baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com o DTNB. Neste experimento, 50 µl de uma solução de ácido tricloroacético a 50% foram adicionados a 200 µL da fração S15 ainda congelada. As amostras foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos (4°C) e transferidos 50 µL do sobrenadante à placa multicavidades. Em seguida foram adicionados 230 µl do tampão Tris-base 0,4 M, (pH 8,9) e 20 µl de solução de DTNB junto às amostras. Para que ocorresse a reação, a placa foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. O produto gerado na reação absorve luz a 415 nm, sendo determinado em espectrofotômetro. A concentração de tióis foi calculada com base na absorbância da curva padrão de GSH e expressa em nanomoles de tióis mg⁻¹ de proteínas.

5.5.3.3 Glutathione-S-transferase (GST)

A GST é uma enzima que atua na Fase 2 das vias de detoxificação, através da conjugação de compostos modificados na Fase 1 com a glutathione

reduzida. Para determinação da atividade da GST na fração S15 das amostras foi utilizado método descrito por McFarland *et al.* (1999) e adaptado por Martín-Díaz *et al.* (2008) para ser realizado em leitor de placas multicavidades. O método utiliza uma medida indireta da atividade da GST, pois quantifica o produto da conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a GSH (glutathiona reduzida), mediante a ação da enzima glutathiona-S-transferase.

As amostras foram incubadas em um meio de reação tampão fosfato de potássio (pH 6,5) contendo CDBN 42 mM e GSH 1mM como substratos. A formação do conjugado glutathiona-2,4-dinitrobenzeno foi monitorada durante 30 minutos em espectrofotômetro (medidas de absorbância a 340 nm) com leituras a cada 5 minutos. Os resultados mostraram aumento da absorbância ao longo do tempo, os quais foram transformados e expressos em nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

5.5.3.4 Glutathiona Peroxidase (GPx).

A GPx está presente nos processos de defesa contra o estresse oxidativo, a qual catalisa a redução de hidróxidos orgânicos e inorgânicos através da glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona dissulfeto (ou glutathiona oxidada - GSSG) e H₂O (Van der Oost *et al.*, 2003). O método utilizado para a análise da GPx na fração S15 das amostras, em leitor de placas multicavidades, foi descrito McFarland *et al.* (1999). A GPx utiliza o cofator NADPH como doador de elétrons para a oxidação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em H₂O, pela oxidação da GSH (passando a GSSG). Assim sendo, consumo de NADPH é o indicativo da atividade enzimática. Para o experimento foi preparado um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7), EDTA 0,1 mM, azida sódica 0,2 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 2 mM, e Glutathiona Redutase 1 mM. Neste ensaio, 20 µL de cada amostra foram transferidos para placas multicavidades, na qual foram adicionados 140 µL do meio de reação e 40 µL de H₂O₂ (5 mM). A atividade foi monitorada por espectrofotometria em comprimento de onda de 340 nm, sendo determinado o consumo basal de NADPH da amostra em 3 minutos. Os resultados da análise da atividade de GPx foram expressos em nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

5.5.3.5 *Glutathione Redutase (GR)*

A GR catalisa a redução da GSSG a GSH através da oxidação do cofator NADPH. Portanto, a atividade enzimática da GR pode ser indicada pelo consumo basal de NADPH, cujo decréscimo de absorbância é medido espectrofotometricamente a 340 nm. O método utilizado para a análise da atividade da GR na fração S15 das amostras foi descrito McFarland *et al.* (1999) para realização em leitor de placas multicavidades. Alíquotas de 20 μL das amostras foram incubadas em 180 μL de tampão fosfato de potássio (pH 7,6) contendo GSSG 30 mM como substrato e o cofator NADPH 0,8 mM. O consumo do NADPH foi monitorado a cada 2 minutos durante 10 minutos por espectrofotometria a 340 nm. Os resultados foram expressos em $\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

5.5.3.6 *Acetil Colinesterase (AChE)*

A atuação da AChE é principalmente nas terminações nervosas, tendo a função catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, levando à formação de acetato e tiocolina. Este mecanismo permite que o receptor colinérgico retorne a condição inicial (anterior à ativação) impedindo sua transmissão excessiva (Andreescu e Marty, 2006). A determinação da atividade da AChE foi baseada no protocolo descrito por Ellman *et al.* (1961), o qual foi adaptado por Montserrat *et al.* (2006) utilizando leitor de placas multicavidades. A partir da fração S15 foram retirados 33,4 μL e transferidos para a placa. Por conseguinte, foram adicionados tampão Fosfato 0,1M (pH 7,6), o substrato iodeto de acetilcolina 0,075M e DTNB 10mM. No experimento foi observada a reação colorimétrica da tiocolina com o DTNB, a qual foi monitorada durante 20 minutos, em intervalos de 5 minutos. Os dados foram analisados com base na absorbância obtida pelo espectrofotômetro a 412 nm, com os resultados expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

5.5.3.7 *Peroxidação lipídica (LPO)*

Na avaliação de peroxidação lipídica foi empregado o método proposto por Wills (1987), no qual são mensuradas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR). Os TBAR são produtos intermediários da peroxidação

lipídica induzida por radicais livres durante o estresse oxidativo. Seguindo este método, 150 μL de cada amostra foram incubados a 70°C por 10 minutos, na presença de ácido tricloroacético a 10% (TCA) e ácido tiobarbitúrico a 0,67% (TBA) em FeSO_4 1mM. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas e o precipitado utilizado para análise de fluorescência a 516 nm (excitação) e 600 nm (emissão). As concentrações foram calculadas com base na curva padrão de tetrametoxipropano, e os resultados expressos em μg de TBARs / mg de proteínas.

5.5.3.8 Danos em DNA

Para avaliação dos danos em DNA foi utilizado o método baseado na quantificação de vestígios livres de DNA por precipitação alcalina, resultado da quebra da fita do DNA genômico (Olive, 1988). Uma alíquota de 20 μL dos homogenatos teciduais foi adicionada a 200 μL de uma solução de SDS a 2% contendo EDTA 10 mM, Tris-base 10 mM e NaOH 40 mM. Em seguida foram adicionados 200 μL de KCl 0,12M a cada amostra e aquecidas a 60°C em banho-maria, permanecendo por 10 minutos a esta temperatura. Após este período as amostras foram incubadas a 4°C por 30 minutos. Na etapa seguinte, foi feita a centrifugação a 8000g a 4°C por 5 minutos. Do sobrenadante obtido, 50 μL foram transferidos à placa multicavidade e adicionados 150 μL de corante *Hoescht* (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Este corante foi preparado em tampão contendo NaCl 0,4 M, colato de sódio 4 mM e Tris-acetato 0,1 M (pH 8,5). A placa foi inserida no espectrofluorímetro, onde sofreu leve agitação por 5 minutos, seguida da leitura de fluorescência através de filtros de 360 nm (excitação) e 450 nm (emissão). Os valores de absorbância foram transformados em concentrações de DNA ($\mu\text{g mg}^{-1}$) através dos valores obtidos de uma curva padrão de DNA genômico de esperma de salmão.

5.6 Tratamento dos dados e análises estatísticas

Os resultados dos ensaios de toxicidade foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade por meio dos testes Shapiro-Wilks e Bartlett, respectivamente. Após a confirmação da normalidade e homogeneidade das

variâncias os resultados foram comparados com os obtidos no sedimento controle pelo teste t-student para amostras independentes.

Para cada estação climática as respostas dos biomarcadores nos organismos de cada ponto amostral foram comparadas com as obtidas nos animais do ponto de referência. Para tanto, foi empregada análise de variância (ANOVA), seguida de comparações múltiplas pelo teste Dunnett, com nível de significância de 5% ($p=0,05$).

5.6.1 Integração dos dados

Os resultados das diferentes abordagens de caracterização da exposição aos estressores foram submetidos a análises multivariadas para integração das diferentes linhas de evidência. Análise fatorial, com a aplicação de análise de componentes principais (ACP) foi aplicado nos conjuntos de dados obtidos dentro de cada campanha amostral. Esta metodologia foi utilizada com o intuito de estabelecer e quantificar associações entre os conjuntos de dados, reduzindo o número de variáveis a um grupo menor de componentes, o que facilita a interpretação dos resultados.

Para a realização das análises, os dados foram organizados em uma matriz composta pelas variáveis geoquímicas, todos os dados de respostas biológicas (bioacumulação, toxicidade e biomarcadores bioquímicos). Os resultados (expressos em %) foram transformados pela função arco-seno, possibilitando a comparação com os dados contínuos.

As análises multifatoriais foram realizadas empregando uma matriz de correlação, em que as variáveis foram auto-dimensionadas de modo a serem tratadas como de igual importância. As cargas fatoriais geradas foram correlacionadas aos coeficientes das variáveis originais e dos principais fatores. As variáveis selecionadas para serem interpretadas foram aquelas associadas com um fator de carga $\geq \pm 0,40$ (Tabachnick e Fidell, 1996).

Não foi possível a obtenção de conjuntos de dados homogêneos para as três campanhas, havendo ausência informações sobre os efeitos, uma vez que não foram encontradas as espécies utilizadas como modelo biológico em todas as campanhas. Além disso, existe a ausência de dados de toxicidade para o último período de amostragem (pluviosidade moderada). Portanto, foi utilizada uma abordagem qualitativa para integrar o conjunto total de dados, na

forma de Tabelas de Decisão (Long e Chapman, 1985; Carr *et al.*, 1996; Abessa *et al.*, 2008). Deste modo, os dados obtidos em cada análise, para cada ponto amostral, foram organizados de forma qualitativa (degradação / ausência de degradação) em uma tabela com as conclusões de cada análise. Em seguida, as conclusões obtidas para as diferentes variáveis foram comparadas, de modo a evidenciar concordâncias ou discordâncias entre os diferentes dados.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos Agentes Estressores

A primeira etapa de caracterização envolveu uma ampla revisão da bibliografia sobre o histórico de contaminação por metais no Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape (CELCLI). Nesta abordagem, foram analisadas as informações disponíveis sobre as fontes, o destino e as concentrações de metais. Assim, foram identificadas variações espaço-temporais destes contaminantes, que podem ser relacionadas com os períodos de maior e menor intensidade de chuvas na região do estuário e na bacia do Rio Ribeira de Iguape. A maior parte da contaminação esteve associada às áreas com maior concentração de sedimentos pelíticos e matéria orgânica. Estes locais se apresentam distribuídos ao longo do CELCLI, acompanhando o deslocamento da zona de turbidez máxima. As informações sobre a contaminação por metais no CELCLI foram apresentadas na seção: “Caracterização da Área de estudo e Antecedentes” e os dados compilados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Máximas concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de metais e As reportadas em sedimentos do Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape.

Local	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Zn	Método	Referência
Próximo à foz natural do Rio Ribeira de Iguape		<0,19		13,1	0,15	82,0	58,9	APHA (1980)	Eysink <i>et al.</i> (1988)
		0,13	7,8	9,83		29,04	31,16	EPA 821/R-91/100 (Allen <i>et al.</i> , 1993a)	Campos <i>et al.</i> (2016)
Mar Pequeno						160,0		NR	Piva-Bertoletti e Padua (1986)
				292		247	105	NR	Tessler <i>et al.</i> (1987)
				46 ^b		197 ^b	135 ^b	EPA Method 3050B (USEPA, 1996)	Mahiques <i>et al.</i> (2013)
	3,49	<0,1	29,4	11,5		30,7	49,4	EPA Method 3051A (USEPA, 2007b)	CETESB (2014)
		0,28	11,21	16,07		51,63	37,01	EPA 821/R-91/100 (Allen <i>et al.</i> , 1993a)	Cruz (2014)
		0,07	20,38	5,47	0,06	13,08	23,32	EPA 821/R-91/100 (Allen <i>et al.</i> , 1993a)	Araujo (2014)
		0,17	8,59	7,99		32,84	32,62	EPA 821/R-91/100 (Allen <i>et al.</i> , 1993a)	Gusso-Choueri <i>et al.</i> (2015)
	11	<0,6	70,1	1673		72,7	176	EPA Method 3051A (USEPA, 2007b)	CETESB (2015)
		0,16	9,13	10,95		33,41	33,57	EPA 821/R-91/100 (Allen <i>et al.</i> , 1993a)	Campos <i>et al.</i> (2016)
			52,2 ^b	32,1 ^b		68,2 ^b	92,1 ^a	EPA Method 3050B (USEPA, 1996)	Mahiques <i>et al.</i> (2009)
Mar de Cananéia	12,1		76				96	EPA Method 3051A (USEPA, 2007b)	Amorim <i>et al.</i> (2008)
		5,3	280	35		56	74	EPA Method 7010 (USEPA, 2007c)	Aguiar <i>et al.</i> (2008)
					<0,10			Horvat (1996)	Azevedo <i>et al.</i> (2011)
	10	<0,1	38,8	12,9		25,7	57,2	EPA Method 3051A (USEPA, 2007b)	CETESB (2014)
		0,76		61,7			71,6	EPA Method 3050B (USEPA, 1996)	Cruz <i>et al.</i> (2014)
		0,14	31,97	16,27	0,12	40,24	45,18	EPA 821/R-91/100 (Allen <i>et al.</i> , 1993a)	Araujo (2014)
	6,23	<0,5	25	13		12,5	43	EPA Method 3051A (USEPA, 2007b)	CETESB (2015)
		0,04	3,84	1,97		8,68	3,84	EPA 821/R-91/100 (Allen <i>et al.</i> , 1993a)	Gusso-Choueri <i>et al.</i> (2015)
		<0,20		3,16	<0,05	<3,95	11,3	APHA (1980)	Eysink <i>et al.</i> (1988)
	9,4		41				32	EPA Method 3051A (USEPA, 2007b)	Amorim <i>et al.</i> (2008)
Mar de Cubatão		6,1	133	25		55	56	EPA Method 7010 (USEPA, 2007c)	Aguiar <i>et al.</i> (2008)
					<0,10			Horvat (1996)	Azevedo <i>et al.</i> (2011)
		<0,14		<0,14		<0,14	<0,14	EPA Method 200.8 (USEPA, 1999)	Barros e Barbieri (2012)
	15,8		60				70	EPA Method 3051A (USEPA, 2007b)	Amorim <i>et al.</i> (2008)
Baía deTrapandé		5,2	94	16		24	56	EPA Method 7010 (USEPA, 2007c)	Aguiar <i>et al.</i> (2008)
Próximo à Ilha do Cardoso		<0,20		3,48	0,06	<3,87	19,4	APHA (1980)	Eysink <i>et al.</i> (1988)

Letras a e b: Valores obtidos em testemunhos com máximas concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de deposições ocorridas (a) após abertura do Valo Grande e (b) após mecanização da atividade mineradora (b). NR = não reportado.

6.2 Caracterização da Exposição

6.2.1 Sedimentologia

As características dos sedimentos não apresentaram grandes variações de granulometria, teores de carbonato de cálcio e matéria orgânica entre as diferentes condições climáticas (tabela 4). Com exceção dos pontos A e de Referência, as amostras coletadas tanto no período de clima seco quanto do período chuvoso apresentaram predominância de finos (> 80%). Nos pontos A e de referência (Ref), ocorre predominância de areia fina, cujos percentuais nas duas campanhas foram superiores a 50% e 60%, respectivamente. Estes locais também apresentaram aos menores valores de MO e CaCO_3 .

Tabela 4: Percentual de Areia, finos (silte e argila), matéria orgânica (M.O.) e carbonato de cálcio (CaCO_3) nos sedimentos provenientes de manguezais do Mar de Cubatão (P1 - P3), do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref).

Ponto Amostral - Clima	Areia (%)	Finos (%)	M.O. (%)	CaCO_3 (%)
P3 - seco	1,2	84,1	13,5	10,4
P2 - seco	2,5	83,7	11,6	9,6
P1 - seco	1,2	86,6	8,8	9,5
A - seco	54,3	37,1	5,3	5,9
B - seco	4,9	87,9	6,1	12,3
C - seco	1,5	80,1	12,5	13,9
D - seco	2,8	81,0	11,4	11,0
E - seco	4,0	82,3	11,8	13,8
Ref - seco	61,1	34,3	5,4	5,9
P3 - chuvoso	3,7	81,7	12,4	11,6
P2 - chuvoso	3,6	80,3	14,5	12,1
P1 - chuvoso	4,4	84,5	11,5	6,6
A - chuvoso	58,7	34,3	7,0	6,7
B - chuvoso	6,9	83,1	10,5	14,0
C - chuvoso	2,1	83,0	15,9	14,6
D - chuvoso	2,3	82,7	15,7	12,7
E - chuvoso	3,6	80,4	16,1	16,4
Ref - chuvoso	64,3	30,7	5,5	6,7
A - moderado	50,2	40,8	9,1	6,6
B - moderado	8,4	72,4	19,2	11,0
C - moderado	2,3	83,7	14,6	16,4
D - moderado	5,1	78,9	16,3	12,9
E - moderado	5,3	78,7	16,5	12,0
Ref - moderado	61,5	33,5	5,7	5,5

6.2.2 Modelo SEM/AVS

A partir das concentrações molares dos metais, foi calculada a relação $\Sigma\text{SEM}/\text{AVS}$, sendo ΣSEM o somatório molar das concentrações de Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn, inferindo um fator de definição de qualidade do sedimento (Di Toro *et al.*, 1992). Para valores acima de 1 o sedimento apresenta potencial de toxicidade e para valores abaixo de 1, os metais não estariam biodisponíveis. Os resultados das relações SEM/AVS, bem como as concentrações de metais obtidas via este método, estão apresentados na tabela 5. No período de baixo pluviosidade (clima seco) apenas o ponto B apresentou valor SEM/AVS superior a 1 (1,79). Já no período chuvoso, o ponto C foi o único que apresentou valor acima de 1 nesta relação (10,36). Portanto, de acordo com essa abordagem, na maioria dos sedimentos avaliados, os metais não deveriam estar biodisponíveis, já que estariam ligados no AVS e em outros quelantes.

Tabela 5: Concentrações de metais nos sedimentos e resultados das análises pelo modelo SEM/AVS, para as amostras de sedimentos provenientes de manguezais do Mar de Cubatão (P1, P2 e P3), do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref). Valores de SEM/AVS com potencial de toxicidade (acima de 1) estão realçados.

Local / Clima	Metais (µg g ⁻¹)							Fe (%)	AVS (µmol g ⁻¹)	ΣSEM/ AVS
	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Mn			
Seco										
P3	0,10	5,26	4,43	< LD	25,05	175,66	74,5	0,99	18,31	0,16
P2	0,12	6,15	5,29	< LD	26,35	140,94	57,3	0,97	< LD	< LD
P1	0,16	7,89	6,11	< LD	32,45	41,33	211,7	1,65	< LD	< LD
A	0,10	3,56	5,75	< LD	22,34	40,73	161,7	1,76	4,93	0,17
B	0,11	7,88	5,38	< LD	26,61	223,90	111,1	0,50	2,03	1,79
C	0,10	8,65	3,45	< LD	20,42	228,82	121,0	1,09	5,04	0,73
D	0,05	4,90	2,96	< LD	22,82	25,35	43,7	1,23	0,96	0,57
E	0,03	2,49	1,30	< LD	16,88	17,46	41,7	0,72	< LD	< LD
Ref.	0,06	4,75	1,55	0,28	8,71	44,15	67,3	0,70	19,91	0,04
Chuvoso										
P3	0,07	4,96	4,49	< LD	23,47	129,72	34,9	0,94	< LD	< LD
P2	0,05	5,58	5,92	< LD	23,61	175,33	20,3	0,71	< LD	< LD
P1	0,09	7,32	7,32	9,01	28,55	18,49	104,6	1,17	7,06	0,08
A	0,09	6,95	6,65	< LD	30,96	26,77	78,8	1,10	6,47	0,10
B	0,09	4,82	2,89	< LD	19,95	139,64	56,5	0,60	20,23	0,11
C	0,02	2,11	1,03	< LD	8,51	109,92	22,6	0,17	0,17	10,36
D	0,05	4,61	3,41	< LD	12,41	42,82	57,8	0,51	4,29	0,18
E	0,04	3,71	1,65	< LD	8,90	28,81	48,6	0,64	4,87	0,10
Ref.	0,01	5,06	1,68	4,09	5,40	33,27	54,4	0,47	2,34	0,24

LD: Limite de Detecção

6.2.3 Contaminação dos sedimentos

As concentrações de metais dos sedimentos obtidas por extração ácida fraca (modelo SEM/AVS) apresentaram variações entre os períodos de clima seco e chuvoso (figura 6). As maiores variações nos níveis de metais entre as duas estações climáticas ocorreram no ponto C, onde foram observadas para todos os elementos, exceto para Ni, que esteve abaixo do limite de detecção do método ($0,01 \mu\text{g g}^{-1}$). As concentrações dos elementos estudados nem sempre foram maiores nos pontos próximos à confluência com o Mar Pequeno (P1 no Mar de Cubatão e ponto A no mar de Cananéia). Apenas para Cu, Fe e Mn, foram observados gradientes de concentração no sentido do Mar Pequeno em direção à Barra de Cananéia, embora as maiores concentrações em cada ponto nem sempre prevaleceram num determinado período climático.

As concentrações de Cu não superaram o ISQG proposto pela CCME (2002) em nenhum dos pontos amostrados durante as estações seca e chuvosa. Entretanto, No presente estudo, além dos valores orientadores preconizados pela CCME (2002), também foram considerados os Valores de Qualidade de Sedimentos (VQS) propostos por Choueri *et al.* (2009) para o Sistema Estuarino de Paranaguá. Utilizar este critério seria justificável, uma vez que o CELCI é parte de um interconectado sistema estuarino subtropical conhecido como Complexo Lagunar-Estuarino Iguape-Cananéia-Paranaguá. Segundo os autores, níveis de Cu acima de $6,55 \mu\text{g g}^{-1}$ correspondem a sedimentos impactados, sendo este o limiar de efeito provável. Deste modo, P1 e o ponto A apresentaram concentrações consideravelmente importantes no período chuvoso ($7,32$ e $6,65 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente).

Os níveis de Pb superaram os valores de ISQG ($30,2 \mu\text{g g}^{-1}$) em P1 ($32,45 \mu\text{g g}^{-1}$) e do ponto A ($30,96 \mu\text{g g}^{-1}$) nas campanhas de período seco e chuvoso, respectivamente. Considerando os VQS de Choueri *et al.* (2009), o limiar efeito provável de Pb é $17,63 \mu\text{g g}^{-1}$, o que limita apenas os pontos E e Ref seriam classificados como não impactados.

As concentrações de Zn também superaram o ISQG ($124 \mu\text{g g}^{-1}$) tanto no período seco quanto no chuvoso em P3 ($175,7$ e $129,7 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente), P2 ($140,9$ e $175,3 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) e no ponto B ($223,9$ e $139,6 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente). O ponto C também apresentou valor

elevado deste metal na estação seca ($228,8 \mu\text{g g}^{-1}$). Segundo Choueri *et al.* (2009), o limiar efeito provável de Zn é $41,33 \mu\text{g g}^{-1}$. Considerando os valores de VQS propostos, apenas os níveis de Zn dos pontos D e E na estação seca e do ponto A na estação chuvosa podem ser considerados ambientalmente seguros, uma vez que a concentração de $26,95 \mu\text{g g}^{-1}$ corresponde ao limiar de efeito possível. Os sedimentos dos demais pontos amostrados apresentam valores entre estes limiares e por isso podem ser considerados locais moderadamente impactados de acordo com este critério.

As concentrações de metais obtidas por extração forte (USEPA, 1996) foram realizadas apenas para as coletas realizadas no período de chuvas moderadas e estão apresentados na tabela 6. Nesta campanha foram observados altos níveis de Cu, ultrapassando os valores orientadores de $18,7 \mu\text{g g}^{-1}$ (ISQG – CCME, 2002) e VQS $6,55 \mu\text{g g}^{-1}$ (Choueri *et al.*, 2009) em todos os pontos amostrais (figura 7). Embora os outros elementos estudados não tenham superados os valores de ISQG, de acordo com os VQS determinados para região (Choueri *et al.*, 2009), Pb ultrapassou o limiar de efeito provável ($17,63 \mu\text{g g}^{-1}$) em todas os pontos, exceto no Ref. Já o metalóide arsênio (As) apresentou-se acima do limiar de efeito provável ($5,45 \mu\text{g g}^{-1}$) em todos os locais avaliados, inclusive o ponto de referência. No ponto Ref a concentração de Zn superou o limiar de efeito possível ($26,95 \mu\text{g g}^{-1}$), mas se manteve inferior ao limiar de efeito provável ($41,33 \mu\text{g g}^{-1}$), o qual foi ultrapassado em todos os demais.

Neste período climático, as concentrações de Cr estiveram abaixo do limiar de efeito possível ($27,8 \mu\text{g g}^{-1}$) apenas nos pontos A e Ref. Entretanto, não foram encontrados níveis acima do VQS que corresponde ao limiar de efeito provável ($48,80 \mu\text{g g}^{-1}$). De maneira semelhante, Ni não superou limiar de efeito possível ($10,98 \mu\text{g g}^{-1}$) apenas nos pontos A e Ref, porém, os demais não chegaram a ultrapassar o limiar de efeito provável ($19,10 \mu\text{g g}^{-1}$).

Tabela 6: Concentrações de arsênio (As) e metais determinados via extração ácida forte (USEPA, 1996), nos sedimentos superficiais de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), durante o período de chuvas moderadas.

Ponto Amostral	Elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$)							
	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Fe
A	6,28	0,97	18,36	32,49	7,53	19,82	36,90	17031
B	10,27	1,16	31,59	28,02	12,79	28,53	59,72	31251
C	12,15	1,16	34,31	20,17	13,91	22,45	62,94	32524
D	12,35	1,11	31,67	17,99	12,56	20,17	58,05	29940
E	12,69	1,13	34,16	18,27	13,64	19,40	60,99	33858
Ref	9,47	0,56	19,43	9,35	7,24	8,03	31,72	14150

Figura 6: Variação espaço-temporal das concentrações de metais e arsênio em sedimentos superficiais de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref). As linhas duplas correspondem aos limiares de efeito provável e as linhas simples aos limiares de efeito possível (Choueri *et al.*, 2009).

Figura 7: Variação espacial das concentrações de metais e arsênio, durante a estação com chuvas moderadas, em sedimentos superficiais de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref). As linhas duplas correspondem aos limiares de efeito provável e as linhas simples aos limiares de efeito possível (Choueri *et al.*, 2009).

6.2.4 Bioacumulação

As concentrações de metais nas partes moles dos bivalves *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea* sp., em base seca, estão apresentados na tabela 7. Entre as espécies de bivalves foram encontradas grandes variações na concentração de alguns metais, em um mesmo local e/ou estação climática. Segundo O'Connor (1993), mexilhões e ostras apresentam capacidades distintas de bioacumulação, podendo apresentar amplas diferenças nas concentrações de um mesmo metal. Dentre os metais determinados no presente estudo, Cantillo (1998) aponta para o fato de ostras poderem apresentar enriquecimento de Cu e Zn 10 vezes superiores aos encontrados em mexilhões.

Neste sentido, os níveis de bioacumulação em base seca obtidos no presente estudo foram avaliados de acordo com os indicativos de contaminação propostos por Cantillo (1998). Esse autor analisou os dados de bioacumulação obtidos globalmente pelo programa internacional de monitoramento *Mussel Watch* e anteriores à década de 1970. A partir dessas informações, pelo cálculo da mediana e 85º percentil, foram propostos os níveis de elementos-traço que podem ser considerados como indicativos de contaminação em mexilhões e ostras. De acordo com o proposto, concentrações indicativas de contaminação por elementos-traço em mexilhões e ostras são semelhantes para As ($16 \mu\text{g g}^{-1}$), Cd ($3,7 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr ($2,5 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni ($3,4 \mu\text{g g}^{-1}$) e Pb ($3,2 \mu\text{g g}^{-1}$). Conforme apresentado, os metais que apresentam diferentes limiares entre os grupos de bivalves estudados são Cu e Zn. Para estes metais, os valores acima dos quais podem ser considerados como indicativo de contaminação para mexilhões são $10 \mu\text{g g}^{-1}$ e $200 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e Zn, respectivamente, enquanto que para ostra são $300 \mu\text{g g}^{-1}$ e $4000 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e Zn, respectivamente.

Tabela 7: Concentrações de metais em base seca (b.s.) e arsênio (AS) em *Crassostrea* sp. (Crs), *M. guyanensis* (M.g) e *M. falcata* (M.f) coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref).

Condição climática seca																					
Ponto	Metal (µg g ⁻¹) / Espécie																				
	As			Cd			Cr			Cu			Ni			Pb			Zn		
	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f
A	<LD	5,1	<LD	0,5	0,1	3,1	1,3	2,1	2,2	40,4	39,5	27,6	1,2	4,7	4,6	<LD	<LD	29,1	2390	85,7	77,6
B	5,1	6,0	5,0	0,5	0,2	0,2	1,3	1,0	1,4	40,8	21,9	25,2	0,9	2,9	4,9	<LD	<LD	2,0	2520	68,7	75,0
C	4,0	6,1	5,3	0,7	0,3	0,2	1,2	1,1	1,3	30,0	13,5	25,8	1,1	2,3	3,2	1,3	1,0	1,2	1404	85,1	67,3
D	9,6	6,8	NC	0,9	<LD	NC	1,3	1,4	NC	22,9	20,3	NC	1,3	2,5	NC	<LD	<LD	NC	1280	76,4	NC
E	9,7	9,6	NC	1,0	0,1	NC	0,5	0,6	NC	13,2	10,3	NC	0,8	2,1	NC	0,8	<LD	NC	494	72,6	NC
Ref	10,3	15,3	13,5	1,6	0,4	0,6	1,0	1,1	0,9	21,1	12,9	10,5	1,1	6,2	5,8	<LD	<LD	<LD	808	57,4	58,0
Chuvosa																					
Ponto	Metal (µg g ⁻¹) / Espécie																				
	As			Cd			Cr			Cu			Ni			Pb			Zn		
	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f
A	<LD	NC	4,8	1,1	NC	<LD	1,3	NC	2,4	44,9	NC	27,5	1,8	NC	2,8	1,7	NC	2,6	4636	NC	77,7
B	4,3	NC	5,8	0,7	NC	0,1	0,7	NC	2,0	38,7	NC	30,0	1,2	NC	4,5	<LD	NC	<LD	3907	NC	81,1
C	<LD	10,9	<LD	1,1	<LD	0,2	1,0	0,4	1,3	29,5	10,2	31,7	1,0	2,1	6,5	<LD	<LD	1,0	1460	62,1	72,4
D	<LD	7,0	<LD	1,0	0,2	<LD	1,1	1,6	1,0	27,7	13,7	20,9	1,0	2,5	4,3	<LD	1,1	<LD	1574	76,7	68,6
E	NC	8,0	NC	NC	0,1	NC	NC	0,8	NC	NC	12,7	NC	NC	3,4	NC	NC	<LD	NC	NC	66,5	NC
Ref	<LD	17,8	NC	1,6	0,4	NC	0,8	1,4	NC	27,7	11,9	NC	0,9	4,4	NC	<LD	<LD	NC	1179	59,3	NC
Chuvas moderadas																					
Ponto	Metal (µg g ⁻¹) / Espécie																				
	As			Cd			Cr			Cu			Ni			Pb			Zn		
	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f	Crs	M.g	M.f
A	<LD	NC	<LD	0,7	NC	0,1	0,6	NC	1,1	47,2	NC	27,6	0,9	NC	2,6	0,8	NC	<LD	2560	NC	69,4
B	<LD	<LD	<LD	0,6	0,2	0,1	0,5	0,6	0,9	41,4	19,5	26,1	0,9	2,3	2,7	<LD	<LD	<LD	3636	54,7	60,1
C	<LD	<LD	<LD	0,6	<LD	<LD	0,4	0,7	0,8	25,9	35,8	28,4	<LD	2,0	3,1	<LD	<LD	<LD	960	58,4	60,8
D	<LD	8,4	8,3	0,5	0,2	0,2	0,6	1,0	1,4	23,2	21,5	30,2	0,8	2,6	6,0	<LD	<LD	<LD	821	63,3	66,4
E	6,0	6,0	NC	0,7	0,1	NC	0,8	0,8	NC	26,4	16,0	NC	0,8	2,5	NC	<LD	<LD	NC	862	48,7	NC
Ref	7,9	9,5	NC	1,7	0,2	NC	0,8	0,7	NC	27,2	10,7	NC	1,5	4,2	NC	<LD	<LD	NC	1014	43,8	NC

<LD= Abaixo do limite de detecção.

NC= Não coletado.

6.2.4.1 Arsênio (As)

Dentre as espécies estudadas, *M. guyanensis* apresentou maiores níveis de As, sendo os mais elevados no ponto Ref de cada estação climática (figura 8). Na estação chuvosa, o valor encontrado ($17,8 \mu\text{g g}^{-1}$) ultrapassou o nível de $16 \mu\text{g g}^{-1}$, proposto por Cantillo (1998) como indicativo de contaminação. Nos demais pontos amostrados esse nível de As não foi ultrapassado e há indícios de que este elemento ocorre naturalmente no local. *M. falcata* e *Crassostrea* sp. coletados no ponto de referência durante a estação seca também apresentam os maiores níveis de As.

Figura 8: Concentrações de Arsênio (As) nos tecidos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea* sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($16 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998).

6.2.4.2 Cádmio (Cd)

Na figura 9 são apresentadas as variações de concentrações de Cd entre os animais coletados nos diferentes pontos amostrais para cada estação climática. A maior concentração de Cd foi encontrada em mexilhões da espécie *M. falcata*, coletados no ponto A durante a estação seca. O valor foi relativamente alto nestes organismos, quando comparado ao encontrados nas

outras espécies. Entretanto, os animais analisados no presente estudo não podem ser considerados contaminados por Cd segundo os valores indicativos adotados (Cantillo,1998). Na estação seca, os níveis de Cd encontrados nas ostras apresentam aumento de concentração entre os pontos amostrados, em direção à saída do estuário. O mesmo padrão não foi observado nas campanhas seguintes. Na estação moderada, as maiores concentrações de Cd em *Crassostrea* sp ocorreram no sítio de referência.

Figura 9: Concentrações de cádmio (Cd) nos tecidos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea* sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($3,7 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998).

6.2.4.3 Cromo (Cr)

As variações das concentrações de Cr nos bivalves analisados entre os pontos amostrais e estações climáticas estão apresentados na figura 10. As maiores concentrações de Cr foram encontradas nos pontos mais próximos da confluência do Mar de Cananéia com o Mar Pequeno nas duas espécies de mexilhões. A concentração em ostras não apresentou grandes variações entre os pontos amostrais nas três estações climáticas. De acordo com os indicativos propostos por Cantillo (1998), os animais analisados no presente estudo não apresentam valores representativos de contaminação por Cr.

Figura 10: Concentrações de cromo (Cr) nos tecidos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea sp.* provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($2,5 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998).

6.2.4.4 Cobre (Cu)

Os níveis de Cu encontrados em *M. guyanensis* e *M. falcata* foram superiores a $10 \mu\text{g g}^{-1}$ em todos os pontos amostrados nas três campanhas, valor este, tomado como indicativo de contaminação em mexilhões (Cantillo, 1998). Nas ostras analisadas, as concentrações não ultrapassaram o limiar proposto ($300 \mu\text{g g}^{-1}$). No entanto, pode ser observado um aumento nos níveis de bioacumulação deste metal em direção à porção norte do estuário (figura 11). Este padrão foi observado nas três espécies coletadas na estação seca e reflete a influência do aporte proveniente do RRI.

Figura 11: Concentrações de cobre (Cu) nos tecidos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea sp.* provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões ($10 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998). O indicativo para ostras ($300 \mu\text{g g}^{-1}$) não está representado.

6.2.4.5 Níquel (Ni)

As duas espécies de mexilhões apresentaram concentrações elevadas de Ni no ponto de referência, com base no valor de $3,4 \mu\text{g g}^{-1}$, adotado como indicador de contaminação (Cantillo, 1998). Considerando apenas os pontos no Mar de Cananéia no período seco, pode ser observado um gradiente na bioacumulação em direção à boca do estuário. No período chuvoso os maiores níveis de bioacumulação foram observados nos pontos intermediários para espécies *M. falcata*. As concentrações deste metal em *Crassostrea sp.* não apresentaram variações entre os pontos amostrais (figura 12).

Figura 12: Concentrações de níquel (Ni) nos tecidos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea* sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($3,4 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998).

6.2.4.6 Chumbo (Pb)

Na estação seca os organismos da espécie *M. falcata*, coletados no ponto A foram os únicos que apresentaram concentração de Pb acima do valor indicativo de contaminação ($3,2 \mu\text{g g}^{-1}$). Não obstante, a concentração encontrada nestes animais superou o limite adotado em quase 10 vezes. Além disso, pode ser observada diminuição nos níveis de bioacumulação com o distanciamento da confluência do Mar de Cananéia com o Mar Pequeno (figura 13). As concentrações encontradas em *M. guyanensis* e *Crassostrea* sp. não ultrapassaram o nível indicativo proposto. Além disso, mexilhões da espécie *M. guyanensis* apresentaram concentrações de Pb acima do limite de detecção apenas nos pontos C na estação seca e D na estação chuvosa. Em ostras as concentrações foram detectadas apenas nos pontos C e E na estação seca, no ponto A durante os períodos chuvoso e com chuvas moderadas.

Figura 13: Concentrações de chumbo (Pb) nos tecidos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea* sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões e ostras ($3,2 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998).

6.2.4.7 Zinco (Zn)

A maior diferença entre os níveis de bioacumulação de metais em mexilhões e ostras foi observada para o Zn (figura 14). O Zn foi detectado nas duas espécies de mexilhões em todos os pontos de coleta. Entretanto, os valores determinados não ultrapassaram a concentração de $200 \mu\text{g g}^{-1}$, tomada como indicativa de contaminação em mexilhões (Cantillo, 1998).

As concentrações de Zn em ostras são normalmente altas quando comparados a outros grupos de bivalves (O'Connor, 1993). No entanto, os animais coletados no ponto A ultrapassaram a concentração de $4000 \mu\text{g g}^{-1}$, considerada indicativa de contaminação por este metal. Além disso, os valores encontrados nos pontos B durante a estação chuvosa e C na estação com chuvas moderadas se mostraram muito próximos deste limiar ($3907 \mu\text{g g}^{-1}$ e $3636 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente).

Figura 14: Concentrações de zinco (Zn) nos tecidos de bivalves das espécies *Mytella guyanensis*, *M. falcata* e *Crassostrea* sp. provenientes de manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref), nos diferentes regimes climáticos (seco, chuvoso e moderado). A linha contínua corresponde à concentração indicativa de contaminação em ostras ($4000 \mu\text{g g}^{-1}$), a linha tracejada corresponde à concentração indicativa de contaminação em mexilhões ($200 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cantillo, 1998).

Os resultados das correlações de Pearson entre bioacumulação e os níveis dos respectivos metais em sedimentos estão apresentados na tabela 8. Foi observada forte correlação ($>0,7$) para Cu em *M. guyanensis* e *Crassostrea* sp. com os respectivos sedimentos coletados na estação seca. Este metal também apresentou correlação forte entre bioacumulação em *Crassostrea* sp. e sedimentos da terceira campanha (chuvas moderadas). Nos sedimentos da estação seca, Ni foi detectado apenas no ponto de referência, apresentando forte correlação com os níveis deste metal em *M. guyanensis*. Já no período com chuvas moderadas, a bioacumulação de Ni em *Crassostrea* sp. apresentou forte correlação negativa com os níveis encontrados no sedimento.

Tabela 8: Correlação de Pearson entre concentrações de metais nas partes moles dos bivalves (*Crassostrea* sp., *Mytella guyanensis* e *M. falcata*) e nos sedimentos das áreas de coleta cara cada campanha da amostragem. As correlações significativas ($p < 0,05$) estão realçadas.

Condição Climática	Correlações	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Seca (agosto de 2012)	Sedimento/ <i>Crassostrea</i> sp.	ND	-0,64 $p=0,172$	0,54 $p=0,265$	0,97 $p=0,001$	0,10 $p=0,856$	-0,07 $p=0,900$	0,48 $p=0,336$
	Sedimento/ <i>M. guyanensis</i>	ND	0,20 $p=0,701$	-0,14 $p=0,789$	0,83 $p=0,042$	0,83 $p=0,040$	0,06 $p=0,907$	0,18 $p=0,739$
	Sedimento/ <i>M. falcata</i>	ND	0,09 $p=0,913$	-0,38 $p=0,624$	0,88 $p=0,124$	0,72 $p=0,275$	0,30 $p=0,698$	0,20 $p=0,799$
Chuvosa (março de 2013)	Sedimento/ <i>Crassostrea</i> sp.	ND	-0,75 $p=0,143$	0,36 $p=0,552$	0,80 $p=0,106$	-0,44 $p=0,460$	0,85 $p=0,070$	0,12 $p=0,853$
	Sedimento/ <i>M. guyanensis</i>	ND	-0,32 $p=0,679$	0,91 $p=0,091$	0,87 $p=0,127$	0,84 $p=0,164$	0,84 $p=0,162$	-0,25 $p=0,755$
	Sedimento/ <i>M. falcata</i>	ND	-0,52 $p=0,484$	0,71 $p=0,295$	-0,34 $p=0,656$	ND	0,68 $p=0,320$	0,43 $p=0,573$
Moderada (setembro de 2013)	Sedimento/ <i>Crassostrea</i> sp.	0,10 $p=0,848$	-0,96 $p=0,002$	-0,38 $p=0,462$	0,85 $p=0,032$	-0,69 $p=0,127$	0,01 $p=0,990$	-0,06 $p=0,904$
	Sedimento/ <i>M. guyanensis</i>	-0,09 $p=0,890$	-0,64 $p=0,247$	0,33 $p=0,583$	0,42 $p=0,477$	-0,98 $p=0,004$	ND	0,68 $p=0,206$
	Sedimento/ <i>M. falcata</i>	0,49 $p=0,506$	-0,09 $p=0,914$	-0,31 $p=0,690$	-0,74 $p=0,256$	0,29 $p=0,709$	ND	-0,84 $p=0,160$

ND= Não Determinado.

6.3 Caracterização dos efeitos

6.3.1 Ensaios de Toxicidade

Os parâmetros físico-químicos dos sistemas-teste mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis (Melo e Abessa 2002; ABNT 2015) A salinidade variou de 30 a 36; os níveis de oxigênio dissolvido entre 4,65-6,85 mg.L⁻¹. Os valores de pH variaram entre 7,21 e 8,43. O percentual de sobrevivência de *Tiburonella viscana* nas réplicas dos controles experimentais foi superior a 80%. Este percentual foi observado tanto para os sedimentos do local de coleta dos anfípodes (Ilhabela) quanto para os do ponto de referência (Pontal, na Ilha do Cardoso).

Na análise estatística cada um dos controles foi testado frente aos pontos estudados e apresentaram resultados semelhantes. Para as amostras que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) foi considerada existência de toxicidade aguda; na ausência de diferenças estatísticas os sedimentos foram considerados não-tóxicos (figura 15). Dentre as amostras coletadas no período de clima seco, apenas as provenientes dos pontos P2, B e E não apresentaram toxicidade aguda para *T. viscana*. Já na estação chuvosa, apenas as amostras dos pontos P3 e B não foram tóxicas. Em geral, os efeitos observados foram mais proeminentes no período chuvoso, com exceção do ponto D no Mar de Cananéia e dos pontos P1 e P3 no mar de Cubatão.

Figura 15: Percentuais de mortalidade ($\pm$ desvio padrão) de *Tiburonella viscana* nos ensaios de toxicidade aguda com sedimentos coletados nas estações de clima seco e chuvoso. (*) Indica as amostras com diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles experimentais.

6.3.2 Biomarcadores Bioquímicos

6.3.2.1 Metalotioneínas (MT)

Os resultados das determinações MT estão apresentados na figura 16. Concentrações de MT nas brânquias de *M. guyanensis* significativamente maiores ($p < 0,05$) em relação à referência apenas nos ponto C para os animais coletados na estação seca. Na campanha realizada durante estação chuvosa foi observado aumento significativo na concentração de MT apenas no ponto D. Já para os animais coletados no período em que as condições de chuvas eram moderadas, não foram observadas alterações significativas em relação à referência.

Nas brânquias de *M. falcata*, concentrações significativas de MT foram observadas no ponto B. Os mexilhões desta espécie foram encontrados no ponto Ref apenas na primeira campanha, por este motivo as concentrações de MT, bem como a determinação dos outros biomarcadores, não puderam ser comparadas com o ponto de referência. Entretanto, puderam ser observadas elevadas concentrações de MT nas brânquias dos animais coletados durante o período chuvoso.

Figura 16: Concentração de Metalotioneína (MT) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.

6.3.2.2 Tióis não proteicos reduzidos (GSH)

Os resultados das determinações de GSH nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* estão apresentados na figura 17. Para a espécie *M. guyanensis* foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos pontos A, B e E, sendo que o primeiro com concentrações mais elevadas e os dois últimos inferiores em relação à referência. Na estação com chuvas moderadas, concentrações significativamente altas em relação ao Ref foram observadas nos pontos B e C. O conjunto de dados obtidos para *M. falcata* não apresentaram as variações observadas para *M. guyanensis*, mas a análise destes dados ficou comprometida por não terem sido entrados no sítio de referência durante os períodos de chuvas intensas e moderadas. Para os animais coletados durante a estação seca, concentrações de GSH foram significativamente inferiores nas brânquias de *M. falcata* em relação à referência ($p < 0,05$), nos pontos D e E.

Figura 17: Concentração tióis não proteicos reduzidos (GSH) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.

6.3.2.3 Glutathione S-transferase (GST)

Os resultados das determinações da atividade de GST nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* estão apresentados na figura 18. Dentre os organismos da espécie *M. guyanensis* coletados no período seco, apenas os do ponto B apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à

referência. Na estação chuvosa, a atividade de GST foi significativa nos animais provenientes do ponto C. No período de chuvas moderadas, embora a atividade de GST tenha sido mais elevada nos animais de todos os locais amostrados, não foram observadas diferenças significativas em relação à referência. Em brânquias de *M. falcata*, foram observadas diferenças significativas para organismos de todos os pontos amostrados. Entretanto, apenas no ponto E foi observado aumento, nos demais a atividade enzimática foi inibida. Este biomarcador foi o que apresentou maior diferença nos resultados obtidos para as duas espécies de mexilhões, com uma ordem de magnitude mais elevada em *M. guyanensis*, para os pontos do Mar de Cananéia. Entretanto, na única campanha em que *M. falcata* foi encontrada no ponto de referência os valores foram próximos aos da outra espécie neste mesmo período.

Figura 18: Atividade enzimática de Glutathione S-transferase (GST) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). *falcata* As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.

6.3.2.4 Glutathione peroxidase (GPx)

Os resultados obtidos na determinação da atividade enzimática de GPx em brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* estão apresentados na figura 19. Para *M. guyanensis*, os animais do ponto A apresentaram atividade significativamente mais elevada que nos mexilhões do ponto de referência no período seco. Nesta mesma estação climática, os organismos dos pontos B e E

apresentaram menor atividade enzimática de GPx com diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos coletados no ponto referência. Na estação com chuvas moderadas, a atividade foi mais elevada e significativa nos organismos dos pontos B, C, D e E. Os resultados obtidos para *M. guyanensis* apresentaram grandes variações dentro de cada ponto amostral e diferentes estações climáticas. Já em *M. falcata*, os resultados foram mais homogêneos, entretanto, esta espécie não foi encontrada no ponto de referência durante os períodos de intensidade alta e moderada de chuvas. Na campanha de baixa pluviosidade, pôde ser observada inibição significativa de GPx nas brânquias de organismos coletados no ponto E.

Figura 19: Atividade da enzima Glutathiona peroxidase (GPx) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.

6.3.2.5 Glutathiona redutase (GR)

Os resultados das determinações da atividade enzimática de GR nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* estão apresentados na figura 20. Na estação seca, a atividade de GR se apresentou significativamente inibida nas brânquias de *M. guyanensis* provenientes do E. Na estação chuvosa, foram observadas inibições significativas nos organismos dos pontos D e E. Com relação à *M. falcata*, os animais coletados durante a estação seca nos pontos A, B e E apresentaram inibição significativa da atividade de GR.

Figura 20: Atividade da enzima Glutathione redutase (GR) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.

6.3.2.6 Acetilcolinesterase (AChE)

Os resultados das determinações da atividade enzimática de Acetilcolinesterase (AChE) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* estão apresentados na figura 21. Para *M. guyanensis*, não foram observadas inibições significativas de AChE em relação aos organismos do ponto de referência. Já para *M. falcata*, os animais provenientes dos pontos C e D (estação seca) apresentaram inibição significativa da atividade em relação aos animais do sítio de referência.

Os animais coletados no período de chuvas moderadas apresentaram atividade enzimática mais elevada, quando comparados aos de outras estações climáticas. Este padrão foi observado nas duas espécies de mexilhões, e sensivelmente superior em *M. guyanensis*, com a devida ressalva de que as duas espécies não ocorreram simultaneamente em todas as estações de coletas.

Figura 21: Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.

6.3.2.7 Peroxidação lipídica (LPO)

Os resultados das determinações da Peroxidação lipídica (LPO) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* estão apresentados na figura 22. Na estação seca, os efeitos em *M. guyanensis* foram significativos nos animais dos pontos C, D e E. Neste último ponto, a peroxidação lipídica na brânquia dos animais foi bastante acentuada, com média de efeito quase seis vezes superior ao que foi observado nos animais da referência (figura 22).

Na estação chuvosa os efeitos observados nos organismos dos pontos C, e E foram significativamente mais elevados, ultrapassando em até cinco vezes o valor encontrado nos animais do sítio de referência. No período de chuvas moderadas os níveis de LPO foram mais elevados nos animais em todos os pontos coletados, inclusive os de referência. Em comparação com este sítio, os organismos dos pontos C e D apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), porém, por apresentarem menores níveis de efeito. Para *M. falcata* coletados na estação seca, os organismos que mostraram diferenças significativas em relação à referência foram os pontos B e E, sendo mais pronunciada nos animais deste último.

Figura 22: Peroxidação lipídica nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.

6.3.2.8 Danos em DNA

Os resultados das determinações de Danos em DNA (quebra das fitas) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* estão apresentados na figura 23. Para *M. guyanensis*, os animais coletados na estação seca apresentaram danos significativamente maiores nos pontos A, C e D. Além disso, os animais oriundos do ponto A foram os que apresentaram níveis de danos mais pronunciados entre todos os locais e condições climáticas.

Na estação chuvosa apenas o lote de organismos do ponto D apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). No período de chuvas moderadas os mexilhões dos pontos C e E apresentaram diferenças significativas em relação à referência. Já para *M. falcata*, não foi observada diferença significativa em nenhum dos pontos amostrais. No entanto, os efeitos observados nos animais coletados durante o período chuvoso foram relativamente altos, apresentando a mesma magnitude de efeito de *M. guyanensis*.

Figura 23: Danos em DNA (quebra das fitas) nas brânquias de *M. guyanensis* e *M. falcata* coletadas em manguezais às margens do Mar de Cananéia (A - E) e Pontal, Ilha do Cardoso (Ref) durante as três condições climáticas avaliadas (seco, chuvoso e moderado). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto de referência nos respectivos períodos.

6.4 Integração dos dados

6.4.1 Abordagem Ecotoxicológica

Os dados geoquímicos e os resultados dos ensaios de toxicidade obtidos na estação seca e chuvosa foram submetidos à ACP (análise de componentes principais). Observou-se associação entre a toxicidade obtida nos ensaios com *T. viscana* em sedimento integral e os níveis de metais em sedimentos das duas campanhas, porém, com diferenças entre os pontos amostrados.

Para a campanha realizada no período seco, os três primeiros fatores explicam 85,13% da variância total (tabela 9), os quais podem ser relacionados da seguinte forma:

(I) O fator 1 (F1) explica 43,5% da variância total, e agrupou a maioria dos metais encontrados nos sedimentos (exceto Ni), a toxicidade para *T. viscana*, além dos teores de finos (silte e argila). (II) O fator 2 (F2) explica 27,8% da variância total, indicando fortes correlações entre finos, MO e CaCO_3 , que se correlacionam negativamente com os metais Fe e Mn. (III) O fator 3 (F3) explica 13,8% da variância total, apresentando associações entre MO e Fe, que correlacionaram negativamente com Cr, Ni e Zn.

Os escores fatoriais estimados para cada ponto amostral no período seco estão apresentados graficamente na figura 24. No fator 1 as variáveis com escores positivos foram importantes nos pontos E e Ref, e os escores negativos em P1, P2, P3, B e C. O fator 2 apresentou importância de escores positivos nos pontos P1 e A, enquanto que em P2, P3, B, C, D e E a predominância foi de escores negativos. Já no Fator 3 as variáveis com escores positivos foram predominantes nos pontos B e C; e os escores negativos foram importantes em P1, A, D e E.

Tabela 9: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos e toxicidade dos sedimentos coletados durante a estação seca. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.

Variáveis	% da variância explicada		
	43,5	27,8	13,8
	F1	F2	F2
Finos	-0,54	-0,78	-0,10
MO	-0,17	-0,76	-0,40
CaCO ₃	-0,20	-0,90	-0,07
Tox	-0,81	0,20	-0,30
Cd	-0,86	0,28	0,31
Cr	-0,69	-0,17	0,58
Cu	-0,86	0,32	0,12
Ni	0,69	0,40	0,44
Pb	-0,93	-0,08	-0,15
Zn	-0,40	-0,49	0,66
Fe	-0,51	0,61	-0,54
Mn	-0,70	0,58	0,09

Figura 24: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos nos manguezais do Mar de Cubatão (P1 - P3), Mar de Cananéia (A - E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período seco.

Na ACP dos dados geoquímicos e de toxicidade para estação chuvosa os três primeiros fatores explicam 82,8% da variância (tabela 10), e apresenta as seguintes relações:

(I) O fator 1 (F1) explica 49,7% da variância total indicando a condição estuarina, sob influência marinha. Esta associação foi verificada pelos coeficientes de MO e CaCO₃, relacionados negativamente com os metais, exceto Zn. (II) O fator 2 (F2) explica 22,3% da variância total, mostrando correlações entre toxicidade, MO, CaCO₃, e Pb, Cd, Cu e Zn. (III) O fator 3 (F3) explica 10,9% da variância total e as associações não são tão claras quanto as

do período seco. São observadas associações entre Ni, Mn e os carreadores MO e finos.

A representação gráfica dos escores fatoriais estimados para a estação chuvosa está apresentada na figura 25. No fator 1 as variáveis com escores positivos foram importantes em P2, C, D e E, enquanto que em P1 e A foram aquelas com escores negativos. O fator 2 não apresentou variáveis positivas > 0,40. No Fator 3 as variáveis com escores positivos foram importantes em P2, P3, A e B; e as com escores negativos predominantes em P1, C e D.

Tabela 10: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos e toxicidade dos sedimentos coletados durante a estação chuvosa. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.

Variáveis	% da variância explicada		
	49,7	22,3	10,9
	F1	F2	F3
Finos	0,37	-0,73	-0,44
MO	0,62	-0,59	-0,46
CaCO ₃	0,83	-0,41	-0,13
Tox. aguda	0,09	-0,48	-0,20
Cd	-0,70	-0,57	0,04
Cr	-0,97	-0,07	0,09
Cu	-0,84	-0,46	0,07
Ni	-0,60	0,29	-0,52
Pb	-0,78	-0,59	0,21
Zn	0,41	-0,57	0,57
Fe	-0,90	-0,29	0,01
Mn	-0,82	0,17	-0,45

Figura 25: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos nos manguezais do Mar de Cubatão (P1 - P3), Mar de Cananéia (A - E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período chuvoso.

6.4.2 Abordagem bioquímica

Os dados de contaminação e toxicidade em sedimentos das áreas de manguezais do Mar de Cananéia durante a estação seca foram integrados aos resultados de bioacumulação e biomarcadores em *M. guyanensis* através de ACP. Os quatro primeiros fatores explicam 94,3% da variância (tabela 11), com os quais foram realizadas as seguintes relações:

(I) O fator 1 explica 38,3% da variância, indicando associação entre toxicidade em *T. viscana*, os metais Cd, Cu, Pb, Fe e Mn no sedimento, metais Cr, Cu e Zn nos tecidos, os biomarcadores de exposição MT, GSH, GPx, GR e o biomarcador de efeito dano em DNA. (II) O fator 2 explica 25,6% da variância total e mostra a associação entre os carreadores geoquímicos, Pb no sedimento, Pb e Zn nos tecidos, peroxidação lipídica e a inibição da atividade de AChE. Inversamente, apresenta associação entre Ni em sedimento, bioacumulação de As, Cd, Cu e Ni e GPx. (III) O fator 3 explica 16,8% da variância e associou Cd, Cr e Zn encontrados nos sedimentos com GST e AChE, e negativamente com MT e LPO. (IV) o fator 4 explica 13,5% da variância e mostrou associações entre Pb em sedimentos, bioacumulação de Cu e aumento da atividade enzimática de GST. Inversamente, associou Cr e Ni, encontrados em sedimento, com bioacumulação de Cd e Pb, e com a atividade de GR.

Os escores fatoriais dos pontos amostrais, estimados para conjunto de dados da estação seca, incluindo biomarcadores e bioacumulação em *M. guyanensis*, estão apresentados na figura 26. No fator 1 os escores positivos foram predominantes para os pontos E e Ref; e os escores negativos para os pontos A, B, C e D. No Fator 2 as variáveis com escores positivos foram importantes nos pontos C, D e E; e aquelas com escores negativos foram importantes nos pontos A e Ref. O fator 3 apresentou predominância de escores positivos nos pontos B e C, enquanto que os pontos A, D e E foram predominadas por variáveis com escores negativos. No fator 4 as variáveis com escores positivos foram importantes em A, B e E; já os escores negativos foram importantes em C e no ponto de referência.

Tabela 11: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos, toxicidade dos sedimentos, bioacumulação e biomarcadores bioquímicos em mexilhões da espécie *M. guyanensis* coletados durante a estação seca. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.

Variáveis	% da variância explicada			
	38,3 F1	25,6 F2	16,8 F3	13,5 F4
Finos	0,08	0,92	0,31	0,13
MO	0,13	0,88	-0,33	-0,32
CaCO ₃	0,16	0,95	0,24	-0,04
Tox.	-0,85	0,32	-0,15	-0,23
Cd-Sed	-0,74	-0,15	0,62	-0,08
Cr-Sed	-0,35	0,26	0,75	-0,49
Cu-Sed	-0,85	-0,12	0,37	0,35
Ni-Sed	0,52	-0,74	0,06	-0,40
Pb-Sed	-0,68	0,49	0,29	0,45
Zn-Sed	-0,33	0,32	0,82	-0,30
Fe-Sed	-0,75	-0,16	-0,64	0,00
Mn-Sed	-0,79	-0,28	0,26	0,01
MT	-0,72	0,30	-0,47	-0,35
GSH	-0,94	-0,07	0,23	0,10
GST	0,36	-0,01	0,54	0,76
GPx	-0,73	-0,45	-0,38	-0,31
GR	-0,46	-0,09	0,25	-0,63
AChE	-0,12	-0,62	0,71	0,32
LPO	0,53	0,51	-0,47	0,27
Dano DNA	-0,93	-0,20	-0,25	0,11
As-Bio	0,81	-0,50	-0,06	-0,30
Cd-Bio	0,32	-0,48	0,34	-0,60
Cr-Bio	-0,81	-0,45	-0,36	0,10
Cu-Bio	-0,79	-0,39	-0,13	0,45
Ni-Bio	0,09	-0,98	-0,03	-0,15
Pb-Bio	-0,30	0,44	0,14	-0,77
Zn-Bio	-0,78	0,44	-0,34	-0,02

Figura 26: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos e *M. guyanensis* no Mar de Cananéia (A – E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período seco.

O resultado da ACP, para integração dos dados de contaminação e toxicidade em sedimentos durante a estação seca e os biomarcadores em *M. falcata*, está apresentado na tabela 12. Os quatro primeiros fatores explicam 94,3% da variância total, sendo que:

(I) O fator 1 explica 39,3%, com associação entre os metais encontrados nos sedimentos, exceto Ni, teores de finos, toxicidade dos sedimento, dano em DNA e atividade dos biomarcadores de exposição, exceto a GST - que foi inibida na maioria dos pontos amostrados (aumentou no ponto E). (II) O fator 2 explica 27,6% da variância total, evidenciando associações entre Cd, Ni, Fe e Mn em sedimentos com GSH, GST, GPx e GR. Inversamente, estão associados os carreadores geoquímicos LPO e MT. (III) O fator 3 explica 14,4% da variância total, apresentando Cr e o Zn associados com atividade de GR e danos em DNA. (IV) O fator 4 explica 13,1% da variância total e apresenta associação entre MO e o Fe, toxicidade aguda e aumento da atividade dos biomarcadores GPx e AchE.

Na figura 27 estão representados, graficamente, os escores fatoriais do conjunto de dados com *M. falcata*. O fator 1 apresenta variáveis com escores positivos predominantes em A, B e C; e as com escores negativos nos pontos E e Ref. No Fator 2 os escores positivos foram importantes nos pontos A e Ref e os negativos em B e D. O Fator 3 apresenta variáveis com escores positivos importantes em A e E; e as com escores negativos importantes em B, C, D e Ref. Já no Fator 4 as escores positivos foram predominantes no ponto D, e os negativos em B, E e Ref.

Tabela 12: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos, toxicidade dos sedimentos e biomarcadores bioquímicos em mexilhões da espécie *M. falcata* coletados durante a estação seca. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.

Variáveis	% da variância explicada			
	39,3	27,6	14,4	13,1
	F1	F2	F3	F4
Finos	0,43	-0,79	-0,38	0,19
MO	0,05	-0,70	-0,13	0,49
CaCO ₃	0,34	-0,86	-0,31	0,06
Tox. Aguda	0,70	0,21	0,07	0,64
Cd-Sed	0,81	0,43	-0,03	-0,38
Cr-Sed	0,67	0,11	-0,66	-0,16
Cu-Sed	0,84	0,35	0,28	-0,15
Ni-Sed	-0,71	0,54	-0,36	-0,26
Pb-Sed	0,89	-0,21	0,12	0,19
Zn-Sed	0,73	-0,05	-0,50	-0,40
Fe-Sed	0,26	0,41	0,71	0,46
Mn-Sed	0,66	0,48	0,40	-0,38
MT	0,84	-0,44	-0,05	-0,02
GSH	0,77	0,60	0,13	0,18
GST	-0,71	0,53	-0,39	-0,25
GPx	0,34	0,75	-0,38	0,43
GR	-0,24	0,66	-0,64	0,30
AChE	-0,39	0,00	-0,27	0,77
LPO	-0,32	-0,85	0,24	-0,34
Dano DNA	0,82	-0,09	-0,44	-0,17

Figura 27: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos e *M. falcata* no Mar de Cananéia (A – E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período seco.

Os dados de contaminação e toxicidade em sedimentos das áreas de manguezais do Mar de Cananéia durante a estação moderada foram integrados aos resultados de bioacumulação e biomarcadores em *M. guyanensis* através de ACP. Nesta campanha *M. falcata* não foi encontrada em dois pontos amostrais, portanto, não foi aplicada a ACP para esta espécie. Os dois primeiros fatores explicam 79,32% da variância total (tabela 13), com os quais foram realizadas as seguintes interpretações das associações:

(I) O fator 1 explica 63,2% da variância total. Pode ser observada uma associação entre os carreadores geoquímicos (finos, CaCO_3 , MO), todos os metais medidos no sedimento, Cu e Zn em tecido, bem como MT, GSH, GPx, e dano em DNA. Também, foram associados os metais As, Cd e Ni encontrados nos tecidos com LPO. (II) O fator 2 explica 16,2% da variância total, onde pode ser observada associação entre GSH, GST, GR, AChE e Cu nos tecidos, ao mesmo tempo em que As, Cd e Cr nos tecidos estiveram negativamente associados.

Os escores fatoriais de cada ponto amostral estão representados graficamente na figura 28. No fator 1 as variáveis com escores positivos foram predominantes em todos os pontos, exceto Ref, que foi predominado pelas variáveis com escores negativos. O fator 2 apresentou importância de escores positivos nos pontos C e Ref, enquanto que D e E foram predominados pelas variáveis com escores negativos. No Fator 3 as variáveis com escores positivos foram predominantes em B e as com escores negativos em C, D e E.

Tabela 13: Resultado da análise de componentes principais do tipo fatorial para dados geoquímicos, toxicidade dos sedimentos e biomarcadores bioquímicos em mexilhões da espécie *M. guyanensis* coletados durante a estação com chuvas moderadas. As variáveis com cargas $\geq \pm 0,40$ (em realce) foram considerados componentes dos fatores.

Variáveis	% da variância explicada		
	63,2	16,2	14,2
	F1	F2	F3
Finos	0,97	-0,16	-0,19
MO	0,89	-0,35	0,28
CaCO ₃	0,92	0,16	-0,34
Al	0,96	-0,16	-0,01
As	0,68	-0,32	-0,64
Ba	1,00	-0,06	0,06
Cd	0,98	-0,18	0,03
Cr	0,97	-0,15	-0,14
Cu	0,81	-0,04	0,58
Ni	0,97	-0,12	-0,11
Pb	0,90	-0,05	0,44
Zn	0,98	-0,14	-0,05
Fe	0,96	-0,21	-0,05
MT	0,55	-0,14	0,53
GSH	0,52	0,46	0,71
GST	0,03	0,96	-0,10
GPx	0,89	0,03	0,43
GR	-0,21	0,82	-0,36
AChE	0,39	0,91	-0,07
LPO	-0,90	-0,34	0,08
Dano DNA	0,49	0,04	-0,83
As - Bio	-0,73	-0,52	-0,41
Cd - Bio	-0,74	-0,44	0,50
Cr - Bio	0,26	-0,60	-0,53
Cu - Bio	0,75	0,54	-0,29
Ni - Bio	-1,00	-0,01	0,00
Zn - Bio	0,73	-0,11	-0,14

Figura 28: Escores fatoriais estimados para cada ponto amostral de sedimentos e *M. guyanensis* no Mar de Cananéia (A – E) e Pontal na Ilha do Cardoso (Ref), avaliados durante o período de chuvas moderadas.

7 DISCUSSÃO

O Complexo Estuarino-Lagunar Cananéia-Iguape (CELCI) passou por significativas transformações geomorfológicas e na composição biológica residente devido à abertura do Canal do Valo Grande, que incrementou o fluxo de água doce e consequentemente de metais associados. No entanto, a região concentra *hot-spots* de biodiversidade e diversos estoques de recursos vivos economicamente exploráveis. Tais atributos justificam a importância ecológica e socioeconômica da região, que se insere em um mosaico de unidades de conservação de proteção integral e de uso sustentável, além de possuir *status* de Reserva da Biosfera (Reserva da Biosfera da Mata Atlântica) e Patrimônio Natural da Humanidade segundo a UNESCO. Por esses motivos, o CELCI muitas vezes foi genericamente apresentado como área de referência em estudos ambientais (Azevedo *et al.*, 2009a; 2009b; 2011; 2012a; 2012c; Kirschbaum *et al.*, 2009).

Contudo, estudos pretéritos apontaram a existência de contaminação por metais ao longo do Rio Ribeira de Iguape (RRI), seu principal tributário. O histórico de contaminação por metais no Vale do RRI é bem conhecido, estando relacionado à atividade de mineração, ocorrida majoritariamente entre os anos de 1945 e 1995. Os resíduos originados por esta atividade foram indiscriminadamente lançados no leito do rio, sendo estimado que mensalmente fossem despejadas 5,5 toneladas de material rico em As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn (Cassiano, 2001). Apenas na década de 1990 esta prática foi interrompida, entretanto, o resíduo passou a ser depositado em aterros ou pilhas situados próximos às margens, sem qualquer medida para evitar a contaminação das áreas adjacentes, de modo que o material continuou sendo erodido e/ou lixiviado para dentro do rio.

Estudos apontaram a liberação de metais, a partir dos rejeitos, tanto na forma dissolvida quanto associada aos sedimentos de corrente. Este material sofre precipitação como carbonatos ou adsorvido a argilominerais como películas de oxi-hidróxidos de Fe e Mn, causando contaminação nos sedimentos do RRI. De acordo com a CETESB (2008), as concentrações de Fe e Mn são naturalmente altas na bacia do Rio Ribeira de Iguape, e o pH alcalino das águas RRI, não favorecem a mobilidade dos metais na fração dissolvida

(Moraes *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2005) e tendem a ser adsorvidos pelas partículas finas e/ou ao carbono orgânico. Com relação ao transporte e à liberação de elementos químicos, Rodrigues (2008) ressalta que valores de pH são extremamente importantes para a caracterização da mobilidade dos metais e como a bacia do Rio Ribeira de Iguape está situada numa região rica em rochas carbonáticas, valores altos de pH seriam esperados nas águas e nos sedimentos.

Nesse sentido, o histórico de contaminação por metais no Vale do Rio Ribeira de Iguape é bem conhecido, com evidências de transporte destes contaminantes ao CELCI, principalmente associados aos sedimentos finos (silte e argila) em suspensão. Assim sendo, os metais podem alcançar o setor sul do CELCI, estando sujeito à acumulação nos sedimentos, principalmente na zona de turbidez máxima do Mar de Cananéia. De fato, os dados secundários (levantados durante o processo de caracterização do agente estressor) fornecem evidências níveis mais elevados de metais em sedimentos e biota do Mar Cananéia do que no mar Cubatão. Estas informações podem ser associadas com a circulação hídrica no interior do estuário, que favorece a sedimentação do material oriundo do Canal do Valo Grande.

Tendo em vista a necessidade de preservação dos recursos naturais de tais áreas, é proposta a avaliação dos riscos ecológicos nesta porção do estuário. Uma abordagem buscando a Avaliação de Risco Ecológico consiste no peso de evidências (Depledge e Fossi, 1994; Chapman *et al.*, 2002), visando a determinação dos possíveis impactos dos estressores em múltiplas linhas de evidência. Deste modo, a relevância ecológica da exposição pode ser determinada de maneira integrada e indicar o estado ambiental do ecossistema como um todo. No presente estudo, as linhas de evidência utilizadas foram o ensaio de toxicidade aguda, cinco biomarcadores de exposição, e três de efeito, além da determinações dos metais em sedimento e biota. Desta forma foi possível caracterizar a exposição e os efeitos biológicos. Os dados apontam para o estabelecimento de relações entre as fontes de contaminação, a exposição e a ocorrência de efeitos adversos aos organismos.

Os trabalhos analisados para caracterização dos estressores mostraram que a matéria orgânica e a fração pelítica dos sedimentos marcam uma ligeira diferença nas distribuições espaciais das concentrações dos

metais, evidenciando os principais pontos de retenção na porção sul do CELCI. O transporte de material particulado ao longo do estuário e os processos de ressuspensão são influenciados pelos movimentos de marés, pelos fluxos de água doce, e contribuem para as diferenças na composição dos sedimentos de superfície e sua toxicidade, nem sempre estabelecidos pelos aportes locais.

Conforme os resultados do presente estudo, os pontos mais próximos à confluência com o Mar Pequeno foram os que apresentaram maiores concentrações de determinados metais nas diferentes estações climáticas, sendo destacados aqueles elementos associados com os resíduos de mineração e metalurgia (Abessa, 2016), como o Cu e o Pb. Considerando as três estações climáticas, para Cu, Fe, Mn e Pb foram observados gradientes de concentração com o afastamento do Valo Grande, muito embora os níveis mais elevados tenham variado entre pontos adjacentes. Para o mesmo período, Gusso-Choueri *et al.* (2015; 2016) e Araujo (2014) observaram variações espaciais nas concentrações máximas de metais, que foram relacionadas principalmente com os aportes de água doce e deslocamento da zona de turbidez máxima. Esta feição aponta para uma forte influência do RRI nas concentrações destes metais, uma vez que Cu e Pb já foram encontrados em concentrações acima do ISQG em sedimentos de corrente do RRI, enquanto que Fe e Mn ocorrem naturalmente em concentrações elevadas na bacia hidrográfica, estando também associados aos resíduos de mineração.

No presente estudo as variações entre máximas contrações sazonais observadas foram principalmente entre os pontos amostrais A, B e C. Estes locais apresentaram diferenças de salinidade durante a maré baixa nos momentos de coleta. Durante a estação seca os valores de salinidade medidos em campo foram 10 (ponto A), 17 (ponto B) e 20 (ponto C); na estação chuvosa os valores encontrados nos mesmos pontos foram 6, 7, e 10 para A, B e C, respectivamente e; na estação com chuvas moderadas foram 10, 11 e 15, respectivamente. Portanto, esta variação segue o deslocamento da zona de turbidez máxima, uma vez que esta ocorre nas áreas com variação de salinidade entre 4 e 10, com alta reatividade dos elementos-traço (Kennish, 1997). Esse padrão é coerente com dados obtidos por outros autores (Gusso-Choueri *et al.*, 2015; 2016; Araujo, 2014) no CELCI.

As concentrações de metais encontradas no presente estudo são próximas às encontradas por outros estudos realizados na região (tabela 3). Além disso, em alguns pontos amostrados, as concentrações superaram os valores utilizados como orientadores, sejam aqueles propostos pela CCME (2002) ou os Valores de Qualidade de Sedimentos (VQS) que Choueri *et al.* (2009) propuseram para o Complexo Estuarino de Paranaguá. Considerando este último, em todos os pontos as concentrações ultrapassaram os limiares de efeito provável para As, Cu, Pb e Zn e os metais Cr e Ni ultrapassaram os limiares de efeito possível na maioria, exceto no ponto A.

Considerando particularmente o As, as concentrações encontradas superam ao reportados em sedimentos de fundo e ativo de corrente no RRI (Abessa, 2016). Entretanto, Anjos (2006) observou níveis de As em águas superficiais do Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá em concentrações mais elevadas que os encontrados para outras regiões estuarinas. Segundo a autora, fatores geológicos podem estar relacionados com seus achados. De maneira semelhante, Sá (2003) investigou a geoquímica do arsênio nos sedimentos superficiais da baía de Paranaguá e reportou concentrações altas (com base nos valores orientadores), variando de 0,60 a 10,99 $\mu\text{g g}^{-1}$. O autor observou que o Fe apresenta relação positiva com As, sendo que 70% do metaloide na coluna d'água apresentaram-se na fase dissolvida. O autor discute o papel do Fe como principal agente geoquímico na mobilidade e distribuição do As, juntamente com as condições hidrodinâmicas e conclui que o grau de piritização do metaloide é intensificado nas regiões eutróficas do estuário. No presente estudo, os altos níveis de As apresentam um gradiente de concentração em direção ao norte (Mar Pequeno) e pode estar relacionado com o grau de piritização deste metaloide indicado por Sá (2003). No entanto, mais estudos são necessários para compreender a geoquímica do As no CELCI e avaliar as contribuições naturais e antrópicas para esse elemento.

De todo modo, para os metais analisados neste estudo, os resultados obtidos corroboram o fato de que a matéria orgânica e a fração pelítica dos sedimentos são os principais fatores locais associados com as diferenças nas distribuições espaciais das concentrações dos metais, evidenciando os principais pontos de retenção na porção sul do CELCI. Porém, no ponto A, cujos sedimentos apresentaram os mais baixos valores de matéria orgânica e

porcentagem de finos dentre os pontos estudados no Mar de Cananéia, aparentemente há uma menor taxa de deposição. Nesse caso, durante os períodos seco e chuvoso os valores altos de metais em relação aos demais pontos poderiam estar relacionados com a sua proximidade do Mar Pequeno e um aporte contínuo de metais para esse local (figura 7). Neste local as concentrações de Cu, Cr e Pb foram menores na estação seca; por outro lado, Fe, Mn e Zn tiveram maiores concentrações no período seco, sugerindo que a deposição dos metais nos sedimentos do CELCI é um fenômeno complexo que depende de vários fatores, inclusive o próprio comportamento do elemento químico considerado. No período de chuvas moderadas, em que o sistema aparenta ter uma condição mais homogênea, os sedimentos coletados no ponto A apresentaram menores concentrações de todos os elementos estudados, exceto Cu (figura 8).

Com os resultados apresentados, é possível observar que o transporte de material particulado rico em metais ao longo do estuário e os processos de ressuspensão são influenciados claramente pela intensidade do fluxo da drenagem continental. Na estação com chuvas moderadas a condição mais homogênea da distribuição dos metais, bem como as menores concentrações da maioria dos metais no ponto A, pode ser o indicativo de condições mais estáveis, sem grandes amplitudes de salinidade e fluxo intenso de águas continentais. Porém, como demonstrado, os dados geoquímicos indicam a presença de metais nos sedimentos do CELCI, em níveis teoricamente capazes de causar efeitos nocivos à biota; ou seja, pode haver exposição dos receptores biológicos (biota) aos metais carregados pelo RRI para o CELCI,

As concentrações de metais em sedimentos em diversos pontos amostrados excedem os valores orientadores de qualidade de sedimentos, sugerindo entradas constantes destes poluentes no setor sul do CELCI. Adicionalmente, os resultados mostram que existe bioacumulação destes contaminantes em bivalves filtradores. Porém, a ausência de animais em alguns pontos de coleta para determinadas estações climáticas compromete uma comparação clara neste sentido. Entretanto, foi possível identificar algumas tendências, semelhantes às encontradas nos sedimentos, pois a distribuição dos metais nos tecidos dos bivalves pareceu ser semelhante àquela observada nos sedimentos. Para Cd, Cu e Ni, além da semelhança na

distribuição espacial, as concentrações destes metais encontradas nos bivalves apresentaram fortes correlações com as encontradas nos sedimentos dos respectivos locais de coleta (tabela 8).

De maneira semelhante ao observado para os sedimentos, as concentrações de As nos animais do ponto de referência foram mais elevadas que nos organismos coletados no Mar de Cananéia. Além disso, há uma tendência na diminuição dos níveis deste elemento nos pontos mais ao norte do estuário. Este fato poderia estar relacionado com ocorrências naturais deste metaloide e seu comportamento químico no interior do estuário (Sá, 2003).

Os níveis de metais nos bivalves foram relativamente altos, superando as concentrações indicativas de contaminação adotada (Cantillo, 1998). As ostras apresentaram maiores níveis de Cu e Zn, corroborando com as informações de que este grupo de bivalves normalmente possui maior capacidade de bioacumulação do que os mexilhões (O'Connor, 1993; Cantillo, 1998). Porém, para os metais que apresentam a mesma concentração indicativa de contaminação para os dois grupos de bivalves, os mexilhões apresentaram maiores níveis de As, Cd, Cr, Ni e Pb que as ostras.

Como apresentado, a bioacumulação nos bivalves foi avaliada em base seca, conforme a proposta de comparação para determinação dos indicativos de contaminação. Entretanto, outros trabalhos realizados no CELCI apresentaram determinações em base úmida, o que permite a comparação com valores de segurança de consumo propostos por agências reguladoras. Nesse sentido, o trabalho desenvolvido por Barros e Barbieri (2012) avaliou a concentração destes metais em ostras da espécie *Crassostrea brasiliana*. Estes animais são coletados e manejados nos manguezais da região para consumo humano. As concentrações de Pb, nas partes moles dos animais, variaram de 0,230 a 0,236 ppm na base úmida (b.u.), sendo superiores às encontradas nos sedimentos. O Zn apresentou as maiores concentrações entre os metais estudados, com níveis médios variando entre 20,1 e 24,1 ppm (b.u.). Entretanto, estes valores estão abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira e preconizados pelo órgão regulador brasileiro (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA), bem como por agências internacionais, por exemplo, a Comissão Europeia (CE). Os padrões estabelecidos são de 1,5 ppm (b.u.) para Pb em moluscos bivalves (ANVISA,

2013; CE, 2006) e de 50,0 ppm (b.u.) para Zn (generalizado para produtos de pesca) (Brasil, 1965). Apesar de estarem abaixo dos níveis considerados de risco, estes animais tem forte interação com os sedimentos e tendem a acumular metais em seus tecidos (Rebello *et al.*, 2003). Além disso, os animais do estudo supracitado foram coletados no Mar de Cubatão, onde as concentrações de metais nos sedimentos são menores que as reportadas no Mar de Cananéia (tabela 13).

Em um estudo pretérito com a espécie *C. brasiliiana*, foram medidos os níveis de metais nos tecidos de animais coletados no Mar de Cubatão, tendo sido encontrados, na base úmida, 0,02 ppm de Hg, 0,08 ppm de Pb, 0,11 ppm de Cd, 2,6 ppm de Cu e 393 ppm de Zn (Machado *et al.*, 2002). Somente a concentração de Zn esteve acima do limite máximo de 50,0 ppm (b.u.), estabelecido pela legislação brasileira (Brasil, 1965). Cabe ressaltar que o zinco está fisiologicamente presente, em níveis relativamente elevados, nas células da glândula digestiva dos bivalves (Viarengo *et al.*, 1997). Apesar de compreenderem a maior parte dos elementos presentes na tabela periódica, são poucos os metais essenciais para a vida, tais como Ca, Na, Zn, Cu e Fe. No entanto, a maioria dos metais conhecidos pode ser tóxica aos organismos quando em excesso, mesmo aqueles considerados essenciais (Ballatori, 2002).

De acordo com relato histórico, ostras eram encontradas ao longo de todo o CELCI e atualmente sua ocorrência está limitada ao setor sul (Mendonça e Machado, 2010). Este impacto foi causado pelas alterações nas propriedades físico-químicas das águas (i.e. forte diminuição da salinidade) do setor norte devido à abertura do Canal do Valo Grande.

Diversos trabalhos têm sido realizados para detectar a presença de metais na biota do CELCI (tabela 14), majoritariamente utilizando peixes como modelo de bioacumulação. Fernandez *et al.* (2014) compararam as concentrações de metais em tecidos de peixes da espécie *Mugil curema* coletados no estuário de Cananéia e em outro estuário da região sudeste do Brasil (Santos, SP). Nesse estudo os níveis de Cu e Zn nos animais coletados ao redor da Ilha de Cananéia se mostraram extremamente altos, com valores médios, em base úmida, de 406 ppm e 116 ppm, respectivamente. Diferentemente das concentrações que foram encontradas em ostras da região (Machado *et al.*, 2002; Barros e Barbieri, 2012), os valores estão acima dos

limites máximos de tolerância estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 1965), sendo de 30,0 para Cu e de 50,0 ppm para Zn. Merece destaque a concentração média de Cu nesses animais que, apesar de ser um metal essencial, chegou a ocorrer em níveis 13 vezes acima do limite permitido. Além disso, o nível de Cu nos peixes do CELCI foi superior ao valor encontrado nos peixes do estuário de Santos (282 ppm), local reconhecidamente impactado pelas atividades industriais e portuárias. No entanto, cabe a ressalva de que as concentrações acima dos limites preconizados foram encontradas em tecido hepático e normalmente o músculo é utilizado para consumo humano.

Um aspecto interessante apresentado por Fernandez *et al.* (2014) foi a ausência de diferença significativa, nas concentrações elementares, entre as duas áreas estudadas (CELCI e estuário de Santos). O Sistema Estuarino de Santos - São Vicente possui alta densidade demográfica e é a região costeira mais industrializada do Brasil, ao contrário do CELCI, uma região com baixa densidade populacional e ausência de atividades econômicas de grande escala (Morais e Abessa, 2014). Observação semelhante já havia sido feita por Azevedo *et al.* (2012b). Os autores avaliaram a presença de metais em tecidos de duas espécies de peixes (*Cathorops spixii* e *Genidens genidens*) e não encontraram diferenças significativas nas concentrações de Zn entre os animais coletados nos dois estuários supracitados.

Em outro estudo, Azevedo *et al.* (2009a) identificaram presenças significativas de Fe, Co, Se e Zn em tecidos de peixes da espécie *C. spixii* provenientes do Mar de Cananéia. Os animais coletados no CELCI apresentaram níveis de Fe mais elevados que com os provenientes de Santos (4,84 ppm e 3,08 ppm, respectivamente). Os autores atribuíram esta diferença ao metabolismo mais efetivo que pode ser desenvolvido pelos animais de Cananéia, considerando o papel do Fe nos sistemas biológicos como micronutriente. Dentre os outros elementos analisados por Azevedo *et al.* (2009a) nos animais do CELCI, o selênio foi encontrado em concentração média de 12,73 ppm (em base seca), valor muito superior a 0,03 ppm, o limite estabelecido para alimentos sólidos na legislação brasileira (Brasil, 1965).

Contudo, outros trabalhos compararam a presença de metais em peixes do CELCI com os do estuário de Santos-São Vicente e, normalmente, são encontradas diferenças na contaminação, com uma magnitude maior nos

animais da área industrializada. Em um estudo de avaliação das concentrações de mercúrio (Hg) em músculo da espécie *C. spixii*, os animais do estuário de Santos apresentaram a maior concentração de 1,085 ppm (b.u.), maior que o valor máximo de 0,231 ppm (b.u.) encontrados nos animais de Cananéia, coletados no Mar de Cubatão (Azevedo *et al.*, 2009b).

Em uma publicação mais recente, Azevedo *et al.* (2012c) reportaram valores máximos de Hg (base úmida) em músculo (0,194 ppm) e tecido hepático (1,036 ppm) em peixes da espécie *C. spixii* coletados no Mar de Cananéia. Embora o fígado não seja consumido por humanos, o valor encontrado neste órgão excede os níveis preconizados pela legislação brasileira (ANVISA, 2013) e por agências internacionais (FAO/WHO, 2002; EC, 2006). Os limites de consumo são concordantes entre todas estas agências (para o Hg, 0,5 ppm em pescado não-predador e 1,0 ppm para peixes piscívoros). Esta diferença nos valores de referência se deve à posição trófica de cada espécie, já que este é um fator importante na bioacumulação (Sweet e Zelikoff, 2010). Assim, concentrações elevadas de Hg poderiam ser transferidas para outros níveis da cadeia trófica no CELCI.

Segundo Azevedo *et al.* (2012a), a presença de Hg no CELCI pode ser parcialmente explicada pela presença de uma mina de ouro abandonada e a uma indústria de fertilizantes, ambas localizadas próximas à porção norte do estuário. No entanto, cabe a ressalva de que o Hg pode ser proveniente de diversas fontes difusas, por exemplo, pelo transporte atmosférico (Fitzgerald *et al.*, 1998), dispersão através de sedimentos em suspensão pela drenagem continental (Mol *et al.*, 2001) ou em tecidos de espécies aquáticas e/ou aves migratórias (Wiener e Spry, 1996).

No mais recente registro de contaminação em peixes do CELCI, Gusso-Choueri *et al.* (2016) reportaram a presença de altos níveis de metais em tecidos de *C. spixii* coletados no Mar de Cananéia. As concentrações máximas, em base úmida, encontradas em fígado foram 146,70 ppm de Cu; 537,84 ppm de Zn; 39,28 ppm de Cr; 6,39 ppm de Pb e 1,58 ppm de Cd. Em músculo as máximas concentrações encontradas foram 65,57 ppm de Zn; 73,22 ppm de Pb; 13,64 ppm de Cd e 5,73 ppm de As. Os valores de Pb, Cd e As estão acima dos preconizados pelos órgãos reguladores, tanto em instância nacional quanto internacional, cujos limites são 0,3; 0,05 e 1,0,

respectivamente (FAO/WHO 2002; EC, 2006; ANVISA, 2013). Os valores reportados são alarmantes, principalmente por terem sido encontrados nas partes comestíveis de uma espécie consumida na região.

Além de espécies comercialmente exploradas também existe registro de metais em cetáceos da espécie *Sotalia guyanensis* (Salgado, 2015) e tartarugas da espécie *Chelonia mydas* (Barbieri, 2009), encontradas no estuário de Cananéia. Os principais metais encontrados em fígado de *S. guyanensis* (b.u) foram Zn (37,7 ppm), Pb (1,94 ppm), Cu (14,18), Cd (0,07 ppm) e Cr (2,84 ppm). De acordo com Salgado (2015), o Pb teve a maior variação e média descritas para a espécie. Com relação à *Chelonia mydas*, foram encontrados níveis de Cu e Ni no fígado, com valores médios de 39,9 ppm e 0,28 ppm, respectivamente. Os maiores níveis de Cd foram encontrados nos rins desses animais, cuja concentração média foi de 2,18 ppm. As concentrações de Pb foram relativamente altas tanto no fígado quanto nos rins, com valores médios de 0,37 e 0,56 ppm, respectivamente (Barbieri, 2009). Embora estes animais tenham sido encontrados no estuário, as fontes de contaminação podem ser alóctones, uma vez que as tartarugas migram longas distâncias entre áreas de alimentação.

Tabela 14: Concentrações de metais e As reportados na biota do Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape. Concentrações em base úmida (média± DP) expressos em ppm. Os valores mínimos e máximos também são apresentados quando disponíveis.

Espécie	n	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Ni	Pb	Zn	Referência
<i>Crassostrea brasiliiana</i>	69		0,11 ± 0,04 (0,02 - 0,22)		2,8 ± 0,96 (1,5 - 7,7)		0,02 ± 0,01 (<DL - 0,03)		0,8 ± 0,03 (0,04 - 0,17)	402 ± 188 (145 - 844)	Machado <i>et al.</i> (2002)
	NR		<DL		0,2 ± 0,002			0,02 ± 0,01	0,24 ± 0,01	20,4 ± 9,8	Barros e Barbieri (2012)
<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^a	NR		1,01 ± 0,21 (0,88 - 1,46)								Cruz (2014)
<i>Genidens genidens</i> (músculo)	10		0,01 (0,003 - 0,01)		0,04 (0,01 - 0,07)		0,21 (0,01 - 0,26)		0,06 (0,03 - 0,07)	0,01 (0,01 - 0,02)	Azevedo <i>et al.</i> (2012b)
	5					4.838 ± 580 (3.419 - 5,501)	0,25 ± 0,001 (0,25 - 0,26)			1,11 ± 0,14 (0,95 - 1,21)	Azevedo <i>et al.</i> (2009a)
<i>Cathorops spixii</i> (fígado)	15		0,02 - 1,24		1,08 - 4,78				0,02 - 0,58	100 - 850	Azevedo <i>et al.</i> (2012a)
	20						1,04				Azevedo <i>et al.</i> (2012c)
	225	0,01 (0,0001-0,04)	0,34 (0,11 - 1,58)	10,21 (0,08 - 39,28)	41,5 (0,1 - 146,7)			<0,09	0,86 (0,11 - 6,39)	243,82 (110,9 - 537,8)	Gusso-Choueri <i>et al.</i> (2016)
	152						0,1 (<0,03 - 0,35)				Azevedo <i>et al.</i> (2009b)
<i>C. spixii</i> (músculo)	60						0,08 (0,02 - 0,35)				Azevedo <i>et al.</i> (2011)
	225	0,54 (0,002 - 5,7)	3,19 (<0,11 - 13,6)	< 0,08	< 0,1			119,53 (<0,1 - 339,3)	24,09 (<0,1 - 73,2)	23,07 (9,19 - 65,57)	Gusso-Choueri <i>et al.</i> (2016)
<i>C. spixii</i> (brânquias)	15		0,001 - 0,005		0,15 - 0,83				0,04 - 0,41	145 - 926	Azevedo <i>et al.</i> (2012a)
<i>Micropogonias furnieri</i> (músculo)	11						0,24 ± 0,11 (0,11 - 0,44)				Curcho <i>et al.</i> (2009)
<i>Mugil curema</i> (fígado)	156				406 ± 182	791 ± 260				116 ± 17	Fernandez <i>et al.</i> (2014)
(rim)	149				6,6 ± 2,3	802 ± 415				59 ± 11	
<i>Chelonia mydas</i> (fígado)	30		0,957 ± 0,31		39,9 ± 1,94			0,28 ± 0,08	0,37		Barbieri (2009)
(rim)	30		2,18 ± 0,27		13,72 ± 1,15			0,19 ± 0,02	0,57		
<i>Sotalia guianensis</i> (fígado)	21		0,07±0,03 (0,02-0,13)	2,84±1,39 (1,28-4,8)	14,18±19,21 (2,12-53,1)	82,77±37,85 (32,3-141,5)		0,37±0,30 (0,26-0,48)	1,94±1,41 (0,47-4,7)	37,7±15,1 (19,9-59,8)	Salgado (2015)

Os valores encontrados no presente estudo não estão apresentados, pois estão em base seca.

Conforme pode ser observado, a distribuição dos contaminantes no CELCI é influenciada pelas condições climáticas, as quais também contribuem para as diferenças na biodisponibilidade. Além disso, a presença dos metais nem sempre é estabelecida pela proximidade dos aportes locais e pode ser mais efetiva em áreas mais distantes, acompanhando os processos deposicionais dentro do sistema estuarino. A biodisponibilidade dos metais encontrados nos sedimentos foi refletida não só pela bioacumulação, mas também através da utilização de estudos toxicológicos.

Os resultados dos ensaios de toxicidade com *Tiburonella viscana* evidenciaram toxicidade aguda dos sedimentos da maioria dos pontos amostrais, independentemente da estação climática. Na estação seca, apenas as amostras provenientes dos pontos P2, B e E não apresentaram toxicidade. Já na estação chuvosa, apenas as amostras dos pontos P3 e B não foram tóxicas. Em geral, os efeitos observados foram mais proeminentes no período chuvoso, com exceção do ponto D no Mar de Cananéia e dos pontos P1 e P3 no mar de Cubatão. Os sedimentos do ponto B não foram tóxicos em nenhuma das campanhas testadas. Toxicidade eventual foi constatada nos sedimentos dos pontos P3, P2 do Mar de Cubatão e no ponto E do Mar de Cananéia; porém, como se trata de toxicidade aguda, os resultados sugerem impactos pelo menos moderados. Já os sedimentos coletados nos demais pontos amostrais apresentam toxicidade aguda. Como pôde ser visto nas análises multivariadas, a toxicidade dos sedimentos geralmente esteve associada com os metais (em especial aqueles relacionados com as minerações do alto RRI) e seus carreadores geoquímicos.

Através da ACP para o período seco, a tendência observada é que os metais encontrados nas áreas de mineração estão sendo transportados por carreadores geoquímicos (em especial os sedimentos finos em suspensão) até o setor sul do CELCI, dadas as correlações obtidas no primeiro fator da ACP, para Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, Fe e Mn (tabela 9), sendo estes dois últimos encontrados naturalmente em abundância na bacia do RRI. Adicionalmente, estas variáveis estão relacionadas com os pontos P1, o local mais próximo do Mar Pequeno; e ponto C (figura 24), que apresentou bioacumulação e resposta para a maioria dos biomarcadores. As associações observadas no fator 2 pode ser relacionada à menor aporte continental durante este período e maior

influência marinha, especialmente quando observada a relação com o ponto E o mais próximo da barra de Cananéia (figura 24).

As análises multivariadas realizadas com o conjunto de dados geoquímicos e de toxicidade para estação chuvosa indicou uma condição estuarina sob influência marinha. Esta condição foi verificada pelos coeficientes de MO e CaCO_3 , relacionados negativamente com os metais (tabela 10). Além disso, conforme foi observado na primeira campanha, existe uma relação entre os metais que sabidamente são encontrados no Vale do Ribeira e os pontos mais próximos da influencia do RRI. Nesta campanha o foi observada associação da toxicidade com os pontos intermediários do Mar de Cubatão (P2 e P3) e Mar de Cananéia (ponto B) (figura 25). Estas informações, juntamente com a relação entre finos e alguns metais tóxicos, podem ser um indicativo de que houve o deslocamento da zona de turbidez máxima à jusante. Assim, é possível que chuvas intensas na região, somado ao aporte acentuado de metais pelo Valo Grande (dado o alto índice pluviométrico na região do alto Vale do RRI) tenham favorecido o acúmulo destes metais nos pontos citados. Neste período, mesmo que os pontos A e P1 continuem apresentando maiores concentrações de metais, parece haver uma diminuição dos gradientes observados na campanha anterior e os processos de mistura turbulenta parecem influenciar a complexidade dos dados.

Variações no grau de toxicidade dos sedimentos do CELCI em diferentes épocas do ano são comumente observadas. Desde 2010 a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) tem realizado semestralmente o monitoramento da qualidade de sedimentos da CELCI e apresenta três pontos amostrais no Mar de Cananéia. Para estas avaliações são utilizados em ensaios de toxicidade crônica com a espécie de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e de toxicidade aguda com o anfípodo *Leptocheirus plumulosus*. CETESB classifica os sedimentos como “ótimo”, “bom”, “regular”, “ruim” e “péssimo”, conforme o percentual de efeitos sobre os organismos-teste. Segundo a CETESB (2011), no ano de 2010 o Mar de Cananéia teve a qualidade dos sedimentos classificada como “ruim”, devido à toxicidade crônica em *L. variegatus*. Em 2011 (CETESB, 2012) não foi evidenciada toxicidade. No entanto, em 2012 os três pontos avaliados neste corpo hídrico foram classificados como péssimos, devido às altas taxas de mortalidade de *L.*

plumulosus (> 50%) e baixo percentual de desenvolvimento embrionário (< 25%) nos ensaios com *L. variegatus* (CETESB, 2013). No monitoramento de 2013 (CETESB, 2014) foi constatada toxicidade crônica em um dos pontos amostrados e a qualidade dos sedimentos foi classificada como “ruim”, sendo ressaltada a presença de metais em níveis inferiores, porém próximos, aos ISQG. Em 2014, dois pontos amostrais apresentaram toxicidade crônica nos sedimentos, sendo um classificado como “regular” e outro com qualidade “péssima” (CETESB, 2015).

Cruz *et al.* (2014), encontraram toxicidade crônica e aguda em sedimentos coletados no Mar de Cananéia. Nesse estudo, amostras de sedimentos superficiais foram coletadas no período seco de 2010. Todas as coletadas (total de oito pontos amostrais) apresentaram toxicidade crônica para o copépodo bentônico *Nitocra* sp. (efeitos sobre fecundidade dos organismos). A toxicidade aguda foi caracterizada pelo efeito letal em *T. viscana*, evidenciada em três pontos amostrais nas adjacências do núcleo urbano. Segundo os autores, a toxicidade crônica dos sedimentos superficiais está relacionada com o aporte de contaminantes pelo RRI. Além disso, a toxicidade aguda foi atribuída às entradas adicionais provenientes de um conjunto de fontes antrópicas localizadas em Cananéia, devido à proximidade destas estações amostrais com área mais urbanizada do CELCI.

Toxicidade crônica também foi observada por Cruz (2014) em amostras de sedimentos superficiais do Mar de Cananéia. Nesse trabalho, os sedimentos coletados durante dois períodos (seco e chuvoso) nos anos de 2012 e 2013 (este último coincidente com o presente estudo) afetaram o desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus*, caracterizando toxicidade crônica. Além disso, a autora também avaliou a toxicidade de sedimentos do mar Pequeno e observou variações de intensidades de efeitos entre períodos seco e chuvoso, principalmente no Mar de Cananéia. Esta seria uma evidência de que os contaminantes provenientes do RRI são transportados para o setor sul do CELC.

Os testes de toxicidade e as análises de bioacumulação indicaram efeitos de contaminantes biodisponíveis e absorção de metais. Entretanto, de acordo com o modelo SEM/AVS utilizados no presente estudo, os metais encontrados nos sedimentos dos pontos amostrais não estavam

biodisponíveis. Segundo Di Toro *et al.* (1992), quanto maior for a relação $\Sigma\text{SEM}/\text{AVS}$ maior será o potencial da amostra para ser tóxica. Ankley (1996) aponta para o fato de que mesmo quando há uma concentração excessiva da soma de metais (muito acima das concentrações de sulfetos) os metais podem estar ligados em outros complexos, como matéria orgânica, bem como adsorvidos em partículas. Neste caso, valores de $\Sigma\text{SEM}/\text{AVS} > 1,0$ não indicariam necessariamente potencial tóxico, já que os metais poderiam estar indisponíveis para os organismos; essa razão por outro lado poderia indicar, com maior segurança, ausência de toxicidade quando os valores fossem menores do que 1.

No presente estudo, os resultados observados para toxicidade e a relação com SEM/AVS não foram concordantes. O único ponto que não apresentou toxicidade teve a relação $\Sigma\text{SEM}/\text{AVS} > 1,0$. Conforme mencionado, isso pode ser devido ao fato de que a abordagem SEM/AVS considera como biodisponível somente a fração dissolvida na água intersticial. Um estudo com copépodos bentônicos (Decho e Fleeger, 1988) demonstrou que esses organismos ingerem partículas de sedimento e microbiota associada, podendo ativar metais imobilizados, tornando-os tóxicos (Araujo *et al.*, 2013). Adicionalmente, Torres *et al.* (2015) ressaltam que, embora a abordagem utilizando AVS possa ser útil para avaliar a via de exposição quando se trata de metais dissolvidos, pode não ser eficaz para avaliar a biodisponibilidade quando a principal via de exposição é a ingestão de alimentos contaminados, ou quando ela depende da modificação das condições ambientais.

A adsorção dos metais em partículas, principalmente em matéria orgânica, pode disponibilizar estes contaminantes através de outras vias de exposição. Deste modo, a alimentação é particularmente importante no presente estudo, uma vez que os anfípodes utilizados nos ensaios de toxicidade são detritívoros e os bivalves ingerem partículas pela filtração. Portanto, embora não haja um excesso de concentrações de AVS em relação às concentrações de SEM, os metais podem estar biodisponível através da ingestão de sedimentos. Estes achados corroboram o trabalho de Campos *et al.* (2016), os quais consideraram que SEM/AVS não foi uma abordagem adequada para avaliar a biodisponibilidade de metais na região ao norte do CELCI, Segundo os autores, embora as toxicidades tenham correlacionado

com as concentrações de metais, em especial a soma de metais simultaneamente extraídos.

Além da bioacumulação de metais em bivalves e da toxicidade dos sedimentos, no presente estudo foi avaliado se os organismos residentes nas áreas de manguezais são afetados negativamente. As respostas de biomarcadores bioquímicos indicaram que a saúde de mexilhões *M. guyanensis* e *M. falcata* é significativamente afetada pela exposição aos sedimentos contaminados. Na ACP aplicada para o período seco, associações observadas entre Cd, Cu e Pb nos sedimento, Cr, Cu e Zn nos tecidos de *M. guyanensis* e os biomarcadores MT, GSH, GPx e dano em DNA medidos nesta espécie, somados à toxicidade em *T. viscana* (tabela 11), evidenciam efeito dos metais em diferentes níveis biológicos. Nesta mesma análise os pontos A, B, C e D foram relacionados às variáveis citadas (figura 26), enquanto que os pontos E (mais à jusante do estuário) e Ref mostraram relações negativas.

Ainda nas análises com *M. guyanensis* da estação seca, foi evidenciada uma relação entre a contaminação ambiental pelo Pb, a bioacumulação, e efeitos bioquímicos. Tal relação foi observada pela associação entre a presença de Pb (sedimento e tecidos), bioacumulação de Zn, peroxidação lipídica e a inibição da atividade de AChE. Ademais, a associação entre GPx e bioacumulação de As, Cd, Cu sugere que para esses elementos, há indução de mecanismos de depuração. Entretanto, os animais coletados pontos B e E apresentaram baixa atividade de GPx. Em geral, bivalves que foram expostos a metais tendem a exibir um aumento significativo na expressão de enzimas antioxidantes (Marie *et al.*, 2006, Diniz *et al.*, 2007). No entanto, existem registros de que diversas enzimas apresentam diminuição significativa de atividade. Em mexilhões da espécie *P. perna*, por exemplo, metais como o Cd, Fe, Cu e Pb são capazes de diminuir a atividade da GPx e níveis de GSH, além de produzir peroxidação lipídica (Almeida *et al.*, 2004; Dafre *et al.*, 2004).

Nesse sentido, a ACP aplicada para a estação seca também evidenciou associação entre Pb em sedimentos, bioacumulação de Cu e aumento da atividade enzimática de GST em *M. guyanensis* (tabela 11). Inversamente, foi observada associação entre bioacumulação de Cd e Pb com atividade de GR. Através destas associações é possível observar um indicativo

dos mecanismos de depuração ao Pb e Cu, utilizando as vias de conjugação e sistema antioxidante. Além disso, é sabido que a GPx atua na remoção de H_2O_2 , a partir da oxidação e reação com a glutathione reduzida (GSH). Porém, nem sempre a GPx é ativada, uma vez que a remoção da H_2O_2 pode ocorrer mediante outras vias metabólicas, especialmente pela Catalase (Kono e Fridovich, 1982; Regoli *et al.*, 2011). Todavia, a atividade desta enzima não foi avaliada no presente estudo.

Conforme observado para *M. guyanensis* dos pontos B e E durante a estação seca, GPx em mexilhões da espécie *M. falcata* do ponto E também apresentaram atividade inibida. Entretanto, através da ACP os metais Cd, Ni, Fe e Mn (sedimento) apresentaram associação com GPx, bem como GSH, GST e GR (tabela 12). Além disso, foram observadas associações entre metais encontrados nos sedimentos, dano em DNA e atividade dos biomarcadores de exposição, com exceção da GST, que foi inibida na maioria dos pontos amostrados. Adicionalmente, esta análise também mostrou associação entre MO, Fe (sedimentos), aumento da atividade dos biomarcadores GPx e AChE, e a toxicidade obtida nos ensaios de toxicidade aguda. As associações supracitadas mostram um cenário claro da ação dos estressores sobre os organismos estudados.

A atividade de AChE foi inibida nas brânquias de *M. falcata* apenas nos animais coletados no ponto C durante a estação seca. Na literatura são apresentadas evidências de que a atividade da AChE pode responder a metais em algumas situações (Elumalai *et al.*, 2002). Entretanto, nos organismos do ponto D, a atividade da AChE foi significativamente mais elevada. Para *M. guyanensis*, a AChE respondeu de forma variável, com tendência de aumento da atividade nas campanhas realizadas nos períodos chuvoso e moderado; essa tendência foi também observada na ACP.

Conforme apresentado, a GST foi outra enzima que eventualmente mostrou-se inibida nos organismos estudados. Essa enzima é conhecida por ser influenciada por diferentes poluentes, os quais são conjugados com a GSH durante a fase II das reações catalisadas pela GST, e por eventos de estresse oxidativo (Hermes-Lima, 2004; Van Der Oost *et al.*, 2003). Em *M. falcata* foram observadas diferenças significativas de diminuição da atividade da GST nos animais dos pontos A, B C e D, a aumento da atividade nos animais do ponto

E. Para esta espécie, a atividade da GST pareceu ter sido inibida pela maioria dos metais analisados no sedimento, conforme indicado pela ACP. Segundo Bainy *et al.* (2000), a exposição aos poluentes pode gerar diferentes respostas em relação à GST, sendo mais comum o aumento da sua atividade (Martín-Díaz *et al.*, 2007; 2008; Vieira *et al.*, 2009). Entretanto, outros estudos reportaram inibição de GST durante a exposição a metais (Elumalai *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2007; Abessa, 2016), em especial o Cu, que aparece como um dos principais contaminantes na região do CELCI. Em *M. guyanensis*, a atividade da GST tendeu a estar significativamente aumentada no ponto C durante estação chuvosa e no ponto B período chuvas moderadas. Adicionalmente, neste último foi observada associação entre o aumento da atividade desta enzima com o Cu em sedimentos, a qual foi evidenciada na ACP (tabela 13).

Alguns estudos avaliaram o potencial redox de tecidos branquiais, relacionado ao metabolismo aeróbico dos organismos aquáticos. Estes trabalhos apontam alterações devido ao estresse em condição de privação de oxigênio e reoxigenação em decorrência do ciclo de maré (Oliveira *et al.*, 2005; Togni, 2007). Em algumas espécies, um dos métodos de prevenção contra danos causados por ERO resultantes da reoxigenação é a produção/ativação de enzimas durante o período de anóxia, em especial a GST. Este mecanismo é acionado visando o combate aos danos do estresse oxidativo, pois quando a maré sobe (e os animais recomeçam a respirar) ocorre uma explosão de ERO, que precisa ser combatido pelo sistema anti-oxidante. O aumento da atividade da GST nos indivíduos de *M. falcata* coletados no ponto E durante o período seco pode ter sido influenciado por esse fenômeno, já que as concentrações de metais nos tecidos foram em geral relativamente menores nos animais desse local. Entretanto, não pode ser descartada a maior proximidade deste ponto amostral à área urbanizada do município de Cananéia. Assim, os organismos deste local poderiam estar sendo expostos a diferentes classes de contaminantes além dos metais.

Como consequência de um funcionamento ineficiente dos sistemas anti-oxidantes, pode ocorrer lipoperoxidação nas membranas e danos em DNA. No presente estudo, em *M. falcata* houve tendência de aumento de LPO apenas no período seco, enquanto em *M. guyanensis* LPO foram observados

em todos os períodos climáticos estudados. Cabe a ressalva de que os maiores valores de LPO ocorreram nos animais do ponto de referência no período moderado. Deste modo, embora os níveis encontrados nos pontos B e D tenham sido mais elevados (comparados às outras estações climáticas), as análises estatísticas apontaram diminuição significativa de efeito.

Quanto aos danos de DNA, os indivíduos de *M. guyanensis* coletados nos pontos com maior ocorrência de metais exibiram tendência de aumento em relação aos organismos do ponto de referência, enquanto que em *M. falcata* não se observou alterações significativas quanto a este parâmetro. As associações observadas entre metais e danos em DNA nas ACP com *M. guyanensis* são representativos de efeitos causados pela contaminação. Os danos em DNA seriam causados pelo estresse oxidativo induzido pela produção direta e indireta de ERO dentro do núcleo, ou pela formação de eletrófilos e aductos, que causariam oxidação do DNA e/ou a fragilização dos cromossomos (Abessa, 2016).

No CELCI, biomarcadores bioquímicos foram empregados por Azevedo *et al.* (2009b) em peixes da espécie *C. spixii* coletados no Mar de Cubatão e no Mar de Cananéia (próximo à sua ligação com o oceano), com o intuito de avaliar exposição e possíveis efeitos de metais na área. Não foram observadas alterações no conteúdo de metalotioneínas, peroxidação lipídica (LPO) e na atividade da enzima δ -ALAD (desidratase do ácido d-aminolevulínico). Diante destes resultados e da ausência de contaminação significativa por Hg nos tecidos dos peixes (0,09 ppm b.u.) os autores consideraram a área como não impactada.

Araujo (2014) utilizou biomarcadores bioquímicos em Siris da espécie *Callinectes danae* em um estudo de avaliação de impacto no CELCI. Como resultado, o estudo apontou que estes crustáceos apresentaram alteração na atividade de GPx, GST, bem como peroxidação lipídica e danos de DNA. Em uma abordagem multivariada integrando a contaminação dos sedimentos estuarinos, essa autora verificou que as concentrações de metais nestas matrizes estão sendo suficientes para exercer efeitos negativos sobre a biota nativa. Tal afirmação foi baseada no fato de os níveis de GSH medidos nos hepatopâncreas dos organismos estarem correlacionados aos sedimentos mais finos no Mar de Cananéia e com peroxidação lipídica. Esta conclusão repousa

na premissa de que ambientes hipóxicos tendem a causar diminuição nos níveis de GSH (Hauser-Davis *et al.*, 2014) e a relação positiva observada nas análises indica que a peroxidação lipídica não foi causada por níveis de oxigênio baixos e sim pelos metais que foram encontrados nos finos. Deste modo, a contaminação por metais teria ativado o sistema de conjugação, que por sua vez induz a produção de ERO, causando a peroxidação lipídica nos tecidos de *C. danae*. Araujo (2014) identificou também que os animais coletados durante o inverno apresentaram maior atividade enzimática do que os coletados no verão, evidenciando que a sazonalidade tem forte influência sobre as respostas dos biomarcadores nos animais estudados. Segundo este trabalho, os sedimentos coletados na área central do Mar Pequeno e no mar de Cananéia apresentaram maiores concentrações de metais, o que poderia ter induzido o estresse oxidativo, identificados pela atividade enzimática. Os siris coletados no Mar de Cananéia foram os que apresentaram maior resposta pelos biomarcadores durante o verão, observados pela LPO e pelos danos em DNA. Já os organismos da área central do Mar Pequeno apresentaram resultados qualitativos semelhantes no inverno, com aumento da atividade enzimática de GPx. O estudo mostrou ainda inibição AChE durante o verão, em comparação com os resultados de inverno, tanto para os organismos do Mar Pequeno quanto do Mar de Cananéia. De acordo com Devi e Fingerhman (1995), inibição AChE apresenta um grande potencial para servir como um biomarcador de poluição por metais. Porém, no presente estudo, como já discutido, a atividade da AChE pareceu ter sido aumentada como resposta aos metais, sendo necessários mais estudos para avaliar como esta enzima responde aos diferentes metais e sua combinação com fatores abióticos presentes em ambientes estuarinos.

Em um estudo recente de avaliação da qualidade ambiental do CELCI foi utilizado um conjunto de análises tendo como ferramenta biomarcadores bioquímicos em diferentes órgãos de *C. spixii* (Gusso-Choueri *et al.*, 2015). Os autores analisaram a atividade de GST, GPx e AChE, bem como a quantificação de metalotioneínas, GSH, LPO e danos no DNA. Assim, concluíram que o Pb pode ter tido grande relevância na neurotoxicidade sobre *C. spixii*, evidenciado pela atividade de AChE em peixes contaminados. Além disso, observaram diferenças sazonais nos efeitos adversos sobre os peixes

entre os setores norte e sul do CELCI. Durante a estação seca, as concentrações corpóreas de metais e respostas dos biomarcadores foram maiores no setor sul. Por outro lado, durante a estação chuvosa os organismos mais afetados tinham sido coletados próximo ao Canal do Valo Grande, na área central do Mar Pequeno (setor norte), bem como no Mar de Cananéia próxima à sua conexão com o Mar Pequeno. Estes resultados apontam para grande influência do RRI, devido ao maior arrasto de contaminantes pelo aumento do fluxo de suas águas.

O período chuvoso também foi preponderante nos resultados de um estudo de citogenotoxicidade em peixes coletados no Mar de Cananéia. Kirschbaum *et al.* (2009) avaliaram eritrócitos de *Centropomus parallelus* coletados no estuário de Cananéia e identificaram anormalidades nucleares (AN) ligeiramente maiores no verão (período chuvoso) do que no inverno (período seco). Porém, tais anomalias não foram altas o suficiente para o local ser considerado impactado. As frequências de AN (‰) foram de 0,030 no inverno e de 0,355 no verão, inferiores às observadas nos peixes da mesma espécie coletados na região de Santos (3,575 no inverno e 2,935 no verão). Já Azevedo *et al.* (2012d), identificaram frequência de AN (‰) em peixes da espécie *C. spixii* de 2,4 no inverno e 4,9 no verão.

Diante destas evidências e das discutidas anteriormente, é possível que ainda hoje os metais estejam sendo transportados do Vale do RRI para a porção sul do CELCI. Este transporte é particularmente maior em períodos com alta incidência de chuvas, e que durante as estações mais secas do ano ocorra maior concentração destes contaminantes nos sedimentos e sua transferência para a biota. Além disso, apesar das influências advindas de fatores abióticos e bióticos sobre as respostas dos biomarcadores, os resultados do presente estudo mostram que as respostas bioquímicas foram bastante relacionadas pela presença dos metais. Esta relação foi observada tanto nos sedimentos quanto em tecidos das espécies analisadas, permitindo afirmar que a exposição aos metais provoca respostas metabólicas e efeitos negativos sobre os organismos.

A integração dos resultados, juntamente com as informações da literatura, mostra que os resíduos de mineração estão sendo carregados ao setor sul do CELCI. Os metais, associados fortemente ao material particulado

(sobretudo as partículas de argila e silte), são eficientemente transportados até o estuário onde as condições físico-químicas podem favorecer a sua dispersão pelo estuário, com posterior acúmulo nas áreas deposicionais, a partir das quais pode haver a exposição e a biodisponibilidade (figura 29; tabela 15), já que é observada a bioacumulação nas espécies de bivalves *M. falcata*, *M. guyanensis* e *Crassostrea* sp. Além disso, os metais introduzidos no estuário podem causar efeitos, tanto para os organismos filtradores (como é o caso dos bivalves utilizados como modelo biológico) quanto para aqueles que podem ingerir material depositado (como os organismos-teste da espécie *T. viscana*).

Figura 29: Modelo conceitual de risco ecológico com base nos dados obtidos para o setor sul do Complexo Estuarino Lagunar Cananéia-Iguape.

Os resultados observados indicam que a exposição destes animais aos sedimentos contaminados por metais oriundos do RRI pode afetar negativamente a saúde desses organismos, e inclusive causar mortalidade, como no caso dos anfípodes. Portanto, os dados apontam para o estabelecimento de relações entre as fontes de contaminação, a exposição e a ocorrência de efeitos biológicos negativos, iniciando nos organismos bentônicos filtradores, caracterizando assim risco ecológico (tabela 15).

Resultado similar já havia sido observado para áreas do alto e médio Rio Ribeira de Iguape, como resultado da contaminação provocada pelo descarte de resíduos de mineração (Abessa, 2016). Os resultados encontrados no presente estudo e da literatura referente ao CELCI evidenciam que altas concentrações de metais permanecem entrando no estuário, mesmo depois de mais de uma década do fim das atividades de mineração no Vale do Ribeira.

As Áreas de Proteção Ambiental foram estabelecidas como uma importante estratégia para preservar os ecossistemas e evitar impactos negativos devido a atividades antrópicas (Day *et al.*, 2012). Na legislação brasileira a APA-CIP também está inserida em uma categoria estabelecida para alcançar um equilíbrio sustentável entre os usos dos recursos naturais e proteção dos ecossistemas (Moraes, 2004). No entanto, a ocorrência de toxicidade e contaminação por metais em sedimentos do CELCI representam ameaças para os objetivos de conservação e indicam que esta designação não está sendo totalmente eficaz. De fato, o estabelecimento de uma APA não assegura a sua proteção, e impactos ambientais têm sido reportados (Terlizzi *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013). Este tipo de situação tem sido amplamente discutido nos últimos anos (Barber *et al.*, 2004; Cicin-Sain e Belfiore 2005; Lausche, 2011), uma vez que a simples nomeação de uma região como APA não a torna instantaneamente “protegida” (Jameson *et al.*, 2002).

As fontes de poluentes situadas no exterior das APA não são controladas, e este distúrbio pode afetar os ecossistemas situados dentro da área protegida (Kelleher, 1999). Portanto, tais fontes de poluição estão além do controle dos gestores da APA e os impactos não são facilmente mitigados (Jameson *et al.*, 2002). Assim, quando a gestão de uma área protegida não der resposta adequada às áreas circundantes, a proteção pode não ser bem sucedida. De acordo com Salm *et al.* (2000) um dos primeiros passos para a reverter esta situação seria a concepção de um plano de gestão adequado para a estratégia de proteção. Deste modo, devem ser realizadas pesquisas com esforços e ferramentas adequadas para alcançar este objetivo. Diante do apresentado, um plano de gestão adequado é necessário para garantir a proteção da CIP-PA; que envolveriam políticas para controlar as fontes de contaminação a montante do Canal do Valo Grande.

Tabela 15: Síntese dos resultados obtidos por cada linha de evidência na Avaliação de Risco Ecológico no setor sul do Complexo Estuarino-Lagunar Cananéia-Iguape, tendo como escopo a contaminação por metais advindos das antigas áreas de mineração do Vale do Ribeira.

Linha de Evidência			Resultado por ponto amostral
Contaminação	Sedimento		Concentrações moderadas de Cr e Ni (pontos B, C, D e E) Concentrações moderadas a altas de Zn (exceto ponto A) Concentrações altas de Cu, Ni, Pb (todos os pontos)
	Bivalves	<i>M. guyanensis</i>	Concentrações altas de Cu (todos os pontos) e Ni (A e E)
		<i>M. falcata</i>	Concentrações altas de Cu (todos), Ni (A, B, C e E) e Pb (A)
		<i>Crassostrea</i> sp.	Concentrações altas de Zn (somente ponto A)
Toxicidade	Toxicidade aguda		Toxicidade aguda: P1, A, C, e D Toxicidade eventual: P3 (período seco), P2, e Ponto E (chuvoso) Ausência de toxicidade: B
Biomarcadores de exposição	<i>M. guyanensis</i>	MT	Aumento de concentração: C (período seco) e D (chuvoso)
		GSH	Diminuição da concentração: B e E (período seco) Aumento concentração: A (seco), B e C (chuvas moderadas)
		GST	Atividade elevada: B (período seco) e C (chuvoso)
		GPx	Inibição da atividade: B e E (período seco) Atividade elevada: A (seco), B, C, D e E (chuvas moderadas)
		GR	Inibição da atividade: D (período chuvoso) e E (seco/chuvoso)
	<i>M. falcata</i>	MT	Aumento de concentração: B
		GSH	Diminuição da concentração: D e E
		GST	Inibição da atividade: A, B, C, e D
		GPx	Inibição da atividade: E
		GR	Inibição da atividade: A, B e E
Biomarcadores de efeito	<i>M. guyanensis</i>	AChE	Ausência de atividades significativas
		LPO	Efeito significativo: C (seco/chuvoso), D (seco), e E (seco/chuvoso)
		Dano em DNA (quebra das fitas)	Efeito significativo: A (período seco), C (seco/ chuvas moderadas), D (seco/chuvoso) e E (chuvas moderadas)
	<i>M. falcata</i>	AChE	Inibição da atividade: C
		LPO	Efeito significativo: B e E
		Dano em DNA (quebra das fitas)	Ausência de efeitos significativos

8 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo indicam que os resíduos das antigas áreas de mineração estão atingindo o setor sul CELCI, sendo retidos em áreas de manguezais e biodisponibilizados para a biota. Processos oceanográficos e climáticos contribuem para a distribuição dos contaminantes, pois regem a amplitude das zonas de mistura no interior do estuário. Nos episódios intensos causam o deslocamento da zona de turbidez máxima e, conseqüentemente, das áreas de deposição.

Em suma, foi observado que nem sempre as áreas com maior presença de metais são as mais próximas das fontes já descritas na literatura. A partir da identificação das múltiplas linhas de evidência foi possível concluir que os sedimentos encontrados nestes depósitos apresentam toxicidade aguda. Tal toxicidade foi associada com alguns elementos presentes nos resíduos de mineração despejados no Rio Ribeira de Iguape, especialmente Pb, Cu e Zn. Adicionalmente, observa-se a bioacumulação de metais nos organismos filtradores, de forma que as concentrações nos tecidos de bivalves (*M. falcata*, *M. guyanensis*, *Crassostrea* sp.) apresentam correlação com as concentrações ambientais desses elementos. Além disso, os organismos analisados exibem também alterações fisiológicas relacionadas com a ativação de mecanismos de depuração, estresse oxidativo e danos em seu DNA, e tais efeitos estão associados com a exposição aos metais e sua bioacumulação.

Portanto, embora o CELCI não seja altamente poluído, algumas áreas exibem contaminação por metais em níveis capazes de causar efeitos sobre a biota, havendo então riscos ecológicos, em especial nas áreas onde há intensa deposição de sedimentos finos e matéria orgânica. Os resultados mostram ainda que, embora o CELCI seja uma importante área estuarina protegida, os objetivos de conservação não estão sendo totalmente atingidos, já que permanecem as condições de aporte e acumulação de metais para biota do estuário. Para alcançá-los, são exigidas ações para garantir o controle tanto das fontes de contaminação internas (aportes das áreas urbanas locais) quanto externas (minerações que contaminam as águas do rio desde sua nascente). Além disso, são necessárias políticas adequadas e efetivas para controlar a contaminação oriunda dos resíduos de mineração situados no alto vale do RIR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLA, A. A.; OBURA, D.; BERTZKY, B.; SHI, Y. 2013. Marine Natural Heritage and the World Heritage List: Interpretation of World Heritage criteria in marine systems, analysis of biogeographic representation of sites, and a roadmap for addressing gaps. Gland, Switzerland: IUCN.
- ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; SOUSA, E.C.P.M.; RACHID, B. R. F.; ZARONI, L. P.; GASPARRO, M. R.; PINTO, Y. A.; BÍCEGO, M. C.; HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E.; MUNIZ, P. 2008. Integrative Ecotoxicological Assessment of Contaminated Sediments in a Complex Tropical Estuarine System. In: T. N. Hofer (Ed.), Marine Pollution: New Research: Nova Science Publishers p. 279-312.
- ABESSA, D. M. S.; MORAIS, L. G.; PERINA, F. C.; DAVANSO, M. B.; BURUAEM, L. M.; MARTINS, L. M. D. P.; SÍGOLO, J. B.; RODRIGUES, V. G. S. 2012. Water and sediment toxicity in a river affected by former mining residues. *O Mundo da Saúde*, v.36(4), p. 610-618.
- ABESSA, D. M. S.; MORAIS, L. G.; PERINA, F. C.; DAVANSO, M. B.; RODRIGUES, V. G. S.; MARTINS, L. M. D. P.; SÍGOLO, J. B. 2014. Sediment Geochemistry and Climatic Influences in a River Influenced by Former Mining Activities: the Case of Ribeira de Iguape River, SP-PR, Brazil. *Open J. Water Pollut. Treat.*, v.1, p. 43-53.
- ABESSA, D. M. S. 2016. Avaliação de risco ecológico no Rio Ribeira de Iguape (SP, Brasil) devido à contaminação por antigas atividades de mineração. Tese de livre-docência. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Experimental do Litoral Paulista, 96p.
- ABNT. 2015. Associação Brasileira De Normas Técnicas - NBR 15638: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com anfípodos marinhos e estuarinos em sedimentos. Rio de Janeiro, p.19.
- ADAMS, S. M.; SHEPARD, K. L.; GREELEY JR, M. S.; JIMENEZ, B. D.; RYON, M. G.; SHUGART, L. R.; MCCARTHY, J. F. 1989. The Use of

bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Environ. Res.* v.28, p. 459-464.

AGUIAR, V. M. C.; BRAGA, E. S.; BAPTISTA-NETO, J. A. 2008. Heavy Metal Assessment in Two Subtropical Estuarine Systems in the State of São Paulo, Brazil. **In:** T. N. Hofer (Ed.). *Marine Pollution: New Research*. Nova Science publishers. p. 379-397.

INSTITUTO AGRONÔMICO/CIAGRO 2015. CIAGRO online. Banco de dados para suporte de calendário agrícola, operações florestais, fenômenos adversos e atividades correlatas. Disponível em: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline>. Data de acesso: 2015-11-29.

ALLEN, H.E., FU, G., BOOTHMAN, W., DI TORO, D.M., AND MAHONEY, J.D. 1993a. Determination of acid volatile sulfide and selected simultaneously extractable metals in sediment. EPA 821/R-91/100. U.S, Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards, Criteria and Standards Division, Washington, DC. USA: US Environmental Protection Agency. p. 18.

ALLEN, H. E.; FU, G.; DENG, B. 1993b. Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.12, p. 1441-1453.

ALLERT, A. L.; FAIRCHILD, J. F.; SCHMITT, C. J.; BESSER, J. M.; BRUMBAUGH, W. G.; OLSON, S. J. 2009. Effects of mining-derived metals on riffle-dwelling benthic fishes in Southeast Missouri, USA. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.72(6), p. 1642-1651.

ALMEIDA, E. A., MIYAMOTO, S., BAINY, A. C. D., MEDEIROS, M. H. G., DI MASCIO, P., 2004. Protective effects of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Mar. Pollut. Bull.* v. 49, p. 386–392.

ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; LOUREIRO, A. P. de M.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L. F.; MACHADO GARCIA, C.

- C.; PRADO, F. M.; RONSEIN, G. E.; SIGOLO, C. A.; BROCHINI, C. B.; MARTINS, A. M. G.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, v. 146(4), p. 588–600.
- AMORIM, E. P.; FÁVARO, D. I. T.; BRAGA, E. S. 2008. Assessment of metal and trace element concentrations in the Cananéia estuary, Brazil, by neutron activation and atomic absorption techniques. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*; v.278(2), p. 485-489.
- ANDREESCU, S.; MARTY, J.L. 2006. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, v.23, p.1–15.
- ANJOS, V. E. 2006. Especificação de cobre e arsênio no Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, 175p.
- ANKLEY, G. T. 1996. Evaluation of metal/acid volatile sulfide relationships in the prediction of metal bioaccumulation by benthic macroinvertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.15, p. 2138–2146.
- ANVISA. 2013. Resolução RDC nº 42, de 29 de Agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre limites máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos: MERCOSUL/GMC/RES. Nº 12/11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde.
- APHA. 1980. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 15th ed. New York, USA: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation. 1134 p.
- ARA, K. 2004. Temporal variability and production of the planktonic copepod community in the Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Zool. Stud.*, v.43(2), p. 179-186.

- ARAÚJO, R. P. A.; SHIMIZU, G. Y.; BOHRER, M. B. C.; JARDIM, W. 2006. Avaliação da Qualidade de Sedimentos. In: P. A. ZAGATTO, E. BERTOLETTI (Eds). São Carlos: Rima, p. 293-326.
- ARAUJO, G. S.; MOREIRA, L. B.; MORAIS, R. D.; DAVANSO, M. B.; GARCIA, T. F.; CRUZ, A. C. F.; ABESSA, D. M. S. 2013. Ecotoxicological assessment of sediments from an urban marine protected area (Xixova-Japui State Park, SP, Brazil). Mar. Pollut. Bull., v.75(1-2), p. 62-68.
- ARAUJO, G. S. 2014. Geochemical analyzes and ecotoxicological responses to assess the environmental quality in an estuarine protected area. Dissertação de Mestrado, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 87 p.
- AZEVEDO, J. S.; FERNANDEZ, W. S.; FARIAS, L. A.; FAVARO, D. T. I.; BRAGA, E. D. S. 2009a. Use of *Cathorops spixii* as bioindicator of pollution of trace metals in the Santos Bay, Brazil. Ecotoxicology, v.18(5), p. 577-586.
- AZEVEDO, J. S.; SERAFIM, A.; COMPANY, R.; BRAGA, E. D. S.; FAVARO, D. I.; BEBIANNO, M. J. 2009b. Biomarkers of exposure to metal contamination and lipid peroxidation in the benthic fish *Cathorops spixii* from two estuaries in South America, Brazil. Ecotoxicology, v.18(8), p. 1001-1010.
- AZEVEDO, J. S.; BRAGA, E. D. S.; FAVARO, D. T.; PERRETTI, A. R.; REZENDE, C. E.; SOUZA, C. M. M. 2011. Total mercury in sediments and in Brazilian Ariidae catfish from two estuaries under different anthropogenic influence. Mar. Pollut. Bull., v.62(12), p. 2724-2731.
- AZEVEDO, J. S.; HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E. D. S. 2012a. Accumulation and distribution of metals in the tissues of two catfish species from Cananéia and Santos-São Vicente estuaries. Brazilian J. Oceanogr., v.60(4), p. 463-472.
- AZEVEDO, J. S.; SARKIS, J. E. D. S.; HORTELLANI, M. A.; LADLE, R. J. 2012b. Are Catfish (Ariidae) Effective Bioindicators for Pb, Cd, Hg, Cu and Zn? Water. Air. Soil Pollut., v.223(7), p.3911-3922.

- AZEVEDO, J. S.; SARKIS, J. E. D. S.; OLIVEIRA, T. A.; ULRICH, J. C. 2012c. Tissue-specific mercury concentrations in two catfish species from the Brazilian coast. *Brazilian J. Oceanogr.*, v.60(2), p. 209-217.
- AZEVEDO, J. S.; BRAGA, E. D. S.; RIBEIRO, C. A. O. 2012d. Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on the southeastern Brazilian coast. *Brazilian J. Oceanogr.*, v.60, p. 323-330.
- BALLATORI, N. 1994. Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv. Pharmacol.* v. 27, p. 271-298.
- BALLATORI, N. 2002. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ. Health Perspect.*, v.110(Suppl 5), p. 689-694.
- BARBER, C. V.; MILLER, K. R.; BONESS, M. 2004. *Securing Protected Areas in the Face of Global Change: Issues and Strategies..* Gland, Switzerland and Cambridge, UK: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. xxxiii+236 p.
- BARBIERI, E. 2009. Concentration of heavy metals in tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) sampled in the Cananéia estuary, Brazil. *Brazilian J. Oceanogr.*, v.57(2), p. 243-248.
- BARCELLINI, V. C.; MOTTA, F. S.; MARTINS, A. M.; MORO, P. S. 2013. Recreational anglers and fishing guides from an estuarine protected area in southeastern Brazil: Socioeconomic characteristics and views on fisheries management. *Ocean Coast. Manag.*, v.76, p. 23-29.
- BARCELLOS, R. L.; CAMARGO, P. B.; GALVAO, A.; WEBER, R. R. 2009. Sedimentary Organic Matter in Cores of the Cananeia-Iguape Lagoonal-Estuarine System, Sao Paulo State, Brazil. *J. Coast. Res.*, ICS2009, p. 1335-1339.
- BARRERA-ALBA, J. J. A.; GIANESELLA, S. M. F. A.; SALDANHA-CORRÊA, F. M. P. A.; MOSER, G. A. O. B. 2007. Influence of an artificial channel in a well-preserved sub-tropical estuary. *J. Coast. Res.*, 2007(SPEC. ISSUE 50), p. 1137-1141.

- BARROS, D.; BARBIERI, E. 2012. Analysis of occurrence of metals: Ni, Zn, Cu, Pb and Cd in oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and sediment collected in the Cananeia Estuary-SP (Brazil). *Mundo da Saude*, v.36(4), p. 635-642.
- BARTELL, S.M. 2006. Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment - A Brief Review and Evaluation. *Environ. Bioindic.* v.1, p. 60–73.
- BAY, S. M.; GREENSTEIN, D. J.; LAU, S.-L.; STENSTROM, M. K.; KELLEY, C. G. 1996. Toxicity of dry weather flow from the Santa Monica Bay watershed. *Bull. South. Calif. Acad. Sci.*,v. 95(1), p. 33-45.
- BAINY, A. C. D.; ALMEIDA, E. A.; MULLER, I. C.; VENTURA, E. C.; MEDEIROS, I. D. 2000. Biochemical responses in farmed mussels *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar. Environ. Res.*, v.50, p.411-416.
- BAYNE, B. L.; BROWN, D. A.; BURNS, K.; DIXON, D. R.; IVANOCI, A.; LIVINGSTONE, D. R.; LOWE, D. M.; MOORE, M. N.; STEBBING, A. R. D.; WIDDINGS, J. 1985. The Effects of stress and pollution on marine animals. New York: Praeger. 384 p.
- BELMONTE, A. M. C.; BELTRÁN, F. S. 2001. Flood events in Mediterranean ephemeral streams (ramblas) in Valencia region, Spain. *CATENA*, v.45(3), p. 229-249.
- BENEDICTO, J.; MARTINEZ-GOMEZ, C.; GUERRERO, J.; JORNET, A.; RODRIGUEZ, C. 2008. Metal contamination in Portman Bay (Murcia, SE Spain) 15 years after the cessation of mining activities. *Ciencias Mar.*, v.34(3), p. 389-398.
- BERNARDES, M. E. C.; MIRANDA, L. B. 2001. Circulação estacionária e estratificação de sal em canais estuarinos: simulação com modelos analíticos. *Brazilian J. Oceanogr.*, v.49(1-2), p.115-132.
- BESSER, J. M.; BRUMBAUGH, W. G.; ALLERT, A. L.; POULTON, B. C.; SCHMITT, C. J.; INGERSOLL, C. G. 2009. Ecological impacts of lead

- mining on Ozark streams: Toxicity of sediment and pore water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.72(2), p. 516-526.
- BOFFI, V. A, 1979. Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico. Rio de Janeiro: Hucitec. 376 p.
- BONETTI-FILHO, J.; MIRANDA, L. B. 1997. Estimativa de descarga de água doce no Sistema Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape. *Boletim do Instituto Oceanográfico*, v. 45, p. 89-94.
- BRADFORD, M. M. 1976. Counteraction by MutT Protein of transcriptional Errors Caused by oxidative Damage. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRADSHAW, A. 1997. Restoration of mined lands—using natural processes. *Ecol. Eng.*, v.8(4), p. 255-269.
- BRASIL. 1965. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962.
- BRASIL. 2012. Relatório da Comissão Sobre Critérios para Designação de Sítios Ramsar - Recomendação No 05 de 25/06/2012 do Comitê Nacional de Zonas Úmidas. Brasília, DF, Brasil: Ministério do Meio Ambiente - Secretaria de Biodiversidade e Florestas - Gerência de Biodiversidade Aquática e Recursos Pesqueiros. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80089/Relatorio>.
- BRUMBAUGH, W. G.; INGERSOLL, C. G.; KEMBLE, N. E.; MAY, T.W.; ZAJICEK, J. L. 1994. Chemical characterization of sediments and pore water from the upper Clark Fork River and Milltown Reservoir, Montana. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.13, p. 1971-1983.
- BULL, L. J.; KIRKBY, M. J.; SHANNON, J.; HOOKE, J. M. 2000. The impact of rainstorms on floods in ephemeral channels in southeast Spain. *CATENA*, v.38(3), p. 191-209.
- BUSCHLE, B. N.; PALMEIRO, J. K.; SADE, Y. B.; MELO, V. D. F.; ANDRADE, M. G. D.; BATISTA, A. H. 2010. Kinetics of lead release from soils in

heavy metal mining and metallurgy area. *Rev. Bras. Ciência do Solo*, v.34(6), p. 1864-1874.

- CAMPOS, B. G.; CRUZ, A. C. F.; BURUAEM, L. M.; RODRIGUES, A. P. C.; MACHADO, W. T. V.; ABESSA, D. M. S. 2016. Using a tiered approach based on ecotoxicological techniques to assess the ecological risks of contamination in a subtropical estuarine protected area. *Sci. Total Environ.*, v.544, p. 564-573.
- CANTILLO, A. Y. 1998. Comparison of results of mussel watch programs of the United States and France with worldwide Mussel Watch studies. *Mar. Pollut. Bull.* v. 36, p. 712-717.
- CARLSON, A. R.; PHIPPS, G. L.; MATTSON, V. R.; KOSIAN, P. A.; COTTER, A.M. 1991. The role of acid-volatile sulfide in determining cadmium bioavailability and toxicity in freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.10, p. 1309-1319.
- CARR, R. S.; CHAPMAN, D. C.; HOWARD, C. L.; BIEDENBACH, J. M. 1996. Sediment quality triad assessment survey of the Galveston Bay, Texas system. *Ecotoxicology*, v.5, p. 341-364.
- CARR, R. S.; Montagna, P. A.; Biedenbach, J. M.; Kalke, R.; Kennicutt, M. C.; Hooten, R.; CRIPE, G. 2000. Impact of storm-water outfalls on sediment quality in corpus Christi Bay, Texas, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.19(3), p. 561-574.
- CASAS, A. M.; CRECELIUS E. A. 1994. Relationship between acid volatile sulfide and the toxicity of zinc, lead and copper in marine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.11, p. 529-536.
- CASSIANO, A. M. 2001. Estudo da contaminação por metais na bacia do Rio Ribeira de Iguape (SP-PR): Estratégias para a remediação da área de disposição de rejeitos da mina do Rocha. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos; 159 p.

- CCME. 2002. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: summary tables. Winnipeg, Canada: Canadian Council of Ministers of the Environment. Disponível em: <http://st-ts.ccme.ca/en/index.html>.
- CETESB. 2000. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 1999. (pp.391). São Paulo: Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.
- CETESB. 2003. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2002. (pp. 279). São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.
- CETESB. 2005. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2004. (pp. 307). São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.
- CETESB. 2007. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2006. (pp. 327). São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.
- CETESB. 2008. Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo 2007. São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.
- CETESB. 2010a. Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo 2009. (pp. 310). São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.
- CETESB. 2010b. Inventário estadual de resíduos sólidos domiciliares 2010. Série Relatórios / Secretaria do Estado do Meio Ambiente (pp. 186). São Paulo, Brasil: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://residuossolidos.cetesb.sp.gov.br/residuos->

solidos/residuos-urbanos-saude-construcao-civil/publicacoes-e-relatorios/.

CETESB. 2011. Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo 2010. (pp. 298). São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.

CETESB. 2012. Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo 2011. (pp. 356). São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.

CETESB. 2013. Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo 2012. (pp. 370). São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.

CETESB. 2014. Qualidade das águas salinas e salobras no Estado de São Paulo 2013. 2a. Parte do Relatório de Águas Superficiais. (pp. 434). São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.

CETESB. 2015. Qualidade das águas salinas e salobras no Estado de São Paulo 2014. 2a. Parte do Relatório de Águas Superficiais. (pp. 520). São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>.

CHAN, L. S.; NG, S. L.; DAVIS, A. M.; YIM, W. W. S.; YEUNG, C. H. 2001. Magnetic Properties and Heavy-metal Contents of Contaminated Seabed Sediments of Penny's Bay, Hong Kong. Mar. Pollut. Bull., v.42(7), p. 569-583.

CHAPMAN, P. M.; LONG, E. R. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. Mar. Pollut. Bull., v.14(3), p. 81-84.

- CHAPMAN, P. M. 1989. Current Approaches to Developing Sediment Quality Criteria. *Environ. Toxicol. Chem.* v.8, p. 589-599.
- CHAPMAN, P. M.; WANG, F. Y. 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 20(1), p. 3-22.
- CHAPMAN, P. M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.*, v.44(1), p. 7-15.
- CHAPMAN, P. M.; McDONALD, B. G.; LAWRENCE, G. S. 2002. Weight of evidence frameworks for sediment quality and other assessments. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, v.8, p.1489–1515.
- CHAPMAN, P. M.; ANDERSON, J. A. 2005. Decision-Making Framework for Sediment Contamination. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, v.1(3), p. 163–173.
- CHAPMAN, P. M. 2007. Determining when contamination is pollution — Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environ. Int.*, v.33(4), p. 492-501.
- CHEUNG, Y. H.; NELLER, A.; CHU, K. H.; TAM, N. F. Y.; WONG, C. K.; WONG, Y. S.; WONG, M. H. 1997. Environmental contamination and toxicology assessment of sediment toxicity using different trophic organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 32, p. 260–267.
- CHEUNG, C. C. C.; ZHENG G. J.; LI, A. M. Y.; RICHARDSON, B. J.; LAM, P. K. 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.*, v. 52, p. 189-203.
- CHIU, C.-Y.; CHOU, C.-H. 1991. The distribution and influence of heavy metals in mangrove forests of the Tamshui Estuary in Taiwan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, v.37(4), p. 659-669.
- CHOUERI, R. B.; MORAIS, R. D.; PEREIRA, C. D. S.; MOZETO, A. A.; CESAR, A.; ABESSA, D. M. S.; TORRES, R. J.; NASCIMENTO, M. R. L.; DELVALLS, T. A. 2009. Development of site-specific sediment quality values (SQVs) using the weight of evidence (WOE) approach for

- North and South Atlantic littoral zones. *J. Hazard. Mater.*, v.170 (1), p. 320–331.
- CHOUERI, R. B.; CESAR, A.; ABESSA, D. M. S.; TORRES, R. J.; RIBA, I.; PEREIRA, C. D. S.; NASCIMENTO, M. R. L.; MORAIS, R. D. A.; MOZETO, A.; DELVALLS, T. A. 2010. Harmonised framework for ecological risk assessment of sediments from ports and estuarine zones of North and South Atlantic. *Ecotoxicology*, v.19(4): p. 678–696.
- CICIN-SAIN, B.; BELFIORE, S. 2005. Linking marine protected areas to integrated coastal and ocean management: A review of theory and practice. *Ocean Coast. Manag.*, v.48(11-12), p. 847-868.
- CLARKSON, T. W. 1993. Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 33, p. 545-571.
- CONTI, L. A.; ARAUJO, C. A. S.; PAOLO, F. S.; BARCELLOS, R. L.; RODRIGUES, M.; MAHIQUES, M. M.; FURTADO, V. V. 2012. An integrated GIS for sedimentological and geomorphological analysis of a lagoon environment. Barra de Cananeia inlet region, (Southeastern Brazil). *J. Coast. Conserv.*, v.16(1), p. 13-24.
- COPPUS, R.; IMESON, A. C. 2002. Extreme events controlling erosion and sediment transport in a semi-arid sub-andean valley. *Earth Surf. Process. Landforms*, v.27(13), p. 1365-1375.
- CORSI, A. C.; LANDIM, P. M. B. 2002. Fluvial transport of lead, zinc and copper contents in polluted mining regions. *Environ. Geol.*, v.41(7), p. 833-841.
- CORSI, A. C.; LANDIM, P. M. B. 2003. Chumbo, Zinco e Cobre em sedimentos de corrente nos Ribeirões Grande, Perau e Canoas, e Córrego Barrinha no município de Adrianópolis (Vale do Ribeira, PR). *Geociências*, v.22(n. special), p. 49-61.
- CORY, S.; ADAMS, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature*, v. 2, p. 647-56.
- COSTA-NETO, J. D. B.; MARETTI, C. C.; LINO, C. F.; ALBUQUERQUE, J. L. R. 1997. A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica no Estado de São

Paulo. Gestão da RBMA Cad. No. 5 (pp. 44). São Paulo, Brasil: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica - Instituto Florestal. Disponível em: http://www.rbma.org.br/rbma/pdf/caderno_05.pdf.

- COSTA, F. H. D. S.; SOUZA FILHO, C. R. D.; RISSO, A. 2009. Spatio-Temporal modeling of erosion and potential contamination of Arsenic and Lead in the Ribeira de Iguape river watershed (state of São Paulo, Brazil). *Rev. Bras. Geociências*, v.39(2), p. 338-349.
- CRAIG, P. J.; BARTLETT P. D. 1978. The role of hydrogen sulphide in environmental transport of mercury. *Nature*, v.275, p. 635-637.
- CRUZ, A. R.; VILLALOBOS, C. R. 1993. Shell length at sexual maturity and spawning cycle off *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, v.41(1), p. 89-92.
- CRUZ, A. C. F.; DAVANSO, M. B.; ARAUJO, G. S.; BURUAEM, L. M.; SANTAELLA, S. T.; DE MORAIS, R. D.; ABESSA, D. M. S. 2014. Cumulative influences of a small city and former mining activities on the sediment quality of a subtropical estuarine protected area. *Environ. Monit. Assess.*, v.186(11), p. 7035-7046.
- CRUZ, A. C. F. 2014. Using chemical and ecotoxicological approaches to assess the ecological risk of pollutants in the Cananeia-Iguape Estuarine Complex, SP, Brazil. Dissertação de Mestrado, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 67 p.
- CULOTTA, V. C.; YANG, M.; O'HALLORAN, T. V. 2008. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1763, p. 747-758.
- CUNHA, F. G.; FIGUEIREDO, B. R.; PAOLIELLO, M. M. B.; DE CAPITANI, E. M.; SAKUMA, A. M. 2005. Human and environmental lead contamination in the Upper Ribeira Valley, southeastern Brazil. *TERRÆ*, v.2(1-2), p. 28-36.
- CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. D. C.; MIWA, A. C. P. 2007. A precipitação pluviométrica como agente indutor de modificações nas características

químicas do sedimento do rio Jacupiranguinha, Vale do Ribeira de Iguape, SP. *Minerva*, v.4(1), p. 41-49.

CUNHA-LIGNON, M.; MAHIQUES, M. M.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; RODRIGUES, M.; KLEIN, D. A.; GOYA, S. C.; MENGHINI, R. P.; TOLENTINO, C. C.; CINTRON-MOLERO, G.; HDOUH-GUEBAS, F.; MEHGHINI, R. P.; CINTRON-MOLERO, G.; DAHDOUH-GUEBAS, F. 2009. Analysis of mangrove forest succession, using sediment cores: a case study in the Cananéia -Iguape coastal system, São Paulo Brazil. *Brazilian J. Oceanogr.*, v.57(3), p. 161-174.

CUNHA-LIGNON, M.; KAMPEL, M.; MENGHINI, R. P.; NOVELLI, Y. S.; CINTRÓN, G.; GUEBAS, F. D. 2011. Mangrove Forests Submitted to Depositional Processes and Salinity Variation Investigated using satellite images and vegetation structure surveys. *J. Coast. Res.*, v.1(64), p. 344-348.

CURCHO, M. R. D. S. M.; FARIAS, L. A.; BAGGIO, S. R.; FONSECA, B. C.; NASCIMENTO, S. M.; BORTOLI, M. C.; BRAGA, E. D. S.; FÁVARO, D. I. T. Mercury and methylmercury content, fatty acids profile, and proximate composition of consumed fish in Cananéia, São Paulo, Brazil. *Revista Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 68, n. 3, p. 442–450, 2009.

DAEE. 1998. Bacia hidrográfica do Ribeira de Iguape: relatório síntese do plano de ação. (pp. 24): Departamento Estadual de Águas e Energia Elétrica - São Paulo. Disponível em: http://www.daee.sp.gov.br/acervoepesquisa/relatorios/revista/raee9904/ribeira_do_iguape.htm.

DAEE. 2015. Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo. Banco de Dados Fluviométricos do Estado de São Paulo 2015. - Banco de Dados Hidrológicos. <http://www.hidrologia.daee.sp.gov.br/>. Accessed 2015-11-29.

DAFRE, A. L., MEDEIROS, I. D., MÜLLER, I. C., VENTURA, E. C., BAINY, A. C. D., 2004. Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. *Chem. Biol. Interact.*, v.149, p. 97–105

- DAVID, J. A. O. 2007. Estudo de *Mytella falcata* (MOLLUSCA, BIVALVIA) como indicadora de efeitos genotóxicos no estuário de Santos, SP. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 205 p.
- DAY, J.; DUDLEY, N.; HOCKINGS, M.; HOLMES, G.; LAFFOLEY, D.; STOLTON, S.; WELLS, S. 2012. Guidelines for applying the IUCN protected area management categories to marine protected areas (Best Practice Protected Area Guidelines Series No.19). Gland, Switzerland: IUCN. 36 p.
- DECAPRIO, A. P. 1997. Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. *Environmental Science Technology*, v. 3, p. 1837-1848.
- DEELY, J. M.; FERGUSON, J. E. 1994. Heavy metal and organic matter concentrations and distributions in dated sediments of a small estuary adjacent to a small urban area. *Sci. Total Environ.*, v.153(1-2), p. 97-111.
- DECHO, A. W.; FLEEGER, J. W. 1988. Ontogenetic feeding shifts in the meiobenthic harpacticoid copepod *Nitocra lacustris*. *Mar. Biol.* v.97 (2), p. 191-197.
- DEPLEDGE, M. 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: M. C. FOSSI, C. LEONZIO (Eds). *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Boca Raton, USA: Lewis Publishers. p. 271-295.
- DEPLEDGE, M.H; FOSSI, M.C. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2): Invertebrates. *Ecotoxicology*, v.3, p.161-172.
- DEVI, M.; FINGERMAN, M. 1995. Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *procambarus clarkii*, by mercury, cadmium, and lead. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.55(5), p. 746-750.

- DI GIULIO, R. T.; MEYER, J. N. 2008. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. In: R. T. DI GIULIO, D. E. HINTON (Eds). The toxicology of fishes. New York: CRC Press, Taylor and Francis Group, p. 273-324.
- DI TORO, D. M.; J. D.; MAHONY, J. D.; HANSEN, D. J.; SCOTT, K. J.; CARLSON, A. R.; ANKLEY, G. T. 1992. Acid volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. Environ. Sci. Technol., v.26, p. 96-101.
- DINIZ, M. S.; SANTOS, H. M.; COSTA, I. P.; COSTA, M. H.; CAPELO, J. L. 2007. Metallothionein responses in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after exposure to trivalent arsenic. Biomarkers, v.12, p. 589-598.
- DU LAING, G.; RINKLEBE, J.; VANDECASTEELE, B.; MEERS, E.; TACK, F. M. G. 2009. Trace metal behaviour in estuarine and riverine floodplain soils and sediments: A review. Sci. Total Environ., v.407(13), p. 3972-3985.
- EBRAHIMPOUR, M.; MUSHRIFAH, I. 2008. Heavy metal concentrations (Cd, Cu and Pb) in five aquatic plant species in Tasik Chini, Malaysia. Environ. Geol., v.54, p. 689-698.
- EC. 2006. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. v. L 364/5, p. 20.
- ELLIOTT, M.; MCLUSKY, D. S. 2002. The need for definitions in understanding estuaries. Estuarine, Coastal and Shelf Science, v.55, p. 815-827.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D.; ANDRES JUNIOR, V.; FEATHERSTONE, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology v.7, p.88-96.
- ELUMALAI, M.; ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. 2002. Effects of single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. Water, Air, and Soil Pollution, v.141, p.273-280.

- ENVIRONMENT CANADA (1998). Report EPS 1/RM/26:(1992)1998, Biological test method: "Acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods". Ottawa, Ontario - Canada, p. 83.
- EVERAARTS, J. M. 1995. DNA Integrity as a Biomarker of Marine Pollution: Strand Breaks in Seastar (*Asterias rubens*) and Dab (*Limanda limanda*). Mar. Pollut. Bull. v. 31, p. 431-438.
- EYSINK, G. G. J.; PADUA, H. B.; PIVA-BERTOLETTI, S. A. E. 1987. Considerações preliminares sobre o nível de contaminação por metais pesados e pesticidas organoclorados no complexo Estuarino-Lagunar Iguape Cananéia e Vale do Ribeira. In: Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira, Cananéia, Brasil: ACIESP, v. 3, p. 258-266.
- EYSINK, G. G. J.; PADUA, H. B.; PIVA-BERTOLETTI, S. A. E.; MARTINS, M. C.; PEREIRA, D. N. 1988. Metais pesados no Vale do Ribeira e em Iguape-Cananéia. Ambiente, v. 2(1), p. 6-13.
- EYSINK, G. G. J.; BOLDRINI, C. V.; FOMASSARO, G. J.; LUCA, K.; RAMOS, M. L. L.; CARVALHO, M.; HUMYTA, M. E. P.; IMENEZ, L. P.; LAMPARELLI, M. C.; ARAUJO, R. P. A. 1991. Avaliação da qualidade ambiental do rio Ribeira de Iguape: considerações preliminares.. São Paulo, Brasil: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 130 p.
- FAO/WHO. 2002. Limit test for heavy metals in food additive specifications - Explanatory note [Food and Agriculture Organization/World Health Organization]. (pp. 3): JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). Disponível em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/guidelines0/en/>.
- FAO. 2007. The World's Mangroves 1980-2005. Food and Agriculture Organization of the United Nations Forest Paper No. 153. 89 p. Disponível em: www.fao.org/forestry/site/mangrove/statistics.

- FERNANDEZ, W. S.; DIAS, J. F.; BOUFLEUR, L. A.; AMARAL, L.; YONEAMA, M. L. 2014. Bioaccumulation of trace elements in hepatic and renal tissues of the white mullet *Mugil curema* Valenciennes, 1836 (Actinopterygii, Mugilidae) in two coastal systems in southeastern Brazil. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, v.318, p. 94-98.
- FINDLAY, V. J.; TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M. 2005. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? Biomedecine & Pharmacotherapy, v. 59, p. 374-379.
- FITZGERALD, W. F.; ENGSTROM, D. R.; MASON, R. P.; NATER, E. A. 1998. The Case for Atmospheric Mercury Contamination in Remote Areas. Environ. Sci. Technol., v.32(1), p. 1-7.
- FOUKLES, E. C. 2000. Transport of Toxic Heavy Metals Across Cell Membranes. Society for Experimental Biology and Medicine, p.234-240.
- FOURQUET, S.; HUANG, M. E.; D'AUTREAUX, B.; TOLEDANO, M. B., 2008. The Dual Functions of Thiol-Based Peroxidases in H₂O₂ Scavenging and Signaling. Antioxidants & Redox Signalin, v. 9, p. 1565-1576.
- FRANCHI, J. G. 2004. A utilização de turfa como adsorvente de metais pesados o exemplo da contaminação da Bacia do Rio Ribeira de Iguape por chumbo e metais associados. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Geociências, 187p.
- FRIESS, D. A.; KRAUSS, K. W.; HORSTMAN, E. M.; BALKE, T.; BOUMA, T. J.; GALLI, D.; WEBB, E. L. 2012. Are all intertidal wetlands naturally created equal? Bottlenecks, thresholds and knowledge gaps to mangrove and saltmarsh ecosystems. Biol. Rev., v.87(2), p.346-366.
- GARTEN, C. T.; ASHWOOD, T. L. 2004. Modeling soil quality thresholds to ecosystem recovery at Fort Benning, GA, USA. Ecol. Eng., v.23(4-5), p. 351-369.
- GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L. L.; ZHU, Z.; SINGH, A.; LOVELAND, T.; MASEK, J.; DUKE, N. 2011. Status and distribution of mangrove forests

- of the world using earth observation satellite data. Glob. Ecol. Biogeogr., v.20(1), p. 154-159.
- GROSS, M. D. 1971. Carbon Determination. In: CARVER, R. E. (Ed.), Procedures In Sedimentary Petrology. New York: Interscience, p. 573-596.
- GUIMARÃES, V.; SÍGOLO, J. B. 2008a. Association of Metallurgical Residues in Suspended Sediments in the Ribeira de Iguape River. Geol. USP - Ser. Cient., v.8(2), p. 1-10.
- GUIMARÃES, V.; SÍGOLO, J. B. 2008b. Detection of contaminants in a bioindicator species (*Corbicula fluminea*) - Ribeira de Iguape River, São Paulo State. Quim. Nova, v.31(7), p. 1696-1698.
- GUNSHIN, H.; MACKENZIE, B.; BERGER, U. V.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M. F.; BORON, W. F.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, J. L.; HEDIGER, M.A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. Nature, v. 388, p. 482-488.
- GUSSO-CHOUERI, P. K.; CHOUERI, R. B.; ARAUJO, G. S.; CRUZ, A. C. F.; STREMEL, T.; CAMPOS, S.; ABESSA, D. M. S.; RIBEIRO, C. A. O. 2015. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. Environ. Sci. Pollut. Res., v.22, p. 18047-18065.
- GUSSO-CHOUERI, P. K.; BRASIL, R.; SANTOS, G. S.; ARAÚJO, G. S.; CRUZ, A. C. F.; STREMEL, T.; CAMOS, S. X.; CESTARI, M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; ABESSA, D. M. S. 2016. Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. Mar. Pollut. Bull., v.104, p. 229-239.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 1999. Free radicals in biology and medicine. London: Oxford University Press, 936 pp.
- HARTWIG, A. 1995. Current aspects in metal genotoxicity. Biometals, v. 8, p. 3-11.

- HARTWIG, A.; SCHWERDTLE, T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* v. 127, p. 47–54.
- HAUSER-DAVIS, R. A.; BASTOS, F. F.; DANTAS, R. F.; TOBAR, S. A. L.; DA CUNHA BASTOS NETO, J.; DA CUNHA BASTOS, V. L. F.; ZIOLLI, R. L.; ARRUDA, M. A. Z. 2014. Behaviour of the oxidant scavenger metallothionein in hypoxia-induced neotropical fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.103, p. 24-28.
- HERMES-LIMA, M. 2004. Functional metabolism: Regulation and Adaptation, **In:** Storey, K.B. John Wiley & Sons, p.320-68.
- HINKLE, P.M.; KINSELLA, P.A.; OSTERHOUDT, K.C. 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p.16333-16337.
- HOGARTH, P. J. 2007. *The Biology of Mangroves and Seagrasses* (2nd ed.). New York, USA: Oxford University Press. 288 p.
- HORVAT, M. 1996. Mercury Analysis and Speciation in Environmental Samples. **In:** W. BAEYENS, R. EBINGHAUS, O. VASILIEV (Eds). *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 31 p.
- HOSONO, T.; SU, C.-C.; SIRINGAN, F.; AMANO, A.; ONODERA, S.-I. 2010. Effects of environmental regulations on heavy metal pollution decline in core sediments from Manila Bay. *Mar. Pollut. Bull.*, v.60(5), p. 780-785.
- IBAMA/SMA-SP. 1996. *Regulamentação da APA Cananéia Iguape Peruíbe : Plano de Gestão : Unidades de Gestão-ZEE Preliminar*. [Brasília, Brasil]; São Paulo: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis; Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- JAMESON, S. C.; TUPPER, M. H.; RIDLEY, J. M. 2002. The three screen doors: can marine “protected” areas be effective? *Mar. Pollut. Bull.*, v.44(11), p. 1177-1183.

- JANERO, D. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine* v.9, p. 515–540.
- JAYAKUMAR, T.; RAMESHA, E.; GERALDINE, P. 2006. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 1989-1996.
- JICKELLS, T. D.; RAE, J. E. 1997. *Biogeochemistry of Intertidal Sediments*. New York, USA: Cambridge University Press. 205 p.
- JOHNSON, V. G.; PETERSON, R. E.; OLSEN, K. B. 2005. Heavy metal transport and behavior in the lower Columbia River, USA. *Environ. Monit. Assess.*, v.110(1), p. 271-289.
- JONASSON, C.; NYBERG, R. 1999. The Rainstorm of August 1998 in the Abisko Area, Northern Sweden: Preliminary Report on Observations of Erosion and Sediment Transport. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography*, v.81(3), p. 387-390.
- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Adv. Mar. Biol.*, v.40, p. 81-251.
- KAVANAUGH, M. P.; KABAT, D. 1996. Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family. *Kidney Int.*, v. 49, p.959-963.
- KELLEHER, G. 1999. *Guidelines for marine protected areas (Best Practice Protected Area Guidelines Series)*. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN. xxiv + 107 p.
- KELLEHER, G.; BLEAKLEY, C.; WELLS, S. 1995. *A Global Representative System of Marine Protected Areas*. Washington, D.C.; U.S.A: A joint publication of the World Bank, The Great Barrier Reef Marine Park Authority and the World conservation Union (IUCN). 93 p.
- KENNISH, M. J. 1991. *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*. Boca Raton, USA: CRC Press. 512p.
- KENNISH, M. J. 1997. *Practical handbook of estuarine and marine pollution*. Boca Raton: CRC.

- KIRSCHBAUM, A. A.; SERIANI, R.; PEREIRA, C. D. S.; ASSUNÇÃO, A.; ABESSA, D. M. S.; ROTUNDO, M. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. 2009. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, v.32, p. 151-154.
- KONO, Y.; FRIDOVICH, I. 1982. Superoxide radical inhibits Catalase. *J. Biol. Chem.*, v.257(10): p. 5751-5754.
- KUMMER, L.; MELO, V. D. F.; BARROS, Y. J.; AZEVEDO, J. C. R. 2011. Sequential extraction of lead and zinc from soils of heavy metal mining and processing area. *Rev. Bras. Ciência do Solo*, v.35(6), p. 2005-2018.
- KUTNER, M. B. B.; AIDAR-ARAGAO, E. 1986. Influencia do fechamento do Valo Grande sobre a composição do fitoplâncton na região de Cananéia (25'S-48'W). In: E. BICUDO, C. TEIXEIRA, J. G. TUNDISI (Eds). *Algas: A Energia do Amanhã*. São Paulo: Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo, p. 109-120.
- LAMPARELLI, M. C.; COSTA, M. P.; PRÓSPERI, V. A.; BEVILACQUA, J. E.; ARAUJO, R. P.; EYSINC, G. G. J.; POMPEIA, S. 2001. Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - "Levantamento da contaminação ambiental do sistema estuarino de Santos e São Vicente". PROCOP - Programa de Controle de Poluição (pp. 178). São Paulo, Brasil: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo: CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- LAUSCHE, B. 2011. Guidelines for Protected Areas Legislation (Environmental Policy and Law). Gland, Switzerland: IUCN. p. xxvi+370
- LEWIS, M.; PRYOR, R.; WILKING, L. 2011. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: A review. *Environ. Pollut.*, v.159(10), p. 2328-2346.

- LI, Z.; MA, Z.; VAN DER KUIJP, T. J.; YUAN, Z.; HUANG, L. 2014. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment. *Sci. Total Environ.*, v.468, p. 843-853.
- LINO, C. F.; DIAS, H.; ALBUQUERQUE, J. L. R. 2011. The Mata Atlântica Biosphere Reserve: review and uptade of the limits and the zoning of the Mata Atlântica Biosphere Reserve in digital carthographic base: phase V. (pp. 157). Disponível em: <http://unesdoc.unesco.org/images/0021/002114/211414m.pdf>.
- LIU, Y. P.; LIU, J.; KLAASSEN, C. D. 2001. Metallothionein-null and wild-type mice show similar cadmium absorption and tissue distribution following oral cadmium administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 175, p. 253-259.
- LOPES JR, I. 2007. Atlas geoquímico do Vale do Ribeira: geoquímica dos sedimentos ativos de corrente Programa Informações para Gestão Territorial - GATE; Projeto Paisagens Geoquímicas e Ambientais do Vale Ribeira (2nd ed.; pp. 77). São Paulo, Brasil: Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais. Disponível em: http://www.cprm.gov.br/publique/media/atlas_geog_apre.pdf.
- LONG, E.R.; CHAPMAN, P.M. 1985. A Sediment Quality Triad: Measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Mar. Pollut. Bull.*, v.16(10): p. 405-415.
- LORING, D. H.; RANTALA, .R.T.T. 1992. Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth-Science Reviews*, v.32, p. 235-283.
- LYNES, M. A.; FONTENOT, A.P.; LAWRENCE, D. A.; ROSENSPIRE, A.J.; POLLARD, K. M. 2006. Gene expression influences on metal immunomodulation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 210, p. 9-16.
- McFARLAND, V.A., INOUE, S.L., LUTZ, C.H., JARVIS, A.S., CLARKE, J.U., McCANT, D.D. 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in

- livers of field collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v.37, p.236-24.
- MACFARLANE, G. R.; KOLLER, C. E.; BLOMBERG, S. P. 2007. Accumulation and partitioning of heavy metals in mangroves: A synthesis of field-based studies. Chemosphere, v.69(1), p. 1454-1464.
- MACHADO, I. C.; MAIO, F. D. D.; KIRA, C. S.; CARVALHO, M. D. F. H. 2002. Estudo da ocorrência dos metais pesados Pb, Cd, Hg, Cu e Zn na ostra de mangue *Crassostrea brasiliana* do estuário de Cananéia-SP, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v.61(1), p. 13-18.
- MAHIQUES, M. M.; BURONE, L.; FIGUEIRA, R. C. L.; LAVENÉRE-WANDERLEY, A. A. D. O.; CAPELLARI, B.; ROGACHESKI, C. E.; BARROSO, C. P.; DOS SANTOS, L. A. S.; CORDERO, L. M.; CUSSIOLI, M. C. 2009. Anthropogenic influences in a lagoonal environment: A multiproxy approach at the valo grande mouth, Cananéia-Iguape system (SE Brazil). Brazilian J. Oceanogr., v.57(4), p. 325-337.
- MAHIQUES, M. M.; FIGUEIRA, R. C. L.; SALAROLI, A. B.; ALVES, D. P. V.; GONÇALVES, C. 2013. 150 years of anthropogenic metal input in a Biosphere Reserve: The case study of the Cananéia-Iguape coastal system, Southeastern Brazil. Environ. Earth Sci., v.68(4), p.1073-1087.
- MARTINEZ, S.; MAHIQUES, M. M.; BURONE, L. 2013. Mollusks as indicators of historical changes in an estuarine-lagoonal system (Cananeia-Iguape, SE Brazil). Holocene, v.23(6), p. 888-897.
- MARIE, V.; GONZALEZ, P.; BAUDRIMONT, M.; BOURDINEAUD, J. P.; BOUDOU, A. 2006. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. Biometals, v.19, p. 399-407.
- MARTÍN-DÍAZ, M.L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T.A. 2007. Biomarkers study for sediment quality assessment in spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. Arch. of Environm. Contam. and Toxicol., v.53, p.66–76.

- MARTÍN-DÍAZ, M.L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T.A. 2008. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environ. Pollut.*, v.151, p.631-640.
- MASSON, M.; BLANC, G.; SCHÄFER, J. 2006. Geochemical signals and source contributions to heavy metal (Cd, Zn, Pb, Cu) fluxes into the Gironde Estuary via its major tributaries. *Sci. Total Environ.*, v.370(1), p. 133-146.
- MATTHEWS, R. A.; BUIKEMA, A. L.; CAIRNS Jr., J. 1992. Biological monitoring part II A: Receiving system functional methods relationships, and indices. *Water Research*, v.16, p.129-139.
- MAYER, F. L.; VERSTEEG, D. J.; MCKEE, M. J.; FOLMAR, L. C.; GRANEY, R. L.; MCCUME, D. C.; RATTNER, B. A. 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. **In:** R. J. HUGGETT, R. A. KIMERLE, P. M. MEHRLE JR., H. L. BERGMAN (Eds). *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. SETAC Special Publications Series. Chelsea: Lewis Publishers. p. 5–85.
- MCLUSKY, D. S.; ELLIOTT, M. 2004. *The estuarine ecosystem: ecology, threats, and management* (3rd ed.). New York, USA: Oxford University Press. 224 p.
- MELO, S. L. R. 1993. *Testes de Toxicidade com Sedimentos Marinhos: Adequação de Metodologia para Anfípodo Escavador Tiburonella viscana*. Dissertação de Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, SP. 172 p.
- MELO, S. L. R.; ABESSA, D. M. S. 2002. Testes de Toxicidade com Sedimentos Marinhos utilizando Anfípodos. **In:** I. A. NASCIMENTO, E. C. P. M. SOUSA, M. G. NIPPER (Eds). *Métodos Em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações No Brasil*. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria. p. 123-178.
- MELO, V. F.; ANDRADE, M.; BATISTA, A. H.; FAVARETTO, N.; GRASSI, M. T.; CAMPOS, M. S. 2012. Lead and zinc in water and sediments of a metal mining and metallurgy area. *Quim. Nova*, v.35(1), p. 22-29.

- MENDONÇA, J. T.; KATSURAGAWA, M. 2001. Caracterização da pesca artesanal no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape, Estado de São Paulo, Brasil (1995-1996). *Acta Sci.*, v. 23(2), p. 535-547.
- MENDONÇA, J. T.; MACHADO, I. C. 2010. Mangrove oyster (*Crassostrea* spp.) (Sacco, 1897) extractivism in Cananéia estuary (São Paulo, Brazil) from 1999 to 2006: capture and management evaluation. *Brazilian J. Biol.*, v.70, p. 65-73.
- MENDONÇA, J. T.; MIRANDA, L. V. 2008. Estatística pesqueira do litoral sul do estado de São Paulo: subsídios para gestão compartilhada. *Panam. J. Aquat. Sci.*, v.3(3), p. 152-173.
- MIRANDA, L. B.; CASTRO, B. M.; KJERFVE, B. 2002. Princípios em Oceanografia Física de Estuários (Princípios de Oceanografia Física de Estuários). São Paulo, Brasil: Editora da Universidade de São Paulo. 411 p.
- MIRANDA, L. B.; MESQUITA, A. R. D.; FRANÇA, C. A. D. S. 1995. Estudo da circulação e dos processos de mistura no extremo sul do mar de Cananéia: condições de dezembro de 1991. *Bol. Clim. do Inst. Ocean.*, v.43(2), p. 153-164.
- MISHIMA, M.; YAMANAKA, N.; JACOBSEN, O.; PEREIRA, O. M.; CHAGAS SOARES, F.; DIAS, E. R. D. A.; SINQUE, C.; AKABOSHI, S. 1986. Hidrografia do complexo Estuarino Lagunar de Cananéia (25°S e 48°W), São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.13(1), p. 51-70.
- MIYAO, S. Y.; NISHIHARA, L.; SARTI, C. C. 1986. Características físicas e químicas do sistema estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape. *Bol. Clim. do Inst. Ocean.*, v.34(1), p. 23-36.
- MIYAO, S. M.; HARARI, J. 1989. Estudo preliminar da maré e das correntes de maré da região estuarina de Cananéia (25°S - 48°W). *Bol. Clim. do Inst. Ocean.*, v.37(2), p. 107-123.
- MOL, J. H.; RAMLAL, J. S.; LIETAR, C.; VERLOO, M. 2001. Mercury Contamination in Freshwater, Estuarine, and Marine Fishes in Relation

to Small-Scale Gold Mining in Suriname, South America. *Environmental Research*, v.86(2), p. 183-197.

- MONTSERRAT, J.M., GERACITANO, L.A., ASSIS, H.C.S., COLARES, E.P., BIANCHINI, A. 2006. Biomarcadores Bioquímicos. **In:** P.C. LANA, A. BIANCHINI, C. A. O. RIBEIRO, L. F. H. NIENCHESKI, G. FILLMANN, C. S. G. SANTOS (Eds). *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros-diretrizes metodológicas*. Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro, p.124-131.
- MORAES, R. P. 1997. Transporte de chumbo e metais associados no Rio Ribeira de Iguape, São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, 105 p.
- MORAES, M. B. R. D. 2004. Área de Proteção Ambiental APA como agência de desenvolvimento sustentável : APA Cananéia Iguape Peruíbe/SP. São Paulo: Anna Blume : FAPESP.
- MORAES, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; LAFON, J.-M. 2004. Pb-Isotopic tracing of metal-pollution sources in the Ribeira Valley, Southeastern Brazil. *Terra*, v.1(1), p. 26-33.
- MORAIS, L. G.; ABESSA, D. M. D. S. 2014. PSR framework applied to the coastal management of “Complexo Estuarino-Lagunar Iguape-Cananéia” – CELIC (São Paulo, Brazil), in terms of sanitation and public health. *J. Integr. Coast. Zo. Manag.*, v.14(4), p. 625-635.
- MORAIS, L. G.; PERINA, F. C.; DAVANSO, M. B.; MOREIRA, L. B.; RODRIGUES, V. G. S.; SÍGOLO, J. B.; ABESSA, D. M. S. 2013. Water and sediment ecotoxicological assessment in a river affected by former mining activities. *Panam. J. Aquat. Sci.*, v.8(4), p. 327-338.
- MORGAN, R. P. C.; QUINTON, J. N.; SMITH, R. E.; GOVERS, G.; POESEN, J. W. A.; AUERSWALD, K.; CHISCI, G.; TORRI, D.; STYCZEN, M. E. 1998. The European soil erosion model (EUROSEM): A dynamic approach for predicting sediment transport from fields and small catchments. *Earth Surf. Process. Landforms*, v.23, p. 527-544.

- MORGENTAL, A.; BATOLLA JR, F.; PINTO, G. G.; PAIVA, I. P.; DRUMOND, J. B. V. 1975. Projeto Sudelpa: Relatório final - Geologia. (Vol. 1/18 v.; pp. 707). São Paulo, Brasil: Ministerio de Minas e Energia, DNPM/CPRM. Disponível em: <http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/handle/doc/6769>.
- MORGENTAL, A.; BORIN JR, T.; SILVA, A. A. G. P.; ALEGRI, V.; OLIVEIRA, P. E. P. D.; MACHADO, G. J.; WINSTTON, G. J. A. 1978. Projeto Geoquímica no Vale do Ribeira. (Vol. 1/8v.; pp. 421). São Paulo, Brasil: CPRM – Serviço Geológico do Brasil. Disponível em: <http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/handle/doc/9503>.
- MORRISEY, D. J.; SWALES, A.; DITTMANN, S.; MORRISON, M. A.; LOVELOCK, C. E.; BEARD, C. M. 2010. The Ecology and Management of Temperate Mangroves. **In:** R. N. GIBSON, R. J. A. ATKINSON, J. D. M. GORDON (Eds). Oceanogr. Mar. Biol. - An Annu. Rev. Boca Raton: Crc Press-Taylor & Francis Group. v.48, p. 43-160.
- MORSE, J. W. 1994. Interactions of trace metals with authigenic sulfide minerals: implications for their bioavailability. Mar. Chem., v.46, p. 1-6.
- MORSE, J. W.; CORNWELL J. C. 1987. Analysis and distribution of iron sulfide minerals in recent anoxic marine sediments. Mar. Chem., v.22, p. 55-69.
- MUDROCH, A.; MACKNIGHT, S. D. 1994. Handbook of Techniques for Aquatic Sediments Sampling, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- NAGELKERKEN, I.; BLABER, S. J. M.; BOUILLON, S.; GREEN, P.; HAYWOOD, M.; KIRTON, L. G.; MEYENECKE, J. O.; PAWLIK, J.; SOMERFIELD, P. J. 2008. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. Aquat. Bot., v.89(2), p. 155-185.
- NASCIMENTO, I. V. 1968 Estudo preliminar da maturidade do sururu (*Mytella falcata* D'Orbigny, 1846). B. Est. Pesca, SUDENE, Recife, v. 12(3), p. 19-33.
- NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. 2006. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. **In:** P. A ZAGATTO, E. BERTOLETTI (Eds). Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, p. 413-432.

- NGU, T. T.; STILLMAN, M. J. 2009. Metalation of metallothioneins, IUBMB Life, v. 61, p. 438-446.
- NIPPER, M. G.; GREENSTEIN, D. J.; BAY, S. M. 1989. Short- and long-term sediment toxicity test methods with the amphipod *Grandidierella japonica*. Environ. Toxicol. Chem., v.8(12), p. 1191-1200.
- NOAA. 1995. National Oceanic and Atmospheric Administration. US Technical Memorandum. International Mussel Watch. Initial Implementation Phase Final Report, US Department of Commerce, USA.
- NRC. 1987. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. Environmental Health Perspectives, p.74.
- O'CONNOR, T. P. 1993. The National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) National Status and Trends Mussel Watch Program: National Monitoring of Chemical Contamination in the Coastal United States. In: C. R. COTHERN, N. P. ROSS (Eds). Environmental Statistics, Assessment and Forecasting. Boca Raton: CRC Press C. R. p. 331-350.
- ONOFRE, C. R. D. E.; CELINO, J. J.; NANO, R. M. W.; QUEIROZ, F. A. D. S. 2007. Biodisponibilidade de metais traços nos sedimentos de manguezais da porção norte da Baía de Todos os Santos , Bahia , Brasil Metal bioavailability in mangrove sediments from north portion to the Todos os Santos Bay , Bahia , Brazil. Rev. Biol. e Ciências da Terra, v.7(2), p. 65-82.
- OLIVE, P. L. 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. Environmental and Molecular Mutagenesis, v.11, p.487-495.
- OLIVEIRA, U. O.; ARAÚJO, A. S. R.; BELLO-KLEINB, A.; SILVA, R. S. M.; KUCHARSKI, L. C. 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. Comp. Biochem. Physiol. - Part B, v.140, p.51-57.

- OSHER, L. J.; LECLERC, L.; WIERSMA, G. B.; HESS, C. T.; GUISEPPE, V. E. 2006. Heavy metal contamination from historic mining in upland soil and estuarine sediments of Egypt Bay, Maine, USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v.70, p. 169-179.
- PEREIRA, O. M.; HILBERATH, R. C.; CASTANHO, P. R. A.; GALVÃO, M. S. N. 2003. Estimativa da produção de *Mytella falcata* e de *M. guyanensis* em bancos naturais do Estuário de Ilha Comprida – SP – Brasil. *Boletim do Instituto da Pesca*, v. 29, n. 2, p. 139–149.
- PEREIRA, M. O.; CALZA, C.; ANJOS, M. J.; LOPES, R. T.; ARAUJO, F. G. 2006. Metal concentrations in surface sediments of Paraíba do Sul River (Brazil). *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v.269(3), p. 707-709.
- PEREIRA, C. D. S.; ABESSA, D. M. S.; BAYANI, A. C. D.; ZARONI, L. P.; GASPARRO, M. R.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; FURLEY, T. H.; SOUSA, E. C. P. M. 2007a. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.26, p.462-469.
- PEREIRA, O. M.; GALVÃO, M. S. N.; PIMENTEL, C. M.; HENRIQUES, M. B.; MACHADO, I. C. 2007b. Distribuição dos bancos naturais e estimativa de estoque do gênero *Mytella* no estuário de Cananéia , SP , Brasil. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.*, v. 11, n. 1, p. 21–29.
- ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; LOUREIRO, A. P. de M.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L. F.; MACHADO GARCIA, C. C.; 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: Molecular & Integrative Physiology*, v. 146, n. 4, p. 588–600, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643306001644>>.

- DAVID, J. A. de O. Estudo de *Mytella falcata* (MOLLUSCA, BIVALVIA) como indicadora de efeitos genotóxicos no estuário de Santos, SP. p. 205 pp., 2007.
- PEREIRA, C. D. S.; ABESSA, D. M. S.; CHOUERI, R. B.; ALMAGRO-PASTOR, V.; CESAR, A.; MARANHO, L. A.; MARTÍN-DÍAZ, M. L.; TORRES, R. J.; GUSSO-CHOUERI, P. K.; ALMEIDA, J. E.; CORTEZ, F. S.; MOZETO, A. A.; SILBIGER, H. L. N.; SOUSA, E. C. P. M.; DEL VALLS, T. A.; BAINY, A. C. D. 2014. Ecological relevance of Sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. *Mar. Environ. Res.*, v. 96, p. 118–126.
- PIVA-BERTOLETTI, S. A.; PADUA, H. B. 1986. Avaliação dos níveis de contaminação por metais e pesticidas organoclorados na água, ictiofauna e outros organismos aquáticos do complexo estuarino-lagunar Iguape-Cananeia. São Paulo, Brasil: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 68 p.
- POLIDORO, B. A.; CARPENTER, K. E.; COLLINS, L.; DUKE, N. C.; ELLISON, A. M.; ELLISON, J. C.; FARNSWORTH, E. J.; FERNANDO, E. S.; KATHIRESAN, K.; KOEDAM, N. E.; LIVINGSTONE, S. R.; MIYAGI, T.; MOORE, G. E.; NAM, V. N.; ONG, J. E.; PRIMAVERA, J. H.; SALMO, S. G.; SANCIANGCO, J. C.; SUKARDJO, S.; WANG, Y.; YONG, J. W. H. 2010. The Loss of Species: Mangrove Extinction Risk and Geographic Areas of Global Concern. *PLoS ONE*, 5(4), e10095.
- POSTMA, H. 1967. Sediment transport and sedimentation in the estuarine environment. **In:** G. H. Lauff (Ed.), *Estuaries*. Washington: American Association for Advancement of Science. p. 158-179.
- POWER, E. A.; CHAPMAN, P. M. 1992. Assessing sediment quality. **In:** A. G. Burton Jr. (Ed.), *Sediment toxicity assessment*. Boca Raton, USA: Lewis Publisher. p. 1-18.

- PRICE, G. D.; WINKLE, K.; GEHRELS, W. R. 2005. A geochemical record of the mining history of the Erme Estuary, south Devon, UK. *Mar. Pollut. Bull.*, v.50(12), p. 1706-1712.
- RAE, J. E. 1997. Trace metals in deposited intertidal sediments. **In:** T. D. JICKELLS, J. E. RAE (Eds). *Biogeochemistry of intertidal sediments*. Cambridge Environmental Chemistry Series. New York: Cambridge University Press, p16-41.
- REBELO, M. D. F.; REBOUÇAS DO AMARAL, M. C.; PFEIFFER, W. C. 2003. High Zn and Cd accumulation in the oyster *Crassostrea rhizophorae*, and its relevance as a sentinel species. *Mar. Pollut. Bull.*, v.46(10), p. 1354-1358.
- RIBA, I.; BLASCO, J.; JIMENEZ-TENORIO, N.; DELVALLS, T. A. 2005. Heavy metal bioavailability and effects: I. Bioaccumulation caused by mining activities in the Gulf of Cadiz (SW, Spain). *Chemosphere*, v.58(5), p. 659-669.
- REGOLI, F.; GIULIANI, M. E.; BENEDETTI, M.; ARUKWE, A. 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat. Toxicol.*, v. 105, p. 56–66.
- RITTSCHOF, D.; MCCLELAN-GREEN, P. 2005. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 50, p. 369-373.
- RODRIGUES, L. C. V. 2008. Estudo da disponibilidade química de chumbo e arsênio em sedimentos de corrente e colunas de sedimentos no Vale do Ribeira – SP. Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense, 137 p.
- RODRIGUES, V. G. S.; FUJIKAWA, A.; DE SOUZA ABESSA, D. M.; HORTELLANI, M. A.; SOUZA SARKIS, J. E.; SIGOLO, J. B. 2012. Using the Freshwater Bivalve *Anodontites tenebricosus* (LEA, 1834) as a Biomonitor of Metals in the Ribeira de Iguape River. *Quim. Nova*, v.35(3), p. 454-459.

- RODRIGUES, S. K.; ABESSA, D. M. S.; MACHADO, E. C. 2013. Geochemical and ecotoxicological assessment for estuarine surface sediments from Southern Brazil. *Mar. Environ. Res.*, v.91, p. 68-79.
- ROMÉO, M.; GNASSIA-BARELLI, M. 1997. Effect of Heavy Metals on Lipid Peroxidation in the Mediterranean Clam. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 118, p. 33–37.
- SÁ, F. 2003. Distribuição e fracionamento de contaminantes nos sedimentos superficiais e atividades de dragagem no Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá, PR. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Paraná, Departamento de Geologia, 92 p.
- SAITO, R. T.; FIGUEIRA, R. C. L.; TESSLER, M. G.; CUNHA, I. I. L. 2001a. Geochronology of sediments in the Cananeia-Iguape estuary and in southern continental shelf of Sao Paulo State, Brazil. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v.250(1), p. 109-115.
- SAITO, R. T.; FIGUEIRA, R. C. L.; TESSLER, M. G.; CUNHA, I. I. L. 2001b. Pb-210 and Cs-137 geochronologies in the Cananeia-Iguape Estuary (Sao Paulo, Brazil). *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v.249(1), p. 257-261.
- SALGADO, L. D. 2015. Avaliação da biodisponibilidade e a bioacumulação de metais em botos-cinza do complexo estuarino-lagunar de Iguape-Cananéia, SP. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental, 114p.
- SALM, R. V.; CLARK, J. R.; SIIRILA, E. 2000. Marine and coastal protected areas: a guide for planners and managers (3rd ed.; 10.1016/S0964-5691(01)00050-3). Washington, DC, USA: IUCN.
- SANTOS, K. M. P.; TATTO, N. 2008. Agenda Socioambiental de Comunidades Quilombolas do Vale do Ribeira. (pp. 227). São Paulo, Brasil: Instituto Socioambiental (ISA). Disponível em: <https://www.socioambiental.org/pt-br/o-isa/publicacoes/agenda-socioambiental-de-comunidades-quilombolas-do-vale-do-ribeira>.

- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; MESQUITA, H. D. S. L.; CINTRÓN-MOLERO, G. 1990. The Cananéia Lagoon Estuarine System, São Paulo, Brazil. *Estuaries*, v.13(2), p. 193-203.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. 2000. Brazilian Mangroves. *Aquat. Ecosyst. Heal. Manag.*, v.3(4), p. 561-570.
- SCHLENK, D.; CELANDER, M.; GALLAGHER, E.P.; GEORGE, S.; JAMES, M.; KULLMAN, S. W.; VANDENHURK, P.; WILLETT, K. 2008. Biotransformation in Fishes. **In:** R.T. DI GIULIO, D. E. HINTON (Eds). *The toxicology of fishes*. New York: CRC Press, Taylor and Francis Group p. 153-234.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* v.25, p.192–205
- SIG-RB. 2012. Relatório de Situação dos Recursos Hídricos da UGRHI 11 – Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape e Litoral Sul – Ano-Base 2011. (pp. 91 pp. + Anexos). Registro, SP: Sistema de Informações Geográficas da Bacia do Ribeira de Iguape e Litoral Sul. Disponível em: <http://www.sigrb.com.br>.
- SILVA, I. F. 1989. Dados climatológicos de Cananéia e Ubatuba (Estado de São Paulo). Série de 1956-1985. *Bol. Clim. do Inst. Ocean.*, v.6, p.1-21.
- SIMONS, T. J.; POCKOCK, G. 1987. Lead enters bovine adrenal medullary cells through calcium channels. *J Neurochem.*, v.48, p.383-389.
- SSE/SP. 2010. Ribeira do Iguape e Litoral Sul: Plano Regional Integrado de Saneamento Básico para a UGRHI - 11. Programa de Fortalecimento dos Instrumentos de Planejamento do Setor de Saneamento (pp. 136): Secretaria de Saneamento e Energia do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.saneamento.sp.gov.br>.
- STEGEMAN, J. J.; LIVINGSTONE, D. R. 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, v. 121, p. 1–3.

- SUGUIO, K.; MARTIN, L. 1978. Quaternary marine formation of the states of São Paulo and Southern Rio de Janeiro. **In:** International Symposium on Coastal Evolution in the Quaternary, São Paulo, Brazil. Brazilian National Working Group for the IGCP-Project 6, Vol. Special Publication 1, 55p.
- SUGUIO, K.; MARTIN, L.; FLEXOR, J.-M. 1988. Quaternary Sea Levels of the Brazilian Coast: Recent Progress. *Episodes*, v.11(3), p. 203-208.
- SWEET, L. I.; ZELIKOFF, J. T. 2001. Toxicology and Immunotoxicology of Mercury: A Comparative Review in Fish and Humans. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B Crit. Rev.*, v.4(2), p.161-205.
- TABACHNICK, B.G.; FIDELL, L.S. 1996. *Using Multivariate Statistics*, New York: HarperCollins College Publishers, 996 p.
- TERLIZZI, A.; DELOS, A. L.; GARAVENTA, F.; FAIMALI, M.; GERACI, S. 2004. Limited effectiveness of marine protected areas: imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) populations from Italian marine reserves. *Mar. Pollut. Bull.*, v.48(1-2), p. 188-192.
- TESSLER, M. G.; FURTADO, V. V. 1983. Dynamics of sediments in deposition in the lagunar region of Cananéia-Iguape, State of São Paulo. *Bol. Clim. do Inst. Ocean.*, v.32(2), p.117-124.
- TESSLER, G. M.; SUGUIO, K.; ROBILOTA, P. R. 1987. Teores de alguns elementos traços metálicos em sedimentos pelíticos da superfície de fundo da região lagunar Cananéia-Iguape (SP). **In:** Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira, Cananéia: ACIESP, v. 2, p. 255-263.
- TESSLER, M. G.; SOUZA, L. A. P. D. 1998. Dinâmica sedimentar e feições sedimentares identificadas na superfície de fundo do sistema Cananéia-Iguape, SP. *Rev. Bras. Oceanogr.*, v.46(1), p. 69-83.
- THEODOROVICZ, A.; THEODOROVICZ, A. M. D. G. 2007. *Atlas geoambiental: subsídios ao planejamento territorial e à gestão ambiental da bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape*. (pp. 91). São Paulo, Brasil: Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais/Serviço

Geológico do Brasil. Disponível em:
http://www.cprm.gov.br/publique/media/atlas_geoambiental.pdf.

- TOGNI, V.G. 2007. 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, 66p.
- TORRES, M. A., TESTA, C. P., GÁSPARI, C., MASUTTI, M. B., PANITZ, C. M. N., CURI- PEDROSA, R., ALMEIDA, E. A., DI MASCIO, P., WHILHELM-FILHO, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. Mar. Pollut. Bull. v. 44, p. 923–932.
- TORRES, R. J.; CESAR, A.; PASTOR, V. A.; PEREIRA, C. D. S.; CHOUERI, R. B.; CORTEZ, F. S.; MORAIS, R. D.; ABESSA, D. M. S.; NASCIMENTO, M. R. L.; MORAIS, C. R.; FADINI, P. S.; DEL VALLS CASILLAS, T. A.; MOZETO, A. A. A. 2015. Critical Comparison of Different Approaches to Sediment-Quality Assessments in the Santos Estuarine System in Brazil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 68(1), p. 132–147.
- TREFRY, J. H.; PRESLEY, B. J. 1976. Heavy metals in sediments from San Antonio Bay and the northwest Gulf of Mexico. Environ. Geol., v.1(5), p. 283-294.
- TRUHAUT, R. 1977. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. Ecotoxicol. Environ. Saf., v.1(2), p. 151-173.
- TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. 2001. The Lagoon Region and Estuary Ecosystem of Cananéia, Brazil. In: U. SEELIGER, B. KJERFVE (Eds). Coastal Marine Ecosystems of Latin America. Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg. p. 119-130.
- TUREKIAN, K. K.; WEDEPOHL, K. H. 1961. Distribution of the Elements in Some Major Units of the Earth's Crust. Geol. Soc. Am. Bull., v.72(2), p.175-192.

- USEPA. 1992. Framework for ecological risk assessment. EPA/630/R-92/001. Washington, DC: Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. p. 57.
- USEPA. 1996. Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. Revision 2. EPA SW 846 Method 3050. Washington, DC, USA: US Environmental Protection Agency. p. 12.
- USEPA. 1998. Guidelines for Ecological Risk Assessment. EPA/630/R-95/002F. Washington, DC: Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. 188p.
- USEPA. 1999. Method 200.8, Revision 5.5: Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry. EPA-821-R-99-017. Washington, DC, USA: US Environmental Protection Agency. p. 56.
- USEPA. 2000. United States Environmental Protection Agency. Stressor identification guidance document. Washington, DC: Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. EPA-822-B-00-025.
- USEPA. 2004. Contamination Sediments Science Priorities: United States Environmental Protection Agency Science Policy Council. (p. 172). Disponível em: <http://www.epa.gov/nscep>.
- USEPA. 2005. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: Metal Mixtures (Cadmium, Copper, Lead, Nickel, Silver and Zinc). EPA/600/R-02/011. Washington, DC, USA. US Environmental Protection Agency. p. 121.
- USEPA. 2007a. Environmental Protection Framework for Metals Risk Assessment. EPA 120/R-07/001. Washington, DC, USA. US Environmental Protection Agency. p. 172.
- USEPA. 2007b. Method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. EPA SW 846 Ch 3.2. Washington, DC, USA: US Environmental Protection Agency. p. 30.

- USEPA. 2007c. Method 7010: Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry. EPA SW 846. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Washington, DC, USA: US Environmental Protection Agency. p. 24.
- USEPA. 2008. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: Compendium of Tier 2 Values for Nonionic Organics. EPA/600/R-02/016. Washington, USA: US Environmental Protection Agency. p. 75.
- VALIELA, I.; BOWEN, J. L.; YORK, J. K. 2001. Mangrove Forests: One of the World's Threatened Major Tropical Environments. *BioScience*, v.51(10), p.807–815.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. and Pharm.* v.13, p.57-149.
- VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, v.44(1), p.69-84.
- VIEIRA, L. R.; GRAVATO, C.; SOARES, A. M. V. M.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*, v. 76, p. 1416-1427.
- WALKER, C.H.; SIBLY, R.M.; HPKIN, S.P.; PEAKALL, D.B. 2012. Principles of Ecotoxicology. 4th ed. CRC Press. Boca Raton, FL. 360p.
- WALSH, G. E.; AINSWORTH, K. A.; RIGBY, R. 1979. Resistance of Red Mangrove (*Rhizophora mangle* L.) Seedlings to Lead, Cadmium, and Mercury. *Biotropica*, v.11(1), p.22-27.
- WANG, G. E FOWLER, B.A. 2008. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 233, p. 92-99.

- WENTWORTH, C. K. 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology* 30: p.377-392.
- WHO. World Health Organization. 2001. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Environmental Health Criteria 222. Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>.
- WIENER, J. G.; SPRY, D. J. 1996. Toxicological significance of mercury in freshwater fish. *Environ. Contam. Wildlife--Interpreting Tissue Conc.*, p.297-339.
- WILLS, E.D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. **In:** K. SNELL, B. MULLOCK (Eds). *Biochemical toxicology a practical approach*. Oxford: IRL Press, 127–52.
- WORM, B.; BARBIER, E. B.; BEAUMONT, N.; DUFFY, J. E.; FOLKE, C.; HALPERN, B. S.; JACKSON, J. B. C.; LOTZE, H. K.; MICHELI, F.; PALUMBI, R. S.; SALA, E.; SELKOE, K. A.; STACHOWCZ, J. J.; WATSON, R. 2006. Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services. *Science*, 314(5800), p.787-790.
- ZANETTE, J., MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. 2006. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three brazilian estuaries. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, v. 143, p. 187-195.
- ZAKRZEWSKI, S. F. 1991. *Principles of Environmental Toxicology*. Washington, DC: American Chemical Society.
- ZHANG, J.-C.; ZHANG, W.; LI, J.-H.; SHI, Z.-G.; PU, S.-Y. 2004. Relation between precipitation and sediment transport in the Dasha River Watershed. *Chinese Geogr. Sci.*, v.14(2), p.129-134.
- ZHOU, B.; GITSCHIER, J. 1997. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p.7481-7486.
- ZOURARAH, B.; MAANAN, M.; CARRUESCO, C.; AAJJANE, A.; MEHDI, K.; FREITAS, M. C. 2007. Fifty-year sedimentary record of heavy metal

pollution in the lagoon of Oualidia (Moroccan Atlantic coast). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, v.72, p.359-369.