UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Biomarcadores genotóxicos no monitoramento de estuários
com diferentes níveis de contaminação utilizando peixes
coletados *in situ*.

Patrícia Estevam dos Santos

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Biomarcadores genotóxicos no monitoramento de estuários
com diferentes níveis de contaminação utilizando peixes
coletados *in situ*.

Patrícia Estevam dos Santos

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Patrícia Estevam dos
S237b Biomarcadores genotóxicos no monitoramento de estuários
com diferentes níveis de contaminação utilizando peixes
coletados *in situ* / Patrícia Estevam dos Santos. -- São
Paulo, 2009.

1v.(várias paginações)

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Umbuzeiro, Gisela de Aragão

1. Toxicologia ambiental I. T. II. Umbuzeiro, Gisela de
Aragão, orientador.

615.9 CDD

Patrícia Estevam dos Santos

Biomarcadores genotóxicos no monitoramento de estuários
com diferentes níveis de contaminação utilizando peixes
coletados *in situ*.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
orientador/presidente

Daisy Maria Favero Salvadori
1º. examinador

Marta Condé Lamparelli
2º. examinador

Silvia Berlanga de Moraes Barros
3º. examinador

Ernani Pinto
4º. examinador

São Paulo, 31 de julho de 2009.

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... E a vida é muito bela para ser insignificante.

(Charles Chaplin)

Dedico este trabalho a todos que amo
e que vibram junto comigo a cada
conquista.

Agradeço a CETESB pelo
financiamento e facilidades recebidas
durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A agência financiadora CAPES, pelo suporte financeiro.

A CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) pelo financiamento e facilidades recebidas durante o período de estudo na realização das análises de genotoxicidade e mutagenicidade em peixes.

A Universidade de São Paulo pelo constante crescimento que nos proporciona.

Ao Santander pelo apoio financeiro e pela iniciativa de promover a possibilidade de crescimento profissional através de experiências internacionais por meio do Programa de Mobilidade Internacional que possibilitou a realização das análises moleculares deste estudo.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Gisela de Aragão Umbuzeiro pela oportunidade e confiança no meu trabalho o meu mais sincero obrigado. Foi um grande aprendizado trabalhar ao seu lado.

A Universidade de Aveiro - Portugal em nome da Prof^a Dr^a Sónia Mendo e aos amigos do laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Aveiro, Sónia Ferreira, Joana Lourenço, Tânia Caetano, Andréia Cruz, Rita Torres, Luiz, Rita e Cátia pela enorme ajuda no desenvolvimento do trabalho e principalmente pela amizade construída nestes meses de convivência. Vocês tornaram essa experiência profissional muito mais prazerosa. Obrigada por tudo de coração!

Aos funcionários, técnicos e estagiários da CETESB por todo o suporte técnico e pela ajuda que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por esses anos de convivência e cooperação e principalmente pelos amigos que me cativaram: Camila Lellis, Daniella Daryl, Wallace Anderson Flávia Manzzini, Adauto Pessoa, Pedro Rego, Viana, Genival, Ângela, Suzi Garcia, Célia Rech, Dr^a Rúbia Kuno e Dr^o Gilson Quinagua.

Agradeço a Carlos Coimbra e Oswaldo A. da Silva (Gordela), pela ajuda importantíssima e pela amizade construída entre as variações de marés das coletas. Agradeço também a todos do setor de coletas da CETESB.

Ao pescador Naldo e seu ajudante que possibilitaram a coleta de peixes de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho com muita responsabilidade, dedicação e alegria.

Ao departamento de Toxicologia da Universidade de São Paulo e seus funcionários, professores e colegas de pós-graduação. Muito obrigada.

A Deus que me fortalece em todos os momentos da minha vida, me trazendo tranquilidade para ultrapassar as fases difíceis e a seguir em frente.

Aos meus pais, Edna Estevam e José Clementino que são meu alicerce. Meus irmãos Alessandra Estevam e Clemensen Estevam por estarem sempre presentes, mesmo com a distância que a vida nos tem imposto. A minha tia Eulália e meu eterno amigo e tio Lula (*in memoriam*). A todos da minha família que torcem pelo meu êxito. Amo vocês!

Ao meu amor, Marcos Defferrari, que tem me apoiado em tudo e tem caminhado ao meu lado com muito carinho e compreensão, me ajudando a vencer mais este desafio no meu crescimento profissional. Te amo!

Aos meus mais que queridos amigos Delanne Sena, Maurício Fontinelle, Thiago Cabral, Débora Aloise, Simone Valente, Fábio Ferreira, Rafael Terada, Thiago Sanna, Naisandra Silva, Regina Marques, Érika Rocha, Eurico júnior, Tatiana Barbosa, Kleiber Rodrigues, Fábio Kummrow, Fabriciano Pinheiro, Luciana Fentanes, Fabiana Anjos, Kaline Waismam, Igor Lucena, Vânia Rodriguez, Daniele Maia, Julita Borges, e todos os outros, porém não menos importantes que sabem o quanto a amizade fortalece e é essencial para o sucesso e felicidade na vida.

A Magnólia Damasceno e Renato Yoshida, por toda a amizade de anos e por me darem uma afilhada linda, Renata Ayumi, que tem me dado preciosos momentos de alegria.

Aos amigos Giovanna Ribeiro-Santos e Cyro Hauaji Zacarias pela alegria e todo apoio nesta etapa final com sugestões e correções de grande importância para mim. Ainda cresceremos muito juntos.

A Moyses Chasin e Fausto Azevedo pela confiança e oportunidade de transformar os sonhos em realidade. Muito obrigada pelo aprendizado contínuo.

A professora Dr^a Márcia Caruso Bicego e sua aluna Ana Cecília Rizzatti de Albergaria-Barbosa pela colaboração na realização das análises dos metabólitos equivalente de HPA em bile pelo Laboratório de Química Orgânica Marinha - Instituto Oceanográfico – Universidade de São Paulo.

Ao Dr^o Antônio Aparecido Mozeto, Dr^o Marcelo Del Grandre e Dr^o Ronaldo José Torres pela colaboração com o laboratório Biogeoquímica Ambiental (LBGqA) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos na realização das análises de HPA em sedimento.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho o meu muito obrigado porque um bom trabalho não se faz sozinho.

RESUMO

Algumas áreas do canal de Piaçaguera, localizado na Baixada Santista, SP-Brasil, apresenta alto nível contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) entre outros contaminantes nos sedimentos. O objetivo do presente estudo foi verificar diferentes biomarcadores de exposição em bile e de efeitos genotóxicos em sangue de peixes, coletados *in situ*, que poderiam ser utilizados como ferramenta de monitoramento. O canal de Bertioga foi selecionado como região de referência. Embora não seja uma região sem nenhuma interferência de contaminantes, os sedimentos apresentam baixos valores para HPA, metais e atividade mutagênica. A espécie *Mugil curema* foi selecionada por ser frequentemente encontrada em ambas as regiões de estudo. Observamos que os peixes coletados no canal de Piaçaguera apresentaram maior porcentagem de micronúcleos e danos ao DNA (ensaio cometa) no sangue quando comparados com a região de referência. Para o teste de micronúcleo, realizamos leituras de 1000 e 4000 células/indivíduo e não foram observadas diferenças estatísticas, sugerindo que o número de 1000 células poderia ser suficiente para gerar dados confiáveis para a espécie *Mugil curema*. A avaliação de mutagenicidade da bile foi realizada pelo teste *Salmonella*/microsossoma combinado à extração de bile utilizando Blue rayon (BR) com as linhagens TA98, TA100 e YG1041 com e sem S9 (ativação metabólica). As maiores respostas mutagênicas foram observadas para os peixes coletados no canal de Piaçaguera. A mutagenicidade com a linhagem YG1041 na presença de S9 foi mais elevada quando comparado à mutagenicidade observada na ausência de S9 e também em comparação com a sua linhagem parental TA98, indicando a provável presença de compostos da classe das aminas aromáticas na bile como responsáveis pelos efeitos observados. A quantificação de metabólitos equivalentes de HPA foi realizada por HPLC/fluorescência na bile bruta e embora os resultados não se correlacionem com a mutagenicidade, altos níveis também foram encontrados para os peixes coletados no canal de Piaçaguera em comparação com Bertioga. O protocolo de amplificação do gene *ras* para a espécie *Mugil curema* foi estabelecido e os genes foram sequenciados para verificação da presença de mutações. Não foram observadas mutações nos poucos peixes analisados e mais estudos são necessários para verificar a utilização deste biomarcador. O teste de micronúcleo, ensaio cometa e análise de mutagenicidade em bile extraída por Blue rayon parecem ser ferramentas biológicas adequadas para monitoramento da qualidade ambiental de estuários contaminados.

Palavras chave: Bile de peixes, *Mugil curema*, mutagenicidade, biomarcador, *Salmonella*/microsossoma, teste de micronúcleo, ensaio cometa, Blue rayon, metabólitos em bile, HPA, gene *ras*.

ABSTRACT

Some areas of the Piaçaguera channel at Baixada Santista, SP, Brazil present high levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among other contaminants in the sediment. The aim of the present study was to verify if biomarkers of exposure in bile and effect in blood of fishes collected in the field could be used as a monitoring tool. We selected Bertioga channel as a reference area. Although it is not a pristine area, the sediment presents low values of PAHs, metals and mutagenic activity. We selected the fish species *Mugil curema*, because they are frequently found in both areas during the entire year. We observed that the fish collected at the Piaçaguera channel showed a higher percentage of micronuclei and DNA damage (comet assay) in blood when compared to the Bertioga channel. The micronucleus readings were done in 1000 and 4000 cells/fish and no statistical difference was observed, suggesting that the number of 1000 cells would be sufficient to generate reliable data for the species *Mugil curema*, in the studied area. The mutagenicity of the bile was performed using the *Salmonella*/microsome assay combined with Blue rayon (BR) extraction with TA98, TA100 and YG1041 strains with and without rat liver S9. We observed that the mutagenic responses were higher in fish collected in Piaçaguera. The mutagenicity in YG1041 with S9 in fishes collected in the Piaçaguera channel was higher when compared to the mutagenicity observed in the absence of S9 and also higher than the response with the parental strain TA98. The results suggest that mutagenic polycyclic compounds, probably from the class of the aromatic amines are causing the observed effect. PAH metabolites-equivalent were also determined using HPLC/fluorescence in crude bile, and although the results did not correlate with the mutagenicity, higher levels were observed in fish collected in the Piaçaguera channel when compared to Bertioga. A protocol for amplification of the *ras* gene for the *Mugil curema* species was established and gene sequenced. No mutations were observed in the liver of the few fishes analyzed, and more studies are required to verify the utility of this biomarker in this fish. The micronuclei, comet assay and mutagenicity in bile extracted with blue rayon seem to be suitable biological tools to monitor the environmental quality of contaminated estuaries.

Keywords: fish bile, *Mugil curema*, mutagenicity, biomarker, *Salmonella*/microsome, micronucleus test, comet assay, Blue rayon, PAH metabolites, HPA, *ras* gene.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Avaliação de danos genotóxicos: Ensaio cometa e teste de micronúcleo	2
1.2 Avaliação de mutagenicidade: Teste de mutagenicidade - Salmonella/microsossoma .	5
1.3 Extração seletiva por Blue rayon (BR), teste de Salmonella/microsossoma e metabólitos equivalentes de HPA.	6
1.4 Estudos moleculares	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. GERAL.....	11
2.2. ESPECÍFICOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Aparelhagem.....	12
3.2 Vidraria.....	13
3.3 Outros materiais.....	13
3.4 Reagentes.....	14
3.5 Meios de cultura, soluções e kits para biologia molecular	16
3.5.1 Teste de Salmonella/microsossoma (Kado et al., 1983)	16
3.5.2 Teste de Micronúcleo	19
3.5.3 Ensaio Cometa.....	19
3.5.4 Amplificação de genes.....	21
3.6 Esterilização e teste de esterilidade	22
3.7 Lavagem de vidraria	22
3.8 Caracterização das regiões de estudo e pontos de amostragem.....	22
3.9 Material biológico	24
3.10 Análises complementares	26
3.10.1 Atualização de dados: Canal de Piaçaguera (Água e sedimentos)	26
3.10.2 Análise de metabólitos equivalentes de HPA.....	28
3.10.3 Desenvolvimento de protocolo para amplificação dos genes p53 e ras em fígado de peixes da espécie Mugil curema.	29
3.10.3.1 Extração de RNA de fígados de peixes (kit Qiagen - 74904)	29
3.10.3.2 Quantificação do RNA (Método Quant-it)	31

3.10.3.3 Verificação de contaminação por DNA genômico e tratamento com DNase	31
3.10.3.4 Síntese de cDNA (Invitrogen – 11904-018)	32
3.10.3.5 Preparo de amostras para seqüenciamento e análise das seqüências	32
3.11 Teste de Micronúcleo	33
3.12 Ensaio Cometa.....	34
3.13 Análises em bile de peixes.....	37
3.13.1 Procedimento de lavagem do Blue rayon (Kummrow 2003 – Modificado) para extração em bile.....	37
3.13.2 Obtenção da bile e extração com Blue rayon (Mano et al., 1995 – Modificado)	37
3.14 Ensaio de Mutagenicidade.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Atualização de dados: Canal de Piaçaguera (Água e sedimentos)	44
4.2 Análises de danos genotóxicos em peixes.....	46
4.2.1 Teste de micronúcleo.....	46
4.2.2 Ensaio Cometa.....	54
4.3 Teste de Mutagenicidade em amostras de Bile extraídas por Blue rayon e análise de metabólitos equivalentes de HPA.	58
4.4 Desenvolvimento de protocolo para amplificação dos genes p53 e ras em fígado de peixes da espécie Mugil curema.	63
5. CONCLUSÕES	68
6. RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS ESTUDOS.....	69
7. REFERÊNCIAS	70
8. ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização dos pontos de coleta e amostragem no Canal de Piaçaguera e na região de referência (Canal de Bertioga). Map Data: Landsat ETM+ image of 03/04/2000, R5G4B3 false color composition, obtained from www.glc.f.umd.edu	24
Figura 2: Espécime de <i>Mugil curema</i> (Parati).....	25
Figura 3A - B: Pesca tipo cerco, utilizando redes de arrasto.....	26
Figura 4: Conjunto Blue rayon-ancorado, utilizado no método <i>in situ</i>	27
Figura 5: Metodologia de preparo e análise de micronúcleos em sangue total de peixes (<i>Mugil curema</i>)_	34
Figura 6: Etapas do ensaio Cometa	36
Figura 7: Procedimento de obtenção de bile	38
Figura 8: Extração por Blue Rayon em solução de bile de peixes	39
Figura 9: Etapas do ensaio de Mutagenicidade <i>Salmonella</i> /microsoma em micro suspensão (Kado <i>et al.</i> , 1983)	43
Figura 10: Células micronucleadas de sangue total de peixes da espécie <i>Mugil curema</i> coletados no canal de Piaçaguera observada em microscopia óptica em imersão (1000X). Micronúcleos (MN) indicados pelas setas	48
Figura 11 A-F: Resultados das análises estatísticas realizadas pelo teste T para as porcentagens de Micronúcleos (%MN) em 4000 células/indivíduo no canal de Bertioga e de Piaçaguera. Dados estatisticamente significativos (desvio padrão , média ⊕, mediana — e valores máximo e mínimo) calculado com Índice de Confiança (IC) de 95%	49
Figura 12: Resultados da percentagem de micronúcleos (%) para 1000 e 4000 células/indivíduo para o canal de Bertioga e Piaçaguera. Grupos com médias estatisticamente semelhantes para o teste T com $\alpha=5\%$	53
Figura 13 A-F: Resultados das análises estatísticas realizadas pelo teste T para os escores de danos (0 – 800) do ensaio cometa no canal de Bertioga e de Piaçaguera. Dados estatisticamente significativos (desvio padrão , média ⊕,	

mediana — e valores máximo e mínimo |) calculado com Índice de
Confiança (IC) de 95% 57

Figura 14: Seqüência parcial do gene *ras* da espécie *Mugil curema* depositada no
GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) 67

Figura 15: Alinhamento e “Score” obtido pelo programa ClustalW
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Preparação da mistura de reação para tratamento com DNase.....	31
Tabela 2: Preparação da mistura de reação para síntese de cDNA	32
Tabela 3: Preparação das amostras de RNA e controle para síntese de cDNA.....	32
Tabela 4: Genótipo das linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> utilizadas no estudo, mutação preferencial e controles positivos	40
Tabela 5: Valores de mutagenicidade, HPA prioritários e metais no Canal de Piaçaguera em amostras de água e sedimentos	46
Tabela 6: Comparação do aumento relativo entre as percentagens de micronúcleos (%) para diferentes espécies de peixes, observadas em regiões consideradas de referência e regiões contaminadas	50
Tabela 7: Comparação das percentagens de micronúcleo em diferentes espécies de peixes coletados em regiões de referência e em estudos de laboratório para diferentes controles negativos.....	51
Tabela 8: Resultados do ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma em microsusensão expressos em número de revertantes/mg de Blue rayon para o pool de amostras de bile analisadas de fevereiro a dezembro de 2006 utilizando as linhagens TA98, TA100 e YG1041	60
Tabela 9: Metabólitos equivalentes de HPA em ng/g para as amostras dos pools de bile bruta analisadas para o canal de Piaçaguera e Bertioga.....	60
Tabela 10: Resultado da extração e quantificação de RNA de fígado da espécie <i>Mugil curema</i>	65
Tabela 11: Resultado do teste do programa de PCR e do conjunto de primers para amplificação do gene <i>ras</i> para a espécie <i>Mugil curema</i>	66
Tabela 12: Sequências nucleotídicas dos primers utilizados para amplificação do gene <i>ras</i> em <i>Mugil curema</i>	66
Tabela 13: Resultado da concentração das amostras para sequenciamento	66

ANEXOS

ANEXO I: Autorização do IBAMA nº 02027.002996/2005-38	89
ANEXO II: Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal CEEA/FCF-USP	91
ANEXO III: Mutagenicity of Blue rayon extracts of fish bile as a biomarker in a field study	92
ANEXO IV: Artigo em preparação – Environmental monitoring using the alkaline single-cell gel electrophoresis and micronucleus test in estuarine fish <i>Mugil curema</i>	110
ANEXO V: Dados brutos referentes ao ensaio cometa para o canal de Bertioga e Piaçaguera	111
ANEXO VI: Dados Brutos referentes ao teste de Micronúcleos para o canal de Bertioga e Piaçaguera	116
ANEXO VII: Resultados das análises estatísticas pelo teste-F e teste-T para os escores de danos calculados a partir das classes de danos obtidas pelo ensaio cometa em sangue total de <i>Mugil curema</i> para o canal de Piaçaguera e região de referência (canal de Bertioga) de Fevereiro a Dezembro/2006	123
ANEXO VIII: Resultado das análises estatísticas pelo teste-F e teste-T para a frequência de micronúcleos observada em 4000 células/indivíduo no teste de micronúcleo em sangue total de <i>Mugil curema</i> para o canal de Piaçaguera e região de referência (canal de Bertioga) de Fevereiro a Dezembro/2006....	126
ANEXO IX: Dados brutos referentes ao teste de mutagenicidade (<i>Salmonella</i> /microsoma em microssuspensão) para os extratos de bile por Blue rayon dos peixes coletados no canal de Bertioga e Piaçaguera de Fevereiro a Dezembro/2006.....	129
ANEXO X: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado	134
ANEXO XI: Ficha do Aluno – Sistema FenixWeb - USP	135
ANEXO XII: Currículo do Sistema de Currículos Lattes (http://lattes.cnpq.br/)	138

1. INTRODUÇÃO

Para a caracterização e o monitoramento de áreas ambientais, devemos levar em consideração a complexidade do ambiente como um fator de suma importância, não podendo separar os processos físicos, químicos e biológicos uma vez que, estes são integrados e interconectados no ambiente. É o conjunto dessas informações que contribui para a manutenção da saúde e preservação dos ecossistemas (Brusseau *et al.*, 2004).

Áreas estuarinas estão associadas a um alto potencial econômico devido a instalações de portos que encontram nessas regiões uma interface para o continente, bem como o crescimento de cidades e de complexos industriais. A poluição é uma realidade que vem acompanhando a modernização e o crescimento dessas regiões contribuindo para a liberação de uma grande diversidade de xenobióticos para os corpos d'água por fontes pontuais e não pontuais (Nipper, 2000; Ohe *et al.*, 2004). Esses contaminantes por sua vez tendem a ser incorporados ao sedimento, diminuindo sua mobilidade e aumentando a persistência. Sedimentos altamente contaminados têm sido uma das maiores fontes de contaminação de um corpo d'água (Liu *et al.*, 1996).

Alterações na integridade do DNA (ácido desoxirribonucleico) são uma das primeiras manifestações após exposição dos organismos a produtos químicos genotóxicos. Estudos de campo, utilizando biomarcadores para avaliação destes impactos vêm aumentando ao longo dos últimos 15 anos (Frenzilli *et al.*, 2009). Os biomarcadores têm sido utilizados no monitoramento ambiental por indicarem em termos bioquímicos ou celulares a presença de contaminantes ou a magnitude da resposta em um organismo a partir da medição de fluidos corporais, celulares ou teciduais (Bodin *et al.*, 2004). Essas medidas podem indicar e quantificar indiretamente (biomarcadores de exposição) ou diretamente (biomarcadores de efeito) os danos que estão sendo manifestados na biota. Os biomarcadores genotóxicos podem ser inespecíficos a determinados tipos de compostos como detectado em danos cromossômicos ou específicos como adutos de benzo(a)pireno, por exemplo. A quantificação de compostos ou de seus metabólitos em organismos pode ser utilizada como biomarcadores de exposição. Já a observação de danos como fragmentação de DNA (ensaio cometa), perda de material genético (análise de micronúcleos) e atividade

mutagênica, fornece o indicativo de efeito que o ambiente e seus contaminantes exercem na biota.

É esperado que espécimes expostos a regiões com altos níveis de contaminação desenvolvam diversas adaptações endógenas. Desta forma é importante conhecer os níveis basais de danos, a serem observados nas espécies avaliadas tanto em regiões consideradas de referência como em regiões que apresentem um histórico de contaminação relevante, possibilitando uma análise comparativa confiável. A fauna aquática dependendo de sua capacidade metabólica e vias de exposição, exibe capacidade variável de metabolizar contaminantes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) entre outros (Kennish, 1997). Os peixes por sua vez, possuem enzimas que metabolizam rapidamente compostos policíclicos aromáticos os quais podem ser liberados para o ambiente pelas vias excretoras. Esses compostos metabolizados são mais hidrossolúveis, porém potencialmente carcinogênicos (Varanasi *et al.*, 1989). A exposição e/ou efeitos da presença de contaminantes em um ambiente podem ser mensurados em diferentes organismos aquáticos como algas (Torres *et al.*, 2008) e moluscos (Uno *et al.*, 2009), por exemplo. Neste contexto, os peixes têm se mostrado adequados em estudos de genotoxicidade ambiental, devido ao seu importante papel na cadeia trófica aquática e por sua sensibilidade a baixas concentrações de compostos genotóxicos presentes nos ambientes aquáticos contaminados (Cavas e Ergene-Gözükar, 2005). Em estudos de campo a avaliação das populações de peixes locais requer estudo prévio para determinar as espécies nativas características da região, seus hábitos e frequência de ocorrência nos locais de interesse. Diferentes espécies de peixes podem ser utilizadas, levando-se em consideração características como mobilidade e comportamento nutricional, que poderão influenciar na exposição aos contaminantes presentes no ambiente, que por sua vez podem estar adsorvidos no sedimento ou disponibilizados na coluna d'água.

Deteções precoces de danos em organismos aquáticos podem atuar como sinalizadores da qualidade ambiental e auxiliar na prevenção da exposição continuada a contaminantes genotóxicos, podendo-se interferir na progressão de danos irreversíveis nas populações expostas como, por exemplo, o desenvolvimento de tumores.

1.1 Avaliação de danos genotóxicos: Ensaio cometa e teste de micronúcleo

Os danos genotóxicos podem ser detectados por ensaios como o cometa e o teste de micronúcleo. Esses ensaios têm sido utilizados, em vários estudos para avaliar o impacto dos poluentes no ambiente a diferentes compostos químicos, com grande sucesso. Alguns autores têm sugerido a utilização de ambos os ensaios devido à capacidade de detectar diferentes efeitos adversos ao material genético (Buschini *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2004; Vanzella *et al.*, 2007). Esses ensaios têm demonstrado sensibilidade em diferentes espécies, sendo possível a detecção de danos em indivíduos expostos a baixas concentrações de contaminantes e com a vantagem de não exigir um conhecimento detalhado sobre a identidade e as propriedades físico-químicas dos contaminantes (Frenzilli *et al.*, 2009).

O ensaio cometa tem sido amplamente utilizado por ser um método rápido e sensível para detecção de quebras no DNA em células individualizadas. Pode ser aplicado em diversos tipos celulares, requer um pequeno número de células para as análises, permitindo uma resposta rápida da avaliação da biota exposta a diversos contaminantes. Diferentes tecidos podem ser utilizados na execução do ensaio cometa tais como intestino, fígado, brânquias, gônadas, rim, baço e muscular, porém para uma aplicação confiável é necessário que as células sejam isoladas utilizando técnicas que não promovam danos ao DNA. Em peixes, o sangue total tem sido amplamente utilizado por ser de fácil coleta e de não necessitar de etapas de isolamento celular utilizando técnicas específicas que não danifiquem o DNA (Tice *et al.*, 2000; Kilemade *et al.*, 2004). No entanto, independentemente do tipo celular empregado no estudo, os resultados obtidos devem ser avaliados quanto à sensibilidade do organismo-teste e quanto à resposta tecido específica se for o caso (Sharma *et al.*, 2007) bem como, realizar controles do ensaio fazendo uso de controles negativos e/ou análises comparativas (Matsumoto & Cólus, 2000).

O teste do micronúcleo detecta cromossômicos inteiros ou fragmentos acêntricos que não foram incorporados no núcleo principal durante a mitose. Assim, para a detecção de micronúcleos, que representam perda de material genético, é necessário que as populações celulares estejam ativamente em divisão celular submetidas à pelo menos um ciclo celular (Udroiu, 2006). No entanto, existe pouca informação sobre o ciclo celular e a taxa de eritropoiese em peixes (Al-Sabtit & Metcalfe, 1995; Jha, 2008). Na literatura há informações de que um pico de eritrócitos micronucleados ocorre de 1-5 dias após exposição, mas na maioria das espécies de peixes este pico é observado de 2 a 3 dias (Udroiu, 2006). Grisolia e Cordeiro (2000) estudaram o efeito de ciclofosfamida

em eritrócitos de sangue periférico de três espécies de peixes e observaram um aumento na frequência de microcúcleos após 2-7 dias de tratamento. Cavalcante *et al.*, 2008 estudando a mesma substância observaram um aumento na indução da frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* após 1 e 4 dias de tratamento. Após 6h do tratamento com a ciclofosfamida não observaram aumento significativo de micronúcleos relacionando ao curto intervalo de tempo de tratamento, o qual teria sido insuficiente para a ocorrência de um ciclo celular completo e, conseqüentemente, para a detecção de micronúcleos nos eritrócitos examinados.

Nos peixes os eritrócitos são produzidos em diferentes órgãos (Tavares-Dias & Moraes, 2003) e o rim cefálico é o principal, mas não o único, órgão hematopoiético. O timo, endotélio do coração e vasos sanguíneos, apesar de em menor escala, também atuam como tecidos de hematopoiese (Soldatov, 1995) e a atividade hematopoiética apresenta variações entre as diferentes famílias de peixes (Ishizeki *et al.*, 1984). A maturação dos eritrócitos em *Carassius auratus* (Cyprinidae, CYPRINIFORMES), por exemplo, ocorre entre 16 e 21 dias (Murad & Houston, 1992) e o tempo de vida média dos eritrócitos circulantes é 51 dias (Fisher *et al.*, 1998). Por outro lado, em *Tinca vulgaris* o tempo de meia vida dos eritrócitos é de 150 dias (Hevesy *et al.*, 1964).

A utilização e a sensibilidade do ensaio cometa e do teste de micronúcleo, ou de ambos, para a avaliação de genotoxicidade ambiental, tem sido evidenciado em estudos como o de Deguchi *et al.*, (2007), que utilizaram a espécie *C. auratus* para avaliar os efeitos de lixiviados de aterro sob diferentes tratamentos e inalterado utilizando o ensaio cometa em eritrócitos e teste de micronúcleo em brânquias. Ambos detectaram uma maior atividade genotóxica nos peixes expostos ao lixiviados inalterado. Alta atividade genotóxica também foi observada para o ensaio cometa e o teste de micronúcleo em eritrócitos de *Gambusia holbrooki* expostos a águas poluídas em rios da Itália contaminados por metais pesados, pesticidas e detergentes (Russo *et al.*, 2004). O rio Potengi – RN foi avaliado pelo ensaio cometa e o teste de micronúcleo em sangue da espécie *Cathrops spixii*, onde foram observados altos níveis de danos para ambos os testes quando comparado a uma região de referência (Santos, 2003). O ensaio cometa e o teste de micronúcleo também demonstraram boa sensibilidade na avaliação da genotoxicidade de frações hidrossolúveis de diesel para a espécie neotropical *Prochilodus lineatus*, que vive em rios brasileiros (Vanzella *et al.*, 2007).

No Brasil, dois estuários foram monitorados utilizando as espécies *Mugil sp* e *Netuma sp*. Durante o monitoramento, observaram uma associação entre

hidrocarbonetos, metais, pH, temperatura da água e o nível de danos das células. Também observaram uma correlação entre os níveis de danos ao DNA detectado pelo ensaio cometa e pelo teste de micronúcleo. Ambos os ensaios foram capazes de detectar diferenças na exposição genotóxica entre as regiões impactadas e de referência. No entanto, o ensaio cometa apresentou uma maior sensibilidade que o teste de micronúcleo por diferenciar os locais de estudo quanto à sazonalidade (Andrade *et al.*, 2004).

Lemos *et al.*, 2008 utilizaram espécimes de *Astyanax jacuhiensis* para avaliar a genotoxicidade do córrego Bom Jardim (Brasil – RS) que está sob influência de produtos petroquímicos tratados e eliminados na região. A frequência de eritrócitos micronucleados tanto nos indivíduos coletados a montante da zona industrial quanto nos coletados na região da zona industrial foram semelhantes, mostrando respostas genotóxicas positivas quando comparadas com as regiões de referência. Neste estudo não foram encontradas sensibilidade diferencial entre os sexos para a espécie *A. jacuhiensis* na população estudada e as regiões sob influência petroquímica apresentaram um maior impacto genotóxico para os peixes expostos.

Outros biomarcadores também têm sido utilizados, para avaliação ambiental. Sullivan *et al.*, (2007), investigaram os efeitos da exposição à biosólidos (lodo de tratamento de efluentes) que apresentam HPA, éteres difenílicos polibromados (PBDE) e nonilfenóis (NPS) em espécimes de *Pimephales promelas*. Neste trabalho uma indução de danos ao DNA pelo ensaio cometa, foi encontrada em hepatócitos após exposição de 14 e 28 dias, bem como uma correlação significativa entre indução de CYP1A e danos ao DNA.

O impacto de um derramamento de óleo no porto da Suécia (Göteborg) foi investigado utilizando a espécie *Zoarces viviparus* pelo ensaio cometa, seguido da detecção de metabólitos de HPA em bile após 3 semanas do derramamento. Níveis elevados de danos ao DNA pelo ensaio cometa e um pico para os metabólitos de HPA em bile foram detectados em peixes das áreas mais afetadas. Uma recuperação significativa das quebras de DNA e do percentual de células apoptóticas nos peixe coletados no local do derramamento foi observado após 5 meses (Frenzilli *et al.*, 2004).

1.2 Avaliação de mutagenicidade: Teste de mutagenicidade - *Salmonella/microsoma*

A mutagenicidade ambiental tem sido avaliada mais comumente pelo teste de *Salmonella* (Ames & Lee, 1973, Maron & Ames, 1983, Mortelmans & Zeiger, 2000). As linhagens TA98 e TA100 são conhecidas por responder a uma variedade de mutágenos ambientais incluindo HPA, nitroarenos, praguicidas, aminas aromáticas e heterocíclicas contendo –N e –S (Marvin *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 1985, Pelroy *et al.*, 1983). Muitos dos HPA, como o benzo(a)pireno, fornecem respostas positivas para o ensaios de mutagenicidade (teste de Ames) quando se utilizam as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*. Compostos como os HPA e as aminas aromáticas são mutagênicos, capazes de reagir com o DNA, somente após sofrerem biotransformação em compostos mais hidrofílicos o que é verificado quando adicionado preparações de fígado de rato (ativação metabólica - S9) ao ensaio. O benzo(a)pireno, por exemplo, se transforma via citocromo P450 em um epóxido, que é capaz de reagir com biomoléculas. As aminas aromáticas por sua vez através das mesmas enzimas são transformadas em hidroxilaminas, que são eletrofílicas. Essas espécies químicas podem ainda ser acetiladas pelas acetiltransferases produzidas pelos organismos, incluindo as bactérias, em compostos mais mutagênicos. Outras linhagens como a YG1041 que possuem alta expressão de nitroredutases e acetiltransferases podem detectar mais especificamente a mutagenicidade de compostos como os nitro-HPA e oxi-HPA que também apresentam alta mutagenicidade (Roubicek e Umbuzeiro, 2006).

1.3 Extração seletiva por Blue rayon (BR), teste de *Salmonella*/microsoma e metabólitos equivalentes de HPA.

O Blue rayon (BR) é um conjunto de fibras inertes de raiom ligadas covalentemente ao pigmento ftalocianina de cobre tiosulfato sendo utilizado como adsorvente de substâncias com estrutura molecular planar e policíclica presentes em amostras de alimentos, água e materiais biológicos (Hayatsu, 1992, Sayato *et al.*, 1993, Hayatsu *et al.*, 1996). O mecanismo pelo qual os compostos policíclicos são adsorvidos está diretamente relacionado com a característica planar deste tipo de molécula (Hayatsu, 1992) e uma grande estrutura molecular planar é formada pela ligação hidrofóbica (1:1) com o pigmento ftalocianina de cobre tiosulfato (Skog, 2004). Compostos com três ou mais anéis fundidos em sua molécula são preferencialmente adsorvidos pelo Blue rayon.

Metodologias utilizando o Blue rayon diferenciam-se de acordo com a matriz estudada. Para amostragem de água, por exemplo, tem sido utilizado o método denominado Blue rayon *in situ* descrito por Sakamoto e Hayatsu (1990), onde as mechas de blue rayon acondicionadas em redes de nylon conectadas a um peso e uma bóia permanecem imersas por 24h no local em avaliação. Após esse período as mechas são levadas ao laboratório para os procedimentos de preparo do extrato. A combinação do teste de *Salmonella*/microsossoma e extração utilizando Blue rayon vêm sendo utilizadas para avaliação da mutagenicidade por diversos autores (Kusamran *et al.*, 1994, Kira *et al.*, 1995, Otsu *et al.*, 1998, Kataoka *et al.*, 2000, Umbuzeiro *et al.*, 2004). Nos estudos desenvolvidos por Kusamran *et al.*, (1994) nos rios Chão Phraya (Bangkok, Tailândia), Sumida e Ara (Tóquio, Japão), a atividade mutagênica observada no teste de Ames foi atribuída a compostos da classe das arilaminas devido a seletividade do Blue rayon e das condições seletivas para aminas aromáticas no teste de mutagenicidade. Kira *et al.*, (1995), verificaram a eficiência da utilização do Blue rayon em águas marinhas e em organismos (moluscos) para estudos de monitoramento da atividade mutagênica e da quantidade de Benzo(a)pireno em regiões de Okayama (Japão), encontrando concentrações a partir de não detectado até 3,73ng/g equivalente/peso seco de molusco e até 19,5ng/g de Blue rayon para os extratos de água. Otsu *et al.*, 1998 utilizaram a combinação de extração com Blue rayon e teste de Ames para avaliar a distribuição e característica dos mutágenos presentes nas águas de três rios da Korea (China). Neste estudo verificaram alta atividade mutagênica nos rios receptores de efluentes industriais para a linhagem TA98 com S9 (> 2000 rev/placa) e atividade mutagênica negativa para os rios receptores de efluentes domésticos e resíduos da agricultura. Kataoka *et al.*, (2000) identificaram três aminas heterocíclicas mutagênicas no rio Danúbio (canal de Viena) utilizando Blue rayon e verificaram no teste de Ames com a linhagem TA98 com ativação metabólica que a mistura dessas aminas era responsável por 26% da atividade mutagênica total do extrato obtido. Em comparação com outros métodos de extração, Umbuzeiro *et al.*, (2004), verificaram que extratos de águas submetidas a tratamento, extraídos pela técnica de Blue rayon e resina XAD4 paralelamente possuíam de 16 a 28% da atividade mutagênica, atribuída a compostos policíclicos pela linhagem TA98 com e sem ativação metabólica respectivamente e 49% e 54% para a linhagem YG1041 nas mesmas condições.

A utilização do Blue rayon em fluidos biológicos, de um modo geral, já foi apresentada em trabalhos como de Mano *et al.*, (1995) que verificaram a

mutagenicidade usando *Salmonella typhimurium* TA98 com ativação metabólica (S9) em bile humana após tratamento com Blue rayon em população de baixo e alto risco de câncer de vesícula biliar. O tratamento com BR elimina a histidina presente na bile humana que afeta o crescimento das linhagens, permitindo sua avaliação pelo teste de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma. 60,5% das amostras obtidas da população de alto risco foram mutagênicas enquanto para a população de baixo risco, a mutagenicidade foi detectada em apenas 11,9% das amostras, demonstrando sensibilidade do método na diferenciação das duas populações. Mure *et al.*, (1996) verificaram a mudança na mutagenicidade urinária relacionando com vários estilos de vida. As amostras de urina obtidas de 69 homens foram submetidas à extração com BR e posteriormente fracionadas por cromatografia em coluna de celulose carboximetil, para retiradas de interferentes da urina que inibem a atividade mutagênica no teste de *Salmonella*. Os resultados demonstraram alta correlação com fatores como hábito de fumar e estado nutricional apresentando alta mutagenicidade para a linhagem TA98 com ativação metabólica. Baixa mutagenicidade foi encontrada para as amostras de indivíduos que possuíam boas praticas de saúde. Yoxall *et al.*, (2004), verificaram a mudança na mutagenicidade urinária, como resultado de uma dieta particular, visto que o método de cozimento, tempo e temperatura, aparecem com principais fatores na geração de amins heterocíclicas. O teste de Ames foi feito com a linhagem YG1024 que super expressam acetiltransferases com e sem ativação metabólica após extração com Blue rayon. A mutagenicidade observada após o consumo de carne cozida teve seus níveis normais de mutagenicidade restaurados após 24h. Uma eficiência de 92% foi observada utilizando o BR para extração de amins heterocíclicas, podendo o mesmo ser lavado e reutilizado sem perda da eficiência da extração.

O uso de Blue rayon em extrações de matrizes biológicas como bile de peixes para avaliações ambientais não foi encontrado na literatura e tendo em vista sua eficiência seletiva em alguns fluídos biológicos humanos, foi de interesse verificar sua eficiência em bile de peixes em nosso estudo, bem como realizar a análise de metabólitos equivalentes de HPA em bile bruta para avaliação da exposição ambiental da biota, uma vez que a concentração nos tecidos podem não refletir a exposição devido à rápida biotransformação desses compostos em peixes (Varanasi *et al.*, 1989) e verificar uma possível correlação entre mutagenicidade dos extratos de bile/BR e a concentração de metabolitos equivalentes de HPA. Este tipo de análise tem sido utilizada em trabalho como o de Silva *et al.* (2006) que verificou a exposição recente a

HPA de origem petrogênica em ambiente marinho em diferentes espécies de peixes no canal de São Sebastião – SP.

1.4 Estudos moleculares

Muitos xenobióticos naturais e poluentes orgânicos são detoxificados ou bioativados por enzimas de biotransformação (Stegemam *et al.*, 1991), ligando-se covalentemente as proteínas e ao DNA (Livingstone, 1991). As consequências desta bioativação incluem não só efeitos ao nível das funções celulares normais, podendo até conduzir ao desenvolvimento de doenças e cânceres (Livingstone, 1993, Regoli *et al.*, 2000, Dailianis *et al.*, 2003, Kalpaxis *et al.*, 2004). A detecção de danos genéticos podem ser sinais de advertência bem como precursores de possíveis patologias, inclusive em humanos (Jha *et al.*, 2000), uma vez que os peixes e invertebrados parecem expressar danos genéticos similares aos encontrados em humanos (Dixon *et al.*, 2002). Além disso, muitas espécies fazem parte da cadeia alimentar humana, sendo importante ter o conhecimento do destino dos contaminantes genotóxicos dentro destes organismos, bem como da sua capacidade de bioacumulação ou ainda, de produzir metabólitos secundários genotóxicos (Kurelec, 1993, Lyons *et al.*, 2000, Kalpaxis *et al.*, 2004).

Para a verificação de danos em nível molecular é necessário conhecer a sequência do gene de interesse. Para amplificação da sequência de um gene específico é necessário o desenvolvimento e padronização de técnicas de biologia molecular. Para tal devem ser consideradas diversas variáveis inerentes as metodologias a serem aplicadas para obtenção da sequência.

O acúmulo de certos contaminantes ambientais tem sido correlacionado à severidade de lesões de fígado observada em populações de peixes (Kohle, 1989; Myers *et al.*, 1991). São diversos os genes envolvidos no processo de carcinogenicidade, dentre eles incluem o gene *p53* e o gene *ras*. O gene *p53*, que codifica para a proteína p53, promove a repressão do ciclo celular ou apoptose para a resposta de uma variedade de estresses celulares (Kastan *et al.*, 1991). Esta proteína é uma supressora de tumores cujo papel fundamental é a manutenção da estabilidade e homeostase celular. Os produtos deste gene participam em processos celulares críticos, incluindo a reparação de DNA (Wang *et al.*, 1995; Mummenbrauer *et al.*, 1996), o controle do ciclo celular (Hartwell and Kastan, 1994), o envelhecimento (Bond *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1994) e a morte

celular programada (Lowe *et al.*, 1993). Vários autores sugerem que os níveis da proteína p53 são aumentados por vários tipos de danos genéticos tais como radiação UV e benzo(a)pireno (Fritsche *et al.*, 1993; Kastan *et al.*, 1991; Zhan *et al.*, 1993; Di Leonardo *et al.*, 1995; Hesse *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1993; Kamb, 1995; Ziegler *et al.*, 1994; Bjelogrljic *et al.*, 1994). Evidências sugerem uma relação causal entre desenvolvimento de tumor em peixes e exposição a certos poluentes, em particular aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e bifenilas policloradas (PCB) (Malins *et al.*, 1987; Baumann *et al.*, 1995). Lesões neoplásicas e pré-neoplásicas têm sido observadas em numerosas espécies de peixes bentônicos habitantes de áreas costeiras próximas a centros urbanos e industriais (Mix, 1986; Harshbarger *et al.*, 1993). O aumento de evidências sugere uma relação causal entre desenvolvimento de tumor em peixes e exposição a certos poluentes, em particular aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e bifenilas policloradas (PCBs) (Malins *et al.*, 1987; Baumann *et al.*, 1995). Apesar de carcinomas serem raros em peixes (Vethaak and Wester, 1996) características histopatológicas e ocorrência de lesões neoplásicas e preoneoplásicas mostra-se muito semelhantes em peixes e mamíferos (Myers *et al.*, 1995).

Há evidências que os HPA têm uma função importante na etiologia nos tumores de fígado observados (Rotchell *et al.*, 2001; Malins *et al.*, 1985; Varanasi *et al.*, 1987). A presença de metabolitos de HPA em bile (Khran *Et al.*, 1986) aumenta os radicais livres nos microssomos hepáticos (Varanasi *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1990; Vincent *et al.*, 1998), adutos de DNA (Varanasi *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1990; Vicent *et al.*, 1998), e modificações de DNA (Malins *et al.*, 1990). Como resultado desses estudos, os HPA têm sido fortemente relacionados no processo de carcionogênese hepática de peixes. O gene *ras* tem sido descrito em algumas espécies de peixes como o *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Rivulus marmoratus*, *Oryzias latipes*, *Danio rerio* entre outras. A família do gene *ras* é altamente conservada através das espécies, especialmente nos 90 primeiros aminoácidos e também apresentam boa homologia com o gene *ras* de mamíferos (Rotchell *et al.*, 2001). A ativação do gene *ras* em peixes pode auxiliar no diagnóstico ambiental para contaminações químicas específicas (Rotchell *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Verificar a viabilidade de monitorar a qualidade ambiental do canal de Piaçaguera (Baixada Santista), utilizando biomarcadores genotóxicos em peixes.

2.2. ESPECÍFICOS

Avaliar níveis de danos genotóxicos em peixes da espécie *Mugil curema* coletados no canal de Piaçaguera e na região de referência (canal de Bertioga) por meio de análises de micronúcleo e cometa em sangue total.

Avaliar a exposição a compostos policíclicos mutagênicos utilizando o teste de *Salmonella*/microsoma em extratos de bile obtidos por Blue rayon.

Padronizar um protocolo para amplificação de genes relacionados ao processo de carcinogênese na espécie *Mugil curema*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aparelhagem

- Agitador do tipo *vortex* (FISHER SCIENTIFIC - mod. 232)
- Autoclave horizontal (BAUMER)
- Balança analítica (METTLER TOLEDO mod-AT201)
- Balança semi-analítica (METTLER TOLEDO mod. PB3002 - S)
- Banho-maria (FANEM mod. 100)
- Banho seco (SYBRON/THERMOLINE mod 16525)
- Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical) (TROX TECHNIK – classe 2B)
- Capela de segurança química (COMTEC ENGENHARIA de LABORATÓRIO)
- Centrífuga com refrigeração (BECKMAN mod. J2-HS)
- Contador automático de colônias (ACCUCOUNT 1000 – BIOLOGICS)
- Cuba de eletroforese de acrílico
- Estufa para esterilização e secagem (FANEM mod. 320E)
- Estufa com exaustão e circulação interna de ar para secagem de amostras (FANEM mod. 320E)
- Embarcação a motor para cinco (5) pessoas
- Fonte de eletroforese Model 200/2.0 Power Supply (BIO-RAD)
- Freezer -20°C (ELETROLUX)
- Freezer -70°C (REVCO mod. ULT1386-7D29)
- HPLC (Agilent Technologies 1200) com sistema de fase reversa analítica acoplada a três detectores UV-F (Agilent 1200 series)
- Incubadora bacteriológica (REVCO mod. BOD50A14)
- Incubadora com agitação (NEW BRUNSWICK INC. SCIENTIFIC mod. G24)
- Máquina de lavar vidraria (LANCER)
- Mesa agitadora alternativa (Shaker) (NEW BRUNSWICK INC. SCIENTIFIC mod R2)
- Microscópio Óptico/Fluorescência (LEICA DMLD)
- Placa aquecedora (CORNING mod PC-420)

- Potenciômetro (FISHER SCIENTIFIC- mod.15-077-8D)
- Refrigerador (ELETROLUX)
- Termômetros digitais de máxima e mínima (FISHER SCIENTIFIC - ACCUMET mod-15)
- Ultra purificador de água (USF-ELGA)

3.2 Vidraria

- Ampolas de kuderna
- Balão de evaporação
- Beckers
- Cuba para coloração de lâminas de vidro
- Erlenmeyers
- Frascos de coleta
- Frascos para preparo de meio de cultura
- Frascos para soluções
- Tubos de ensaio com tampa de teflon
- Tubos de ensaio de vidro descartáveis
- Lâminas de microscopia com extremidade fosca (26 x 76 x 1.0mm)
- Lamínula (24 x 60 x 0,13 a 0,16mm)
- Pipeta *Pauster*
- Pipetas graduadas
- Provetas graduadas com e sem tampa de teflon

3.3 Outros materiais

- Agulhas descartáveis 25 x 7
- Alças de inoculação
- Bico de Bunsen
- Blue rayon (SIGMA-ALDRICH)
- Bóias de Isopor
- Cabos de nylon

- Caixas térmicas
- Colete Salva-vidas
- Estantes para tubos
- Filtros descartáveis para esterilização (MILLIPORE- 0,45 μ m)
- Fitas adesivas
- Frascos Eppendorf (0,5 mL)
- Lâmpadas amarelas
- Lâmpada germicida (UV)
- Luvas de procedimentos de latex
- Micropipetadores
- Óculos de proteção
- Papel de filtro
- Papel alumínio
- Parafilme
- Pera automática de sucção
- Pinças
- Pipetas plásticas descartáveis
- Placas de Petri descartáveis
- Ponteiras (200 – 1000 μ L)
- Protetor facial
- Redes de nylon
- Seringa 1mL
- Tesouras de dissecação (pequena e média)
- Tubos de centrífuga descartáveis (15mL)
- Tubos eppendorf (0,2 and 1,5mL)
- *Vials* para cromatografia

3.4 Reagentes

- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) P.A. (CARLO ERBA)
- Ácido clorídrico (HCl) P.A. (SYNTH)

- Ácido nítrico (HNO_3) P.A. (SYNTH)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A. (SYNTH)
- Álcool etílico absoluto P.A. (SYNTH)
- Ampicilina (SIGMA-ALDRICH)
- Bacto ágar (DIFCO)
- β - fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo - NADP (SIGMA-ALDRICH)
- D- Biotina (SIGMA-ALDRICH)
- Caldo nutriente n° 2 (OXOID)
- Cloreto de magnésio - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ P.A. (CARLO ERBA)
- Cloreto de potássio - KCl P.A. (MERCK)
- Cloreto de sódio - NaCl P.A. (MERCK)
- Cristal violeta (MERCK)
- Fosfato de potássio dibásico - K_2HPO_4 P.A. (CARLO ERBA)
- Fosfato de sódio e amônio - $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ P.A. (FLUKA)
- Fosfato de sódio dibásico - Na_2HPO_4 P.A. (CARLO ERBA)
- Fosfato de sódio monobásico - NaH_2PO_4 P.A. (CARLO ERBA)
- Fração S9 (MOLTOX INC.)
- Glicose (MERCK)
- D-Glicose 6-fosfato (SIGMA-ALDRICH)
- Hidróxido de sódio - NaOH P.A. (VETEC)
- L-histidina HCl (SIGMA-ALDRICH)
- 4-Nitroquinolina-1-óxido (4NQO) (SIGMA-ALDRICH)
- 2- Aminoantraceno (2 AA) (SIGMA-ALDRICH)
- 2- Nitrofluoreno (2 NF) (SIGMA-ALDRICH)
- Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.A. (CARLO ERBA)
- EDTA P.A. - ácido etilenodiamino tetra-acético - $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ (VETEC)
- Tris- HCl (SIGMA-ALDRICH)
- Triton X – 100 (SIGMA-ALDRICH)
- Dimetilsulfóxido Espectranal - DMSO (SIGMA-ALDRICH)
- Brometo de Etídio – Tabletes (AMERSHAN LIFE SCIENCE)
- Agarose normal (NMP) – Grau molecular (BIOAGENCY)
- Agarose Low Melting Point (LMP) – Biologia molecular (SIGMA-ALDRICH)

- Giemsa – Eosin Methylenblow (MERCK)

3.5 Meios de cultura, soluções e kits para biologia molecular

3.5.1 Teste de *Salmonella*/microsoma (Kado *et al.*, 1983)

- Meio de Vogel Bonner:

Adicionar 10g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 100g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 175g de fosfato de sódio e amônio ($\text{NaH}_2\text{N}_2\text{H}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 500g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e completar para 1litro de solução com água ultrapura quente. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho maria.

- Solução de glicose 10%:

Dissolver 20g de glicose em 200mL de água ultrapura. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho-maria.

- Solução de ágar:

Dissolver 15g de ágar em 780mL de água ultrapura. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho-maria. Em seguida, esta solução deve ser esterilizada por 30 minutos.

- Solução de biotina e histidina 0,5mM

Dissolver a quente 0,122g D-biotina e 0,105g de L-histidina em 1L de água ultrapura. Após esterilização por membrana de 0,45µm a solução deve estocada sob refrigeração em frasco estéril ambar e envolto por papel alumínio.

- Ágar mínimo:

Composto por 200mL de solução de glicose 10%, 780mL de solução de ágar, 20mL de meio Vogel Bonner (50x) e 12mL de solução de biotina e histidina 0,5mM.

- Caldo nutriente:

25g do caldo nutriente são dissolvidos em 1L de água ultrapura. Em seguida, distribuir volumes de 20mL em frasco com tampa de rosca, e submetê-los à esterilização em autoclave.

- Ágar de superfície para método de microssuspensão (Kado)

Dissolver 6g de Bacto ágar e 6g de cloreto de sódio (NaCl) são dissolvidos em 900mL de água ultrapura, sob aquecimento, sem ferver. Adicionar 100mL de solução biotina/histidina 0,5mM e homogenizar. Distribuir volumes de 150 mL em frascos com tampa de rosca e submetidos à esterilização em autoclave.

- Ágar Nutriente:

Composto de 25g de caldo nutriente, 15g de ágar e 1 litro de água ultrapura. Esterilizar em autoclave a 121°C por 20 minutos e distribuir 25 mL em placas de Petri estéreis.

- Solução de biotina 0,5mM

0,012g de D-biotina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. A solução deve ser estocada em refrigerador após esterilização em membrana filtrante de 0,45µm.

- Solução de histidina 0,5%

0,5g de L-Histidina são dissolvidos em 100mL de água destilada aquecida. A solução deve ser estocada em refrigerador após esterilização em membrana filtrante de 0,45µm.

- Solução de ampicilina:

Dissolver 0,08g de ampicilina em 10mL de hidróxido de sódio 0,02N. Esterilizar a solução em membrana filtrante de 0,45µm e armazenar em refrigerador em frasco âmbar.

- Solução de canamicina:

Dissolver 0,08g de canamicina em 100mL de ácido clorídrico 0,02N. Esterilizar a solução em membrana filtrante de 0,45µm e armazenar em refrigerador em frasco âmbar.

- Mistura S9 – 4% v/v

Cada 100mL de mistura S9 contém: 4mL de fração S9, 2mL de solução de sais, 0,5mL solução de glicose-6-fosfato 1M, 50mL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4, 4mL de NADP 0,1M e 39,5mL de água ultrapura. O preparo da solução deve ser realizado de forma asséptica, e em seguida a solução deve ser mantida sob refrigeração mesmo durante seu uso. Após 3 horas a solução excedente deve ser descartada.

- Fração S9

Preparada a partir de microsomas de células de fígado de rato, tratado com o indutor enzimático AROCLOR 1254 e separado por centrifugação a 9000g. É adquirida na forma liofilizada e por isso é necessário ressuspender cada ampola em 2,1mL de água ultrapura estéril e armazenar a -20°C.

- Solução de sais (0,4M cloreto de magnésio (MgCl_2):1,65M cloreto de potássio (KCl))

Dissolver 8,13g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 12,3g de cloreto de potássio (KCl) em 100mL de água destilada. Autoclavar a solução e mantê-la em refrigerador.

- Solução de glicose-6-fosfato 1M:

Dissolver 3,041g de glicose-6-fosfato (PM = 304,1) em 10mL de água ultrapura. Esta solução deve ser esterilizada por membrana filtrante de 0,45 μm e armazenada a -20°C.

- Solução de NADP 0,1M:

Solução A

Dissolver 1g de NADP (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, PM= 765,4) em 13,6 mL de água ultrapura. Esta solução deve ser esterilizada por membrana filtrante de 0,45 μ e armazenada a -20°C.

Tampão fosfato 0,2 M:

2,84g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) são dissolvidos em 100mL água ultrapura.

Solução B

2,76g de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) são dissolvidos em 100mL água destilada.

Misturar 81mL da solução A e 19mL da solução B, ajustando o pH para 7,4 com a solução A ou B. Esterelizar em autoclave e estocar o tampão em refrigerador.

- Ágar mínimo para preparo de placas master:

Proceder conforme o preparo do Ágar Mínimo, substituindo a solução de biotina e histidina 0,5mM D-biotina 0,66 mg/L, L-histidina 50mg/L, ampicilina 25,20mg/L e sulfato de canamicina 25,20mg/L.

3.5.2 Teste de Micronúcleo

- Solução de Giemsa

Dissolver 1g de Giemsa em pó em 54mL de glicerina a 60°C. Deixar esfriar até atingir 25°C. Adicionar 84mL de metanol. Deixar o frasco bem fechado e ao abrigo da luz por 1 semana. Filtrar em papel de filtro sem expor a luz e armazenar em frasco âmbar.

- Solução de Giemsa para Uso

Diluir 1mL da solução de Giemsa em 30mL de Tampão Fosfato

OBS: O tampão Fosfato para diluição da solução de Giemsa para uso pode ser o mesmo utilizado no ensaio cometa.

3.5.3 Ensaio Cometa

- Solução de lise – estoque (1000 mL)

2,5 M NaCl	146,1 g
100mM EDTA	37,2 g
10mM Tris-HCl.....	1,2 g

Acrescentar 700 mL de água destilada em vidraria graduada e ajustar o pH para 10 com o auxílio de NaOH. Após o ajuste, complementar para 1000mL com água destilada. Finalmente, adicionar 10g de N-lauroil-sarcosinato. O armazenamento poderá ser feito à temperatura ambiente, em frasco âmbar, de forma a prevenir a incidência de luz. Validade: 6 meses.

- Solução final de lise – uso (100mL)

Triton X – 100.....	1mL
DMSO.....	10mL

Completar para 100mL com solução de lise estoque.

Colocar a solução final de lise em cuba opaca ou revestida destinada a lâminas histológicas, de forma a prevenir a incidência de luz, mantendo-a em refrigerador a 4°C (por aproximadamente 2 horas).

- Tampão Fosfato – PBS (1000mL)

NaCl.....	8g
KCl.....	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,14g
KH ₂ PO ₄	0,2g

Armazenar em refrigerador a 4°C. Validade 6 meses.

- Tampão de Eletroforese

As soluções deverão ser preparadas separadamente:

- Solução 1 - EDTA 200mM

EDTA	14,89g
Água destilada.....	200mL

Ajustar o pH para 10 com o auxílio do NaOH. O armazenamento poderá ser feito à temperatura ambiente. Validade: 2 semanas após o preparo.

- Solução 2 - NaOH 10N

NaOH.....200g
 Água destilada.....500mL

Armazenar a temperatura ambiente. Validade: 2 semanas após o preparo.

Misturar 5mL da solução 1 a 30 mL da solução 2, completando para 1000mL com água destilada. Verificar se o pH está superior a 13 (alcalino). Se não estiver, descartar e refaça as soluções.

- Tampão de Neutralização

0,4 M Tris-HCl.....48,5g

Acrescentar 700 mL de água destilada, ajustar o pH para 7,5 utilizando HCl e completar para 1000mL com água destilada. O armazenamento poderá ser feito à temperatura ambiente. Validade: 6 meses após o preparo.

- Solução de Coloração (solução estoque) - 200µg/mL

Brometo de Etídio.....10mg

Água destilada.....50mL

Manusear o brometo de etídio em capela química com luvas descartáveis.

- Solução de Coloração (solução de uso) - 20µg/mL

A solução de uso deverá ser preparada sob diluição na proporção de 1:10 (1mL de solução de coloração estoque e 9mL de água destilada). O armazenamento é feito em temperatura ambiente e de modo a prevenir a incidência da luz.

3.5.4 Amplificação de genes

- Kit Qiagen – 74904
- Kit Promega – M6101
- Kit Invitrogen – 11904-018

3.6 Esterilização e teste de esterilidade

Os meios de cultura e soluções utilizados neste trabalho foram esterilizadas em autoclave a 121°C (1 atm) por 20 minutos a não ser quando especificado. A esterilização da vidraria foi feita em estufa a 180°C, por 2 horas. Todas as placas de Petri e pipetas descartáveis utilizadas foram adquiridas previamente esterilizadas por radiação γ - cobalto.

O teste de esterilidade foi realizado colocando os meios de cultura em estufa a 37°C por pelo menos 12 horas, sendo descartadas as placas que apresentassem qualquer tipo de crescimento bacteriano ou fúngico.

3.7 Lavagem de vidraria

Todos os materiais utilizados foram descontaminados em autoclave a 121°C por 30 minutos e em seguida lavados com detergente neutro, enxaguados várias vezes e mantidos em solução de ácido sulfúrico/ ácido nítrico 30% (6:1) por 8 horas. Após esse período, o material era enxaguado de 8 a 10 vezes com água corrente e posteriormente lavado uma vez com água ultrapura. Os materiais de vidro de volume não preciso eram secos em estufa a 170-180°C.

3.8 Caracterização das regiões de estudo e pontos de amostragem

A determinação de regiões de referência é sempre um desafio a ser considerado visto que, não há ambientes totalmente isento de contaminantes. O que é observado em ambientes considerados de referência são concentrações não detectadas por métodos físico-químicos e/ou efeitos adversos não observáveis na biota local. O canal de Bertioça (23°53'875" S e 46°11'667" W), localizado no Guarujá-SP, foi considerado como região de referência, em nosso estudo, por não possuir fontes de contaminação direta tanto de origem urbana quanto industrial. Esta região ainda possui valores abaixo dos limites estabelecidos pela legislação vigente para HPA prioritários e metais carcinogênicos determinados em água e sedimentos utilizando as técnicas espectrométricas de absorção atômica de forno de grafite (GFAAS) e emissão atômica

óptica com plasma de argônio (ICP OES) (Quinaglia, 2006). A maior potência mutagênica observada nesta região é de apenas 2,0 revertentes/mg de sedimento para a linhagem YG1041 em presença de ativação metabólica (Lamparelli *et al.*, 2008). A região ainda apresenta valores inferiores aos observados em regiões remotas em outros países (Chen *et al.*, 2004). De acordo com esses dados, o canal de Bertioga foi considerado como região de referência, em comparação com áreas sob influência direta de fontes de contaminação urbana e industrial como a Baixada Santista.

O sistema estuarino de Santos, inserido na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, foi um dos mais importantes exemplos brasileiros de degradação ambiental por poluição hídrica e atmosférica de origem industrial em ambientes costeiros. A região abriga o maior porto da América Latina (Porto de Santos) e um dos maiores complexos industriais petroquímicos e metalúrgicos do Brasil (Medeiros e Bicego, 2004). Em diversos estudos realizados nesta região onde foram avaliados os impactos da poluição nas águas, sedimentos e organismos aquáticos, foi constatado comprometimento do ambiente aquático em todos os locais estudados (Tommasi, 1979; CETESB, 1979; CETESB, 1981; Johnscher-Fornasaro & Zagatto, 1985; CETESB, 1989). Apesar de atualmente a região apresentar índices mais baixos de contaminação para diversos contaminantes na água, ainda se evidencia persistência de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) genotóxicos entre outros contaminantes nos sedimentos da região (CETESB, 2001; Bicego & Medeiros, 2004). O canal de Piaçaguera recebe influência direta dos efluentes industriais de uma siderúrgica, de esgoto doméstico bem como de atividades portuárias tais como navegação e processos de dragagem (CETESB, 2001).

Em nosso estudo, foram selecionados dois pontos de coleta e amostragem (Figura 1). O ponto 1 está localizado no sistema estuarino de Santos (S 23°52'69.3''; W 46°22'62.5'') equivalente as proximidades do ponto 5 do Relatório Técnico – Sistema Estuarino de Santos e São Vicente (CETESB, 2001; Roubicek, 2003) e o ponto 2, selecionado como ponto de referência, encontra-se localizado no canal de Bertioga (S 46°11'66.7''; W 23°53'87.5'') nas proximidades do rio Iriri.

Figura 1: Localização dos pontos de coleta e amostragem no Canal de Piaçaguera e na região de referência (Canal de Bertioga). Map Data: Landsat ETM+ image of 03/04/2000, R5G4B3 false color composition, obtained from <http://glcf.umiacs.umd.edu>. <http://glcf.umiacs.umd.edu/aboutUs/>.

3.9 Material biológico

O organismo teste usado nos experimentos foi a espécie *Mugil curema* (Perciformes, Mugilidae), popularmente conhecido como Parati (Figura 2). Peixes da família Mugilidae têm sido amplamente utilizados em estudos ambientais. Elas são comumente encontradas ao longo da costa de diversos países da América do Sul e Europa e habitam águas marinhas costeiras e estuários. O seu comportamento alimentar inclui invertebrados bentônicos, microrganismos, detritos e partículas de material orgânico (Ferreira *et al.*, 2006; Neves *et al.*, 2007, Johnson-Restrepo *et al.*, 2008).

As coletas de material biológico, em ambos os pontos, foram realizadas entre fevereiro a dezembro de 2006 totalizando seis amostragens neste período. Duas amostragens adicionais, após eventos de dragagem do canal, foram realizadas no ponto 1 nos meses de abril e julho de 2007. A coleta e transporte de material biológico foi autorizada pelo IBAMA sob a autorização nº 063 – DIFAP/IBAMA de 26 de maio de 2006 conforme documento em anexo (Anexo I) e os ensaios com animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal CEEA/FCF-USP em 1º de agosto de 2005 (Anexo II), estando de acordo com os princípios éticos na

experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Figura 2: Espécime de *Mugil curema* (Parati).

A captura dos exemplares de *Mugil curema* em ambos os pontos de coleta foi realizada por pescadores pela técnica tipo cerco (Figura 3A-B), utilizando redes de arrasto. Após a pesca, os exemplares foram mantidos em tambor perfurado sob a água e a coleta de sangue executada utilizando-se seringa heparinizada por punção caudal. As amostras de sangue foram transportadas em gelo ao abrigo da luz para execução dos ensaios. Os peixes foram levados ao laboratório, em caixa térmica contendo gelo, para dissecação e extração da vesícula biliar. As vesículas biliares foram retiradas e mantidas a -70°C até extração orgânica. Aproximadamente 80 (oitenta) espécimes foram capturados em cada ponto de coleta apresentando uma média de tamanho e peso de $27,17\text{cm} \pm 0,53$ e $215,35\text{g} \pm 11,57$ para os peixes coletados no canal de Piaçaguera (ponto 1) e $28,21\text{cm} \pm 2,15$ e $205,16\text{g} \pm 9,13$ para os peixes coletados no canal de Bertiooga (ponto 2). O tamanho da malha da rede de pesca adotada permitiu a seleção dos indivíduos por tamanho para coletar apenas indivíduos adultos, minimizando as diferenças intraespecíficas relacionadas à idade dos espécimes.

Figura 3A - B: Pesca tipo cerco, utilizando redes de arrasto.

3.10 Análises complementares

3.10.1 Atualização de dados: Canal de Piaçaguera (Água e sedimentos)

A região de Piaçaguera tem sido avaliada ao longo dos anos quanto aos índices de contaminação em suas águas, sedimentos e organismos (CETESB, 1979; CETESB, 1981; CETESB, 1989; CETESB, 2001). Devido à falta de informações recentes, realizamos nova amostragem de águas para análise de mutagenicidade do canal de

Piaçaguera utilizamos a técnica de Blue rayon (BR) *in situ* (Sakamoto & Haytsu 1990; Kira *et al.*, 1995). A técnica consiste na utilização das fibras de Blue rayon previamente lavadas e que apresentaram resultados negativos para o teste de *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão (Kummrow *et al.*, 2003). Estas fibras são acondicionadas em redes de nylon conectadas a uma poita (5 kg) e a uma bóia através do cabo de nylon. Este conjunto (Figura 4) foi disposto no ponto de amostragem no canal de Piaçaguera (S23°52'34" e W46°22'09") nas proximidades do local de coleta de peixes e as fibras permanecem imersas por 24h. Para cada amostragem foram utilizadas 15g de Blue rayon divididos em redes contendo 5g cada, sendo conectadas a 40 cm da poita no cabo de ligação com a bóia. Após o período de 24h o conjunto foi removido e as fibras de Blue rayon transportadas ao laboratório em frasco coberto ao abrigo da luz em caixa de isopor com gelo para a realização dos procedimentos de preparo dos extratos em colunas com resina XAD4 e posterior avaliação de mutagenicidade (ensaio *Salmonella*/microsossoma).

Kummrow *et al.*, 2006.

Figura 4: Conjunto Blue rayon-ancorado, utilizado no método *in situ*.

As amostras de sedimentos foram coletadas com draga de Van Veen, em quantidades aproximadamente de 500g. Foram acondicionadas em plásticos atóxicos e vedadas para minimizar processos de oxidação e transportados ao laboratório em caixas de isopor com gelo. A coleta do sedimento foi realizada em três diferentes pontos, no canal de Piaçaguera, nas proximidades do local de coleta de peixes: S23°52'13" e

W46°22576 - proximidade da bóia 24 do canal, S23°52633 e W46°22562 - entre a bóia 24 e 22 e S23°52734 e W46°22609 - proximidade da bóia 22. As amostras foram analisadas quanto a presença de hidrocarbonetos prioritários por CG-MS pelo método EPA 3270C, após extração (método EPA 3550) utilizando hexano e acetona em ultrassom, com “clean-up” em coluna cromatográfica usando sílica-gel eluída com mistura de hexano-diclorometano (método 3630C), em colaboração com o laboratório Biogeoquímica Ambiental (LBGqA) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.10.2 Análise de metabólitos equivalentes de HPA

As análises de metabólitos equivalentes de HPA foram executadas em cooperação com o Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico – USP. Amostras brutas de bile, reunidas em pools por amostragem, foram analisadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) acoplada com detecção de fluorescência. A análise foi realizada de acordo Krahm *et al.* (1984), com algumas modificações. Alíquotas de 5 µL de bile bruta foram injetados no HPLC (Agilent Technologies 1200) equipado com um sistema de fase reversa analítica coluna 4,6 x 150 mm, C18 Synergi 4 µm Hydro-RP 80A (Phenomenex), a 2 µm, 0,84 µL (volume interno) de aço inoxidável pré-coluna filtro (Upchurch Científica) e um 2 x 20 mm, C18 guarda-coluna embalada a seco (Upchurch Científico). O sistema foi acoplado a três detectores UV-F (Agilent 1200 series). Os cromatogramas foram registrados em emissão/excitação por comprimento de onda aos pares para cada detector de BaP, NAF e FEN respectivamente: 380/430 nm, 290/335 e 249 nm/364 nm. Ácido acético/água (5 µL/L) (solvente A) e metanol (solvente B), foram utilizadas, começando com 0,8 mL/min de fluxo de 90% solvente A, passando 5 minutos a 100% de solvente B; 7 min a 100% de solvente B, 0,5 minutos para aumentar o fluxo de 1,5 mL/min, para 3,5/min, em 100% de solvente B em 1,5 mL/min, 0,5 min para voltar a 100% solvente A e diminuir o fluxo para 0,9 mL/min. A temperatura da coluna foi de 50°C.

Uma solução padrão contendo NAF (1,0 ng/µL); BaP (1,0 ng/µL) e FEN (0,5 ng/µL) foi utilizada como padrão externo. Picos eluídos após 1 min foram integrados, reduzidos e quantificados os NAF, FEN, ou BaP equivalentes. Esses picos representam todos os compostos presentes na amostra de bile que fluorescem em cada par de comprimentos de onda. O limite de detecção para cada grupo de metabólito equivalente

foi determinado como correspondente a três vezes o desvio padrão da média de seis replicas de análises, que foram: 0,12 mg/g para FEN; 0,09 mg/g para o BaP; 0,33 mg/g para NAF. O material de controle utilizado na análise de HPA metabolitos biliares equivalentes foi bile de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) exposta a petróleo (Monterey Bay) por 48 h (ASMBC). Este material foi doado pelo Noroeste Fisheries Science Center (NWFSC), onde tem sido usada para análise bile desde 2001.

O sistema HPLC foi considerado estável após 5 repetições da injeção da solução-padrão, uma do material controle, uma replica de metanol e de uma amostra em branco. Quando o desvio padrão da área média de cada composto na norma foi inferior a 15% RSD, o material foi inferior ou superior dentro dos limites do controle, o metanol em branco foi inferior a 10% das amostras compostos, e replicas a amostra injeção foi de 10% RSD, conjuntos de cada amostra, o sistema de HPLC foi considerado estável, com uma validade de Garantia de Qualidade (QA). Quando algum destes critérios não foi cumprido, as amostras foram reinjetadas após a ação corretiva para completar o sistema. Para todos os conjuntos amostra, os resultados analíticos cumpriram os critérios laboratoriais.

3.10.3 Desenvolvimento de protocolo para amplificação dos genes *p53* e *ras* em fígado de peixes da espécie *Mugil curema*.

O desenvolvimento do protocolo de amplificação foi realizado na Universidade de Aveiro – Portugal, através da cooperação com o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar entre os meses de maio a outubro de 2008 com recursos disponibilizados através do programa Santander de mobilidade internacional.

Para a realização destas análises foi realizada uma amostragem adicional em junho/2008 para ambos os pontos de amostragem. Os fragmentos de fígado foram mantidos em RNAlater, essencial para a manutenção da integridade do material, e congelado a -70°C e enviados em gelo seco para realização das análises moleculares.

3.10.3.1 Extração de RNA de fígados de peixes (kit Qiagen - 74904)

O RNA de fígado de peixes de *Mugil curema* foi extraído utilizando kit de extração da Qiagen (74904). A assepsia do local de extração, bem como de todo o

material utilizado no procedimento foi rigoroso evitando contaminações das amostras e garantindo a qualidade do RNA final, cuidados de suma importância para a sequência das análises. De acordo com o protocolo sugerido pelo kit, foi preparado 600 µL de tampão RTL/fragmento de tecido. Todo o procedimento foi realizado em caixa com gelo com adição de álcool 70% para baixar a temperatura. Os fragmentos de fígados preservados em RNA later, imediatamente após a retirada dos exemplares, e acondicionado em freezer -70° foram transferidos, com auxílio de ponteiros, para tubo de PCR e mantidos no gelo durante a maceração com bastão de vidro, de pequeno diâmetro, para evitar o descongelamento total. Para facilitar a maceração foi adicionado de 100 - 200µL de tampão RTL e após a maceração o volume foi completado para 600 µL/fragmento. Antes de transferir os macerados para colunas (lilás) do kit, realizamos uma breve centrifugação (spin) para precipitar fragmentos maiores e que pudessem favorecer o entupimento da coluna. Após transferência para as colunas (lilás), as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a velocidade máxima (~14.000 rpm). As colunas (lilás) foram descartadas e adicionou-se ao centrifugado 350µL de etanol a 70% para ressuspender. A solução ressuspendida foi transferida para colunas (rosa) e realizada nova centrifugação durante 15 segundos a 10.000 rpm, sendo descartado o líquido após centrifugação e as colunas colocadas em novos tubos de 2mL. Acrescentamos 500µL de tampão RPE às colunas por 15 segundos a 10.000 rpm, descartando o líquido novamente e o processo de centrifugação por mais 15 segundos a 10.000 rpm foi repetido. Em seguida, foi adicionado 700µL de tampão RW1 às colunas realizando nova centrifugação também de 15 segundos a 10.000 rpm sendo no final desta o líquido e os tubos descartados. Outro tubo de 2mL foi acoplado as colunas (rosa) sendo acrescentado 500µL de tampão RPE e a centrifugação repetida (15 segundos a 10.000 rpm) descartando-se o líquido e repetindo a centrifugação nesta etapa por 2 minutos a 10.000 rpm descartando os tubos com o líquido. Um novo tubo de 2mL foi utilizado e as colunas centrifugadas por 1 minuto a velocidade máxima. Para finalizar as colunas foram transferidas para um eppendorf (1,5mL) e adicionado 30 µL de RNase-free H₂O diretamente na matriz das colunas. Para eluir as colunas foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000 rpm sendo esta última etapa repetida para obter uma maior concentração de RNA.

3.10.3.2 Quantificação do RNA (Método Quant-it)

Em um tubo de 0,5ml (fornecidos no kit) foi feita uma “working solution” diluindo o Quant-iT RNA reagent 1:200 (1µl) em Quant-iT RNA buffer (199µl). Esta solução não pode ser feita em tubos de vidro e não podem ser reaproveitadas sendo necessario fazer uma nova solução em novo tubo e limpo a cada quantificação em quantidades equivalentes ao número de amostras. O volume final em cada tubo deve ser 200µl contando com a amostra. Cada tubo de amostra poderá levar entre 180µl e 199µl da solução e de 1µl e 20µl de amostra de RNA. A solução e a amostra foram misturadas por breve centrifugação (2 a 3 segundos) e incubamos à temperatura ambiente durante 2 minutos antes da leitura.

3.10.3.3 Verificação de contaminação por DNA genômico e tratamento com DNase

A verificação de contaminação por DNA genômico foi feita por meio de uma corrida eletroforética gel de agarose 1,5% a 90V. Em 1µl RNA total extraído previamente, foi adicionado 2µl [Tampão de Amostra] RNA Buffer 2X e ao marcador 2µl de [TA] normal permitindo a identificação de bandas de DNA genômico. O RNA foi purificado através de tratamento com DNase utilizando kit M6101, Promega (DNase Treatment of RNA samples Prior to RT-PCR) de acordo com a tabela 1. A mistura foi centrifugada brevemente (3 – 5 sec) e colocadas em termociclador sendo incubadas a 37°C por 30 minutos. Após este período foi adicionado 1µl de RQ1 DNase Stop Solution para terminar a reação e incubado a 65°C por 10 minutos para inativar a DNase deixando as amostras prontas para a execução da reação de síntese do cDNA.

Tabela 1: Preparação da mistura de reação para tratamento com DNase.

Componentes	Volumes
Amostra de RNA (2µg)	Xµl
Buffer 10X	1µl
Dnase 1unid/µg	1µl
H ₂ O DEPC (sem RNase)	Xµl
Volume final	10µl

3.10.3.4 Síntese de cDNA (Invitrogen – 11904-018)

Em microtubos de PCR adicionamos 9 µl da mistura de reação (tabela 2) e adicionamos o RNA total obtido da digestão com DNase. O programa do termociclador para a síntese iniciou com a incubação a 25°C por 2 minutos da mistura da reação com as amostras, random hexamers e dNTPs (tabela 3). Com exceção do controle, adicionamos 1µl (50 unidades) de SuperScript II RT em cada tubo e incubamos 10 minutos por 25°C. O programa seguiu com mais um período de incubação de 50 minutos a 42°C, terminando a reação a 70°C por 15 minutos. Retiramos os tubos do termociclador e colocamos em gelo para a adição de 1µl de RNase H em cada tubo submetendo a uma breve centrifugação e última incubação por 20 minutos a 37°C.

Tabela 2: Preparação da mistura de reação para síntese de cDNA.

Componentes	Volume/Amostra
Buffer RT	2µl
MgCl ₂	4µl
DTT	2µl
Ribonuclease Inhibitor	1µl

Tabela 3: Preparação das amostras de RNA e controle para síntese de cDNA.

Componentes	Volumes	Controle + RT
RNA total (Produto de digestão com DNase)	10µl	-
RNA Controle (50ng/µl)	-	1µl
Random Hexamers (50ng/µl)	2,5µl	2,5µl
dNTP mix 10mM	1µl	1µl
H ₂ O DEPC	-	5,5µl

3.10.3.5 Preparo de amostras para seqüenciamento e análise das seqüências.

As amostras foram seqüenciadas para determinar a seqüência dos genes encontrados no estudo e foram preparadas por PCR das amostras de cDNA feitos em quadriplicata/amostra. As amostras foram concentradas utilizando um “speed vac”, que retira a água da amostra por vácuo. O volume final do concentrado de cDNA obtido por

tubo foi de 50 μ L/amostra, sendo reunidas em um único tubo para obter um volume final de 200 μ L. As concentrações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% com um volume de 2 a 5 μ L da amostra final. O seqüenciamento das amostras foi realizado em laboratório terceirizado e a análise das seqüências foram executadas por meio dos programas BioEdit, Blast e ClustalW respectivamente (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/Bioedit.html>, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> e <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

3.11 Teste de Micronúcleo

Dentre os testes mais freqüentemente aplicados às análises citogenéticas, o teste de micronúcleo é o mais rápido e sensível indicador de alterações estruturais, perda de DNA e anormalidades cromossômicas (Heddle *et al.*, 1983 e 1991). O micronúcleo se constitui de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal e são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros não inclusos ao núcleo principal após mitose. Logo, os micronúcleos representam perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico (Salvatori *et al.*, 2003). O teste consiste na preparação do esfregaço celular, fixação, coloração e análise (Lemos, 2000; Cavas *et al.*, 2005). No presente estudo, 10-20 μ L de sangue total foi colocado sobre lâmina para microscopia e procedido o esfregaço sangüíneo. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e fixada com solução de Carnoy's A por três vezes e coradas com Giemsa 10% por 30 minutos. A análise dos resultados, quanto à freqüência de células micronucleadas foi realizada utilizando microscopia óptica comum em imersão com aumento de 1000X (Figura 5). Mil (1000) a quatro mil (4000) células por indivíduo, foram analisadas em ambos os pontos de coleta. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste T de student para médias e variâncias desiguais ($\alpha=5\%$).

Figura 5: Metodologia de preparo e análise de micronúcleos em sangue total de peixes (*Mugil curema*).

3.12 Ensaio Cometa

O Ensaio cometa é uma técnica simples, rápida e sensível para análise e quantificação de danos em células individualizadas. Este teste foi primeiramente introduzido por Ostling and Johanson em 1984 e vem apresentando grande relevância em análises ambientais. O ensaio se baseia em uma técnica eletroforética realizada em condições alcalinas e tem se mostrado sensível, reprodutível, simples e rápido para a detecção de quebras de fita única de DNA e de lesões em sítios álcali-sensíveis em células eucarióticas *in vitro* e *in vivo* (Da Silva *et al.*, 2000). A variação de pH é de grande importância para o ensaio visto que em pH neutro (pH 7-8), são observadas duplas quebras de cadeia e quebras simples devido ao relaxamento do DNA. Em pH entre 12,1 e 12,5 quebras simples e duplas e sítios incompletos de reparo por excisão são detectados. Sendo assim em nosso ensaio usamos pH maior que 13 onde são detectadas tanto quebras simples quanto duplas, sítios álcali lábeis e sítios de reparo de excisão incompletos. O teste fundamenta-se na aplicação de uma corrente elétrica nas células individualizadas que resulta no transporte de fragmentos de DNA para fora do núcleo. A imagem da migração de DNA obtida se assemelha a um cometa com uma cabeça e uma cauda, dando origem ao termo (Klaude *et al.*, 1996; Singh & Stephens, 1997). As principais etapas do ensaio (Figura 6) podem ser resumidas em: obtenção do tipo celular, lise celular, eletroforese alcalina, neutralização, coloração e análise em

microscopia de fluorescência (Gontijo, *et al.*, 2003). Os resultados referentes ao ensaio cometa foram analisados pelo método visual, através da classificação de categorias de migração e obtenção de escores (Collins *et al.*, 1997, Miyamae *et al.*, 1998).

Inicialmente a solução de lise foi preparada e colocada sob refrigeração a 4°C. Em seguida a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) foi derretida em microondas e transferida para banho-maria a 37°C. Todo o procedimento do ensaio foi realizado sob luz amarela. Após estabilização da temperatura da agarose LMP 1µL de sangue total foi ressuspenso em 120µL de agarose LMP em um tubo tipo eppendorf. Com auxílio de micropipeta a mistura foi gentilmente homogenizada e colocada sobre lâmina de agarose NMP previamente preparada e uma lamínula (24 x 60 mm) sobreposta sobre a lâmina e a mistura. Após solidificação em geladeira por 5 minutos a lamínula foi retirada e as lâminas dispostas em uma cuba de coloração com a solução de lise a 4°C por onde permaneceu por no mínimo de 1h e um máximo de 24 horas. Terminado o período de lise celular foi preparada a solução tampão de eletroforese e submetida à refrigeração de 4°C. As lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas por 5 minutos com tampão fosfato (PBS) pH=6,8 a 4°C e dispostas na cuba de eletroforese. O tampão de eletroforese foi adicionado a cuba e as lâminas permaneceram por 20 minutos para descondensação do material nuclear. Após este período a fonte de eletroforese foi programada em 25V, 300mA e 20 minutos de acordo com padronização verificada em ensaios pilotos. Em seguida a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas da cuba e lavadas em solução de neutralização por 5 minutos e subsequentemente mergulhadas em etanol absoluto e colocadas para secagem à temperatura ambiente. O armazenamento foi feito em caixas para lâminas histológicas, em local seco, sem luminosidade, a temperatura ambiente até a coloração e análise. A coloração foi realizada utilizando brometo de etídio na concentração de 20µg/mL. Cada lâmina foi corada com 50µL da solução de brometo de etídio e recoberta por lamínula. A análise foi realizada imediatamente após a coloração, em microscópio óptico de fluorescência com aumento de 400X.

Foram analisadas 200 células/indivíduo utilizando modo visual por micrômetro ocular classificando a migração dos fragmentos do DNA em dano classe 0 (sem danos - $\leq 17,5\mu\text{m}$), classe 1 (baixo dano - $>17,5\mu\text{m}$ a $35\mu\text{m}$), classe 2 (médio dano - $>35\mu\text{m}$ a $52,5\mu\text{m}$), classe 3 (extenso dano com presença de cabeça - $\geq 70\mu\text{m}$) e classe 4 (extremo dano com ausência de cabeça - $\geq 70\mu\text{m}$). Os dados são apresentados pela frequência de células com e sem danos, escore e distribuição de classes. O escore foi calculado

multiplicando-se o número de núcleos encontrados em uma classe pelo número da classe. Para 200 células analisados o escore variou de 0 – 800 unidades arbitrárias.

Figura 6: Etapas do ensaio Cometa.

3.13 Análises em bile de peixes

3.13.1 Procedimento de lavagem do Blue rayon (Kummrow 2003 – Modificado) para extração em bile

A lavagem do Blue rayon para sua utilização nas amostras de bile foi executada segundo o protocolo desenvolvido por Kummrow e colaboradores (2003) com algumas modificações. Desde modo, o Blue rayon foi lavado com água ultrapura em becker por 5 minutos. Este procedimento foi repetido 4 vezes e o excesso de água removido com papel de filtro. O Blue rayon foi imerso em uma solução de metanol/amônio (50:1 v/v) e agitado por 1h (150 rpm). Este procedimento foi repetido duas vezes. O Blue rayon foi deixado sem agitação em solução de metanol/amônio por um período de 16 a 18 horas e em seguida lavado com metanol por 1 hora, agitando ocasionalmente. Após esta etapa, foram adicionados 15 minutos de ultrasson em modificação ao protocolo original. O metanol foi recolhido e levado à secagem completa em rotavapor com banho de aquecimento a 45°C sob vácuo. O resíduo obtido após evaporação foi ressuscitado em metanol puro e transferido para ampolas de kuderna. Um volume equivalente de Blue rayon foi transferido para um tubo de vidro e evaporado em nitrogênio gasoso. Após secagem em nitrogênio do volume equivalente, foi adicionado DMSO (Dimetilsulfóxido – Merck) para execução do ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microssoma, para verificação da eficiência do procedimento de lavagem. Apenas mechas com resultados negativos no teste foram utilizadas para a extração em bile.

3.13.2 Obtenção da bile e extração com Blue rayon (Mano *et al.*, 1995 – Modificado)

Para a obtenção da bile (Figura 7) as vesículas foram retiradas do freeze -70°C e lavadas individualmente com água ultrapura. Após lavagem da vesícula a bile foi extraída com auxílio de agulha estéril e o conteúdo biliar extravasado em um tubo do tipo eppendorf sendo quantificado o volume por vesícula de cada exemplar. Os conteúdos biliares foram transferidos para tubos de centrífuga para formação do “pool”. Deste “pool” foi retirado 1mL e este diluído 100X com água ultrapura para obtenção de um volume adequado para o processo de extração com Blue rayon. Após a diluição as amostras de bile foram esterilizadas através de filtro millipore 0,45-mm, e estocadas a

-20°C até o procedimento de extração com Blue rayon (Mano *et al.*, 1995 com modificações).

Figura 7: Procedimento de obtenção de bile.

Foi adicionada uma mecha de Blue rayon equivalente a 2mg/mL a solução diluída e esterilizada da amostra de bile. A mistura foi agitada em shaker por 30 minutos a temperatura ambiente. A mecha de Blue rayon foi removida e uma nova mecha foi adicionada e o procedimento repetido. O Blue rayon recuperado foi lavado com água ultrapura e os compostos mutagênicos eluídos com 1mL/mg de blue rayon com metanol/amônio (50:1 v/v) por agitação por 30 minutos (Kummrow *et al.*, 2003). O passo de eluição foi repetido (Figura 8). Os produtos das eluições foram reunidos e evaporados em rotavapor. Os extratos foram ressuspensos em metanol e armazenados em tubos de Kuderna para posterior secagem sob nitrogênio gasoso e dissolução em DMSO (dimetilsulfóxido – Merck) para o teste de mutagenicidade.

Figura 8: Extração por Blue Rayon em solução de bile de peixes.

3.14 Ensaio de Mutagenicidade

No ensaio de mutagenicidade são utilizadas linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina (his^-), engenheiras geneticamente para detectar mutações do tipo substituições de pares de bases do DNA ou deslocamento do quadro de leitura. A restauração da mutação e conseqüente retomada da capacidade de síntese do aminoácido é verificada pelo seu crescimento em meio de cultura mínimo sem histidina (Maron & Ames, 1983). As linhagens apresentam algumas mutações em vários pontos do operon da biossíntese de histidina, mutação *rfa* que promove perda parcial da barreira de polissacarídeos da parede bacteriana, que irá facilitar a penetração de moléculas maiores na célula. Também apresenta uma deleção de um dos genes do sistema de reparo por excisão (*uvrB*) e possui a presença de plasmídio que confere resistência a antibiótico para seleção e contém o gene *muc* envolvido no sistema de reparo SOS, que é passível de erro, tornando as linhagens mais sensíveis a mutações. O genótipo das linhagens utilizadas no estudo, bem como suas mutações preferenciais e seus respectivos controles positivos encontram-se na tabela 4. Usualmente o controle positivo utilizado YG1041 com ativação metabólica é o 2AA (2-

aminoantraceno) 0,625 µg/placa para as linhagens TA98 e TA100 e 0,003125µg/placa para a linhagem YG1041. Em nosso estudo os controles positivos foram substituídos pelo BaP 5µg/placa para as linhagens TA98 e TA100 e 12,5 µg/placa para a linhagem YG1041 para fazer uma melhor correlação com os metabólitos possivelmente extraídos da bile dos peixes.

Tabela 4: Genótipo das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no estudo, mutação preferencial e controles positivos.

Linhagem de <i>Salmonella</i>	Genótipo	Tipo de Mutação	Referência	Controles Positivos	
				-S9	+S9
TA98	<i>His</i> D3052, <i>rfa</i> , Δ bio, Δ uvrB, pKM101(resistência a ampicilina)	Deslocamento do quadro de leitura do DNA	Maron & Ames (1983)	4-NQO (0,125µg/placa)	BaP (5µg/placa)
TA100	<i>HisG46</i> , <i>rfa</i> , Δ bio, Δ uvrB, pKM101	Troca de par de bases do DNA	Maron & Ames (1983)	4-NQO (0,125µg/placa)	BaP (5µg/placa)
YG1041	<i>His</i> D3052, <i>rfa</i> , Δ bio, Δ uvrB, pKM101, pYG233 (resistência a Kanamicina) - Produção aumentada acetiltransferase e nitroreductase	Deslocamento do quadro de leitura do DNA	Hagiwara <i>et al.</i> , 1993	4-NOP (5µg/placa)	BaP (12,5µg/placa)

4-NQO: 4-nitroquinolina -1-óxido

BaP: Benzo(a)Pireno

4-NOP: 4-nitro-o-diamino-fenilina

Cada uma das características genéticas das linhagens foi verificada sistematicamente através de teste e preparo de placas-master (placas-mãe).

As placas-mãe foram preparadas a cada dois meses após verificação das características genéticas. Para tal, uma alíquota de cultura foi inoculada em 20mL de caldo nutriente e incubada sob agitação constante (150 a 170rpm) de 16 a 18 horas. Após crescimento a cultura é estriada em placa de ágar nutriente para isolar colônias. Cinco colônias isoladas são escolhidas aleatoriamente de cada linhagem a ser testada e inoculadas em 5mL de caldo nutriente cada uma e novamente incubadas sob agitação a 37°C, sendo realizadas após o período de incubação estrias grossas em placa de ágar mínimo suplementado com biotina, histidina e ampicilina, selando as placas com parafilme e mantendo-as sob refrigeração. As culturas também foram paralelamente inoculadas em placas de ágar nutriente para verificação da presença da mutação *rfa*, do plasmídeo e da deleção *uvrB*.

Para verificação da mutação *rfa*, foram colocados discos de papel de filtro de 5mm de diâmetro embebidos com 10µL de solução cristal violeta 1% no centro da placa

de ágar nutriente inoculada. Um halo de inibição de no mínimo 14 mm ao redor do disco, após incubação certifica a presença da mutação. A presença do plasmídeo foi verificada traçando linhas de solução de ampicilina 20mg/mL para as TAs e de solução de 20mg/mL de sulfato de kanamicina para as YGs, sobre placa de ágar nutriente. Após secagem do antibiótico as linhagens a serem testadas foram estriadas sobre as linhas. A ausência de crescimento das linhagens sobre as linhas de antibióticos após incubação indica a presença do plasmídeo.

A deleção *uvrB* foi testada cobrindo com papel alumínio ou cartolina metade de uma placa de ágar nutriente inoculadas com as linhagens. Essas placas foram irradiadas com lâmpada germicida (ultravioleta 245nm) de 15 watts a uma distância de 33 cm por 15 segundos. As linhagens mutantes crescem apenas na região da placa não irradiada (coberta).

Outra verificação de grande importância, é a taxa de reversão espontânea. Cada cultura foi avaliada inoculando-se 100µL em 2,5mL de ágar de superfície mantido em banho-seco a 45°C, e vertendo a mistura, após homogeneização em vortex, sobre uma placa de ágar mínimo. Todo o procedimento foi executado em duplicata. Após 48 horas de incubação a 37°C a contagem dos revertentes espontâneos foi realizada e verificada se a taxa apresentava-se dentro do esperado.

As diferentes linhagens de *Salmonella* apresentam sensibilidade a diferentes grupos de compostos químicos e podem auxiliar na identificação da classe de compostos genotóxicos presentes em amostras ambientais (Umbuzeiro *et al.*, 2004b).

O ensaio consiste na exposição de diferentes linhagens a amostra a ser avaliada na ausência ou presença de ativação metabólica *in vitro* (mistura S9). A S9 consiste de homogenato de células de fígado de rato tratado com AROCLOR 1254, empregado para a indução de enzimas do sistema citocromo P450, acrescida de cofatores (Kranendonk *et al.*, 2000; Mailling, 1971). A mutagenicidade da amostra é avaliada pela comparação do número de colônias obtidas no controle negativo (revertentes espontâneos), como o número de colônias obtidas após exposição a uma amostra (revertentes espontâneos e induzidos).

O ensaio de mutagenicidade foi conduzido de acordo com o método microsusensão (Figura 9) segundo o protocolo de Kado *et al.*, (1983). Volumes de 5µL de cada amostra foram adicionados em tudo de ensaio contendo 50µL de suspensão da linhagem (2×10^9 células) concentrada cinco vezes e 50µL de tampão fosfato 0,2M diluído 1:13 em ausência de S9 ou 50µL de S9 para o ensaio com ativação metabólica.

Neste trabalho utilizamos as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 e YG1041 com e sem ativação a partir das amostras de bile extraídas com Blue rayon. Devido à presença dos genes da O-acetiltransferase e da nitroredutase a linhagem YG1041 intensifica a metabolização de nitrocompostos elevando a resposta mutagênica em relação à parental TA98 (Hagiwara *et al.*, 1993, Umbuzeiro *et al.*, 2005). Todos os ensaios foram executados em duplicata. DMSO foi usado com solvente controle para determinação da frequência de revertentes espontâneos. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para verificação de diferença estatística entre o controle negativo e as doses aplicadas, seguida de regressão linear. Para as análises de variância e ajuste dos dados, utilizou-se o programa denominado SALANAL, elaborado por MYERS do Integrated Laboratory Systems, Carolina do Norte, EUA, e por ele também gentilmente cedido. A regressão linear foi avaliada utilizando uma variação do modelo linear, tipo Bernstein (Bernstein *et al.*, 1982), que consiste na retirada de uma ou mais doses da análise usando somente os resultados que representam a porção linear da curva dose resposta.

Figura 9: Etapas do ensaio de Mutagenicidade *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão (Kado *et al.*, 1983).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho baseou-se na utilização de diferentes biomarcadores de genotoxicidade em peixes, para monitoramento da qualidade ambiental do canal de Piaçaguera em comparação ao canal de Bertioga (região de referência). Para tal, foram realizadas coletas periódicas de peixes, em ambas as regiões, verificando o comportamento de diferentes biomarcadores durante o estudo de monitoramento. Os biomarcadores utilizados foram: detecção da perda de material genético através da presença de células sanguíneas micronucleadas, dano do tipo quebra de cadeia ao DNA, mutagenicidade em bile após extração com Blue Rayon e quantificação de metabólitos equivalentes de HPA em bile.

Também foram realizadas análises para obtenção de dados sobre a qualidade da água e do sedimento do canal de Piaçaguera uma vez que, somente havia dados recentes na literatura sobre a qualidade destas matrizes para o canal de Bertioga. Adicionalmente o gene *ras* da espécie *Mugil curema* foi seqüenciado após estabelecimento do protocolo de amplificação e mutações no referido gene foram analisadas. Tais mutações poderão ser utilizadas no futuro como biomarcador de efeito genotóxico.

Os resultados obtidos são apresentados a seguir. Um artigo científico foi elaborado e submetido para a revista Environmental Molecular Mutagenesis com os dados de mutagenicidade de bile após extração utilizando Blue rayon (Anexo III) e outro artigo encontra-se em preparação com os resultados do teste de micronúcleo e do ensaio cometa, o qual pretende-se submeter para a revista Mutation Research (Anexo IV).

Os dados brutos e as análises estatísticas foram apresentados nos Anexos V – IX.

4.1 Atualização de dados: Canal de Piaçaguera (Água e sedimentos)

Os resultados das análises químicas realizadas em nosso estudo, bem como os dados da literatura sobre a contaminação do canal de Piaçaguera e Bertioga estão apresentados na tabela 5. A presença de HPA foi analisada utilizando metodologias de acordo com a EPA (Environmental Protection Agency – USA) para as análises em água

e sedimento. Para o canal de Bertioga o método empregado foi o EPA8310 realizado pelo Laboratório de Química da CETESB. Apesar de metodologias diferentes, os valores obtidos encontram-se em ordens de grandeza dentro do esperado para as regiões. Nestas análises foram encontrados valores abaixo dos limites de detecção do método para todos os HPA analisados. No presente estudo, para avaliação de sedimentos do canal de Piaçaguera, foi utilizado o método EPA 8270C realizado em colaboração com o LBGqA da DQ/UFSCar (Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos). Foi observada uma grande variação entre as amostras coletadas no canal de Piaçaguera, apresentando valores de 10.000 a 140.000µg/kg de HPA totais incluindo mutagênicos (Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)Pireno, Indeno(123-cd)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Benzo(ghi)pirileno) e não-mutagênicos (Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno e Pireno). Observa-se uma grande variação da composição dos sedimentos, o que ressalta a importância de análises biológicas, como as realizadas neste trabalho, para complementar os dados obtidos na caracterização e monitoramento ambiental. O canal de Piaçaguera apresenta concentrações de metais (Cd, Cu, Hg, Ni e Zn) acima do TEL (do inglês, threshold effect level), que corresponde ao nível limiar de efeito adverso à comunidade biológica no qual ocasionalmente provoca efeito tóxico. As concentrações de mercúrio (Hg) também foram maiores ou igual ao PEL (do inglês, probable effect level), que representa nível provável de efeito adverso à comunidade biológica que frequentemente está associado a efeitos adversos (Environment Canada, 1999a, 1999b; CETESB, 2001). Nos sedimentos do canal de Bertioga, a concentração de metais (Al, Ag, B, Be, Ba, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Sn, Ti, Tl, V e Zn) foi determinada por espectrometria de emissão atômica óptica com plasma de argônio - ICP OES. Para a maioria dos metais analisados, os valores encontrados apresentaram-se abaixo do TEL. O arsênio (As) foi o único metal avaliado que apresentou valores acima do TEL, porém com base nos resultados obtidos para outros metais e ausência de fontes poluidoras no canal de Bertioga, as concentrações de arsênio são provavelmente de origem natural (Quinaglia, 2006). Os valores de mutagenicidade também são bastante diferentes sendo observados altos valores nas análises de água (7,1 rev/mg BR para a linhagem YG1041 +S9) e sedimento (720 rev/mg de sedimento para a linhagem TA100 + S9) no canal de Piaçaguera e baixos valores com apenas 1 rev/mg BR para a linhagem YG1041+S9 para amostras de água e 2 rev/mg de sedimento para a linhagem YG1041 -S9 para amostras

de sedimentos do canal de Bertioiga. Deste modo, de acordo com os baixos valores observados para o canal de Bertioiga em comparação ao canal de Piaçaguera para HPA, metais e mutagenicidade, consideramos sua utilização como região de referência em nosso estudo.

Tabela 5: Valores de mutagenicidade, HPA prioritários e metais no canal de Piaçaguera e de Bertioiga em amostras de água e sedimentos.

Matriz	Análises		Canal de Piaçaguera	Referência	Canal de Bertioiga	Referência
Água	Químicas	HPA	< LD ^a	Umbuzeiro <i>et al.</i> , 2006.	< LD ^{a,d}	Lamparelli <i>et al.</i> , 2007.
	Mutagenicidade	Blue rayon/Teste de Ames	36 rev/mg BR YG1041 +S9	Kummrow <i>et al.</i> , 2006.	1 rev/mg BR YG1041+S9	Lamparelli <i>et al.</i> , 2007.
			7,1 rev/mg BR YG1041 +S9	Presente Estudo.		
Sedimentos	Químicas	HPA total	109.200 - 733.700 µg/Kg ^b HPA total	Cetesb, 2001.	<TEL	Lamparelli <i>et al.</i> , 2007.
			10.432,04 - 141.217 µg/Kg ^b HPA total ^c	Presente Estudo.		
		Metais	Cd, Cu, Hg, Ni e Zn (> TEL)	Cetesb, 2001.	Al, Ag, B, Be, Ba, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Sn, Ti, Tl, V e Zn (<TEL). Exceto As.	Quinaglia, 2006.
			Cr e Zn (> PEL) Hg (< PEL)			
	Mutagenicidade	Teste de Ames	720 rev/mg de sedimento TA100 + S9	Roubicek, 2003.	2 rev/mg de sedimento YG1041 -S9	Lamparelli <i>et al.</i> , 2007.

^a Limite de Detecção

^b Valor máximo e mínimo encontrados no estudo.

^c HPA analisados (Método EPA 8270C): Naftaleno, Acenafileno, Acenafeno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Indeno(123-cd)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Benzo(ghi)pirileno.

^d HPA analisados (Método EPA 8310): Naftaleno, Acenafeno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Dibenzo(ah)antraceno, Benzo(ghi)perileno, Indeno(123-cd)pireno, 2-metilnaftaleno.

Al - alumínio, Ag - prata, B - boro, Be - berílio, Ba - bário, Cd - cádmio, Co - cobalto, Cu - cobre, Cr - cromo, Fe - ferro, Hg - mercúrio, Mn - manganês, Ni - níquel, Sn - estanho, Ti - titânio, Tl - tálio V - vanádio, Zn - zinco e As - arsênio.

TEL - (Threshold Effect Level) - Nível limiar de efeito adverso à comunidade biológica (ocasionalmente provoca efeito).

PEL - (Probable Effect Level) - Nível provável de efeito adverso à comunidade biológica (frequentemente associado a efeitos adversos).

4.2 Análises de danos genotóxicos em peixes

4.2.1 Teste de micronúcleo

Durante o monitoramento utilizando o teste de micronúcleo em sangue total na espécie *Mugil curema*, a presença de micronúcleos (Figura 10) nos peixes coletados no Canal de Piaçaguera, na maioria das campanhas, apresentou médias de porcentagens de micronúcleos maiores que as observadas para os peixes coletados no Canal de Bertioiga (Figura 11B-F). Apenas durante a amostragem de Fevereiro/2006 a diferença da frequência de micronúcleos entre as regiões de estudo não foi significativa (Figura 11A). A porcentagem mínima observada nos peixes coletados na região de referência (Canal de Bertioiga) foi de 0,23% na amostragem realizada no mês de Maio/2006 e a máxima foi de 0,53% no mês de Dezembro/2006. Para os peixes coletados no canal de

Piaçaguera, a porcentagem mínima de micronúcleos observada foi de 0,44% referente à amostragem de Julho/2007 e a máxima foi de 1,42% em Agosto/2006. A maior diferença encontrada entre as regiões de estudo foi de 6 vezes. Essa diferença foi evidenciada na amostragem realizada no mês de Maio/2006 quando os peixes da região de referência apresentaram uma porcentagem de micronúcleos de apenas 0,23% enquanto os coletados no Canal de Piaçaguera apresentaram uma porcentagem de micronúcleos de 1,21%. Na amostragem de Julho/2007 os valores observados foram bastante próximos dos valores das amostragens de Fev/2006 e Abril/2007 que apresentaram porcentagens de micronúcleos de 0,48 e 0,45% respectivamente. Estas amostragens apresentaram valores menores do que a para a amostragem de Dezembro/2006 feita em Bertioga (0,53%). O canal de Bertioga ainda apresenta valores considerados altos quando comparados a outras regiões consideradas de referência como apresentado na tabela 6, porém é um valor considerado baixo em comparação com regiões impactadas por diferentes tipos de contaminantes, levando em conta as variações inter-individuais e inter-espécies dos espécimes utilizados nos estudos. Ao analisarmos alguns trabalhos na literatura e os resultados obtidos para danos em peixes coletados em regiões consideradas de referência encontramos algumas dificuldades. Dentre estas dificuldades destaca-se a determinação de regiões que não apresentem nenhuma fonte de contaminação. Outra dificuldade é a comparação dos dados, visto que os trabalhos são realizados com espécies e em locais com características diferentes e os resultados muitas vezes são interpretados com valores e unidades discrepantes que impossibilitam uma padronização e comparação direta dos dados. De toda forma, verificamos através da tabela 7, organizada com dados de alguns trabalhos da literatura, que os peixes coletados no canal de Bertioga apresentam valores mais altos de micronúcleos do que é relatado para outras regiões consideradas de referência. O aumento relativo observado em nosso estudo, quando comparado a regiões contaminadas, encontra-se dentro do que é observado para outros estudos o que reforça que a porcentagem de micronúcleos encontrada foi suficiente para diferenciar as regiões de estudo. Estes dados nos levam a acreditar que o canal de Bertioga talvez não seja a melhor região a ser considerada como referência para danos genotóxicos em peixes, visto que estes apresentam sensibilidade a baixas concentrações de contaminantes (Buschini *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2004; Cavas e Ergene-Gözükara, 2005, Vanzella *et al.*, 2007). No estado de São Paulo não há registros de áreas protegidas e/ou sem

nenhum tipo de interferência de contaminação sendo necessários mais estudos e a investigação de outras regiões como referência.

Figura 10: Células micronucleadas de sangue total de peixes da espécie *Mugil curema* coletados no canal de Piaçaguera observada em microscopia óptica em imersão (1000X). Micronúcleos (MN) indicados pelas setas.

Figura 11 A-F: Resultados das análises estatísticas realizadas pelo Teste t para as porcentagens de Micronúcleos (%MN) em 4000 células/indivíduo no canal de Bertioga e de Piaçaguera. Dados estatisticamente significativos (desvio padrão , média $\oplus$, mediana — e valores máximo e mínimo |) calculado com Índice de Confiança (IC) de 95%.

Tabela 6: Comparação das percentagens de micronúcleo em diferentes espécies de peixes coletados em regiões de referência e em estudos de laboratório para diferentes controlos negativos.

Estudos	Regiões de Referência/Controlos Negativos	Espécies	Percentagem de Micronúcleos (%)	Referências
Regiões de referência	Lagoa de Armazen - Brasil	<i>Netuma sp</i>	0,012 ^b	Andrade <i>et al.</i> , 2004
		<i>Mugil sp</i>	0,015 ^b	
	Palanga - Klaipeda - Butinge Lituânia	<i>Platichthys flesus</i>	0,0015 ^b	Barsiene <i>et al.</i> , 2004
	Reserva natura de Astroni - Itália	<i>G. holbrooki</i>	0,02 ^a	Russo <i>et al.</i> , 2004
	Canal de Bertioiga - Brasil	<i>M. curema</i>	0,23 - 0,53 ^b	Presente Estudo
	Erdemli - Turquia	<i>Mugil cephalus</i>	0,082 - 0,207 ^b	Cavas & Gözükarar <i>et al.</i> , 2005a
		<i>P. nigricans</i>	0,01	
	Rio Solimões - Brasil	<i>M. duriventris</i>	0,006	Porto <i>et al.</i> , 2005
		<i>H. malabaricus</i>	0,009 - 0,013 ^b	
	Lagoa de Patos (estuário) - Brasil	<i>M. furnieri</i>	0,06	Amado <i>et al.</i> , 2006
		<i>B. boops</i>	0,07	
	Paraggi - Itália	<i>M. barbatus</i>	0,11	Bolognesi <i>et al.</i> , 2006a
		<i>U. scaber</i>	0,17	
		<i>B. boops</i>	0,075	Bolognesi <i>et al.</i> , 2006b
	Golfo de S. Tereza La Spezia - Itália	<i>D. labrax</i>	0,033	
		<i>M. barbatus</i>	0,013 ^b	Pantaleão <i>et al.</i> , 2006
	Rio Jacarecica - Brasil	<i>A. bimaculatus</i>	0,033 ^b	
		<i>H. malabaricus</i>		
Controlos de Laboratório	Água de torneira	<i>C. auratus gibelio</i>	0,094 - 0,124 ^c	Al-Sabati, 2000
	Água de torneira deionizada e reconstituída	<i>P. promelas</i>	0,058 - 0,10 ^c	Lemos <i>et al.</i> , 2001a
	Água	<i>H. fossilis</i>	0,035 - 0,037 ^c 0,036 ^c	Ahmad <i>et al.</i> , 2002
	Água de torneira	<i>C. barbatus</i>	0,38 - 0,63 ^c	Ateeq <i>et al.</i> , 2002
	Água de torneira desclorada	<i>T. rendalli</i>	0,01	Grisolia, 2002
	Água de lago não tratada	<i>C. carpio</i>	0,0012 - 0,002 ^c	Buschini <i>et al.</i> , 2004
	Água desclorada por 100 dias	<i>G. holbrooki</i>	0,04	Russo <i>et al.</i> , 2004
	Água de torneira desclorada	<i>O. niloticus</i>	0,142 - 0,172 ^c	Cavas & Gözükarar, 2005b
	Água de torneira deionizada e reconstituída	<i>P. promelas</i>	0,016 ^c	
	Água	<i>S. maximus</i>	0,1 ^a	Bolognesi <i>et al.</i> , 2006b
	Água subterrânea pura	<i>O. niloticus</i>	0,006	Hoshina <i>et al.</i> , 2008
	Água subterrânea pura	<i>O. niloticus</i>	0,0027 - 0,034 ^c	Souza <i>et al.</i> , 2006

^a Valores extraídos de representações gráficas

^b Valores observados em diferentes amostragens

^c Valores observados em diferentes tratamentos (concentrações)

O sexo dos indivíduos não foram considerados.

Tabela 7: Comparação do aumento relativo entre as percentagens de micronúcleos (%) para diferentes espécies de peixes, observadas em regiões consideradas de referência e regiões contaminadas.

Espécies	Percentagem de micronúcleo (%) para regiões de referência	Percentagem de micronúcleos (%) em regiões contaminadas	Aumento relativo	Referências
<i>Netuma sp</i>	0,012	0,045	3,75	Andrade <i>et al.</i> , 2004
<i>Mugil sp</i>	0,015	0,05	3,33	
<i>Mugil curema</i>	0,23	1,42	6,17	
<i>Platichthys flesus</i>	0,0015	0,134	89,3	Barsiene <i>et al.</i> , 2004
		0,145	96,6	
<i>Gambusia holbrooki</i>	0,02	0,1	5	Russo <i>et al.</i> , 2004
<i>Mugil cephalus</i>	0,082	0,36	4,4	Cavas & Gözükarar <i>et al.</i> , 2005a
		0,4	4,88	
	0,207	0,65	3,14	
		0,7	3,4	
<i>Prochilodus nigricans</i>	0,01	0,038	3,8	
<i>Mylossoma duriventris</i>	0,01	0,037	3,7	Porto <i>et al.</i> , 2005
<i>Hoplias malabaricus</i>	0,006	0,18	30	
<i>Micropogonias furnieri</i>	0,009	0,043	4,78	
<i>Mullus barbatus</i>	0,07	0,25	3,57	Bolognesi <i>et al.</i> , 2006b
		0,16	2,28	
<i>Astyanax bimaculatus</i>	0,013	0,065	5	Pantaleão <i>et al.</i> , 2006
		0,055	4,23	

Os eritrócitos em peixes são produzidos em diferentes órgãos (Soldatov, 1995, Tavares-Dias & Moraes, 2003) e existe uma grande variação entre as famílias de peixes quanto à atividade hematopoiética (Ishizeki *et al.*, 1984). O tempo de meia vida dos eritrócitos circulantes também apresentam grande diversificação, podendo variar de 51 dias para *Carassius auratus* (Fisher *et al.*, 1998), 150 dias em *Tinca vulgaris* (Hevesy *et al.*, 1964), 105 dias em *Oncorhynchus mykiss* e 310 dias em *Cyprinus carpio* (Soldatov, 1995). A frequência de micronúcleos é informativa de eventos que ocorreram em um tempo igual ao tempo de vida dos eritrócitos circulantes, sendo uma boa ferramenta para estudo de exposição crônica (Udroiu, 2006). A formação de micronúcleos é um evento relativamente raro e algumas espécies apresentam uma baixa frequência de micronúcleos espontânea. Logo, o número de células analisadas pode influenciar os resultados das análises, necessitando de leituras de um maior número de células para obtenção de resultados estatisticamente significativos (Udroiu, 2006). Para verificarmos

se o número de células analisadas no teste poderia ou não interferir no resultado final para a espécie *Mugil curema* nas regiões estudadas, leituras com 1000 e 4000 células/indivíduo foram realizadas. Em estudos ambientais o tempo das análises é um fator a ser considerado e poderia ser reduzido em até 75%, caso um número de 1000 células fossem suficientes para gerar dados confiáveis e representativos. Na figura 12, verificamos que em nenhuma das amostragens realizadas tanto para a região de referência (canal de Bertioga) quanto para o canal de Piaçaguera, não foram observadas diferenças nos resultados para as leituras com 1000 ou 4000 células/indivíduo para a espécie *Mugil curema*. O número mínimo de 1000 células/indivíduo analisados em nosso estudo, foi capaz de diferenciar as regiões de estudo com precisão. Aumentar o número de espécimes por campanhas de amostragem parece neste caso, ser mais relevante tendo em vista a grande variação que pode ocorrer entre indivíduos. Em nosso estudo, verificamos que os peixes coletados no canal de Piaçaguera apresentaram uma variação inter-individual de até 5 vezes. Para estes indivíduos a frequência de micronúcleos mínima em 4000 células foi de 0,35% e a máxima de 1,97% referente à amostragem de Junho/2006. No canal de Bertioga essa variação foi maior na amostragem realizada em Maio/2006 com indivíduos apresentando uma frequência de micronúcleos mínima de 0% (zero) e máxima de 0,55%. Em Fevereiro/2006, Junho/2006 e Dezembro/2006 a variação entre os indivíduos foi superior a 20 vezes, visto que as frequências de micronúcleos mínimas foram próximas de zero. A menor variação inter-individual, para o canal de Bertioga, de 2,5 e 3 vezes foi observada para as amostragens de Agosto/2006 e Outubro/2006 respectivamente. De acordo os dados obtidos para o teste de micronúcleo, esta metodologia mostrou-se eficiente no monitoramento por diferenciar as regiões de estudo.

Figura 12: Resultados da porcentagem de micronúcleos (%) para 1000 e 4000 células/indivíduo para o canal de Bertioga e Piaçaguera. Grupos com médias estatisticamente semelhantes para o teste T com $\alpha=5\%$.

4.2.2 Ensaio Cometa

O ensaio cometa tem sido utilizado em células animais coletados em diferentes regiões ao redor do mundo para avaliação ambiental (Andrade *et al.*, 2004, Russo *et al.*, 2004, Vanzella *et al.*, 2007, Frenzilli *et al.*, 2009). Durante o monitoramento utilizando o ensaio cometa, verificamos diferenças nas amostragens quanto à média dos escores de danos. Na amostragem de Fevereiro/2006 o canal de Bertioga apresentou a mais baixa média com 40,44 unidades arbitrárias (Figura 13 – A). A maior média observada na amostragem de Junho/2006 para o canal de Bertioga apresentou 228,75 unidades arbitrárias (Figura 13 - C), média esta que foi semelhante à menor média de escore observada para o canal de Piaçaguera na amostragem de Agosto/2006 com 228,93 unidades arbitrárias (Figura 13 – D). Em Maio/2006 Piaçaguera apresentou a maior média com 384,71 unidades arbitrárias (Figura 13 – B).

Estudos de genotoxicidade de longo prazo pode ser uma importante abordagem para obter maior conhecimento sobre o organismo e sua capacidade de reparo do DNA e outros mecanismos de proteção a produtos químicos tóxicos. No caso dos peixes, o uso de sangue total para avaliar danos ao DNA através do ensaio cometa (Belpaeme *et al.*, 1996, 1998; Mitchelmore e Chipman 1998; Pandrangi *et al.* 1995; Sumathi *et al.* 2001) mostra-se vantajoso devido à facilidade de coleta e de processamento do tecido sangüíneo. Estudos revisados por Frenzilli e colaboradores (2009), mostraram que o ensaio cometa apresenta uma maior sensibilidade na detecção de danos frente a outros biomarcadores comumente utilizados em estudos ecotoxicológicos como a troca de cromátides irmãs, por exemplo. Logo, a complementaridade com outros biomarcadores e possíveis correlações é de grande relevância para um diagnóstico adequado de uma região monitorada.

A diferença de danos observados ao longo do monitoramento realizado em nosso estudo pode ser resultado das diferenças nos níveis de exposição e toxicidade dos contaminantes presentes no ambiente que poderiam perturbar os processos enzimáticos envolvidos na formação das lesões do DNA (Rank e Jensen, 2003). A presença de HPA nos ambientes aquáticos tem sido discutida como a causa de efeitos genotóxicos detectados em peixes e/ou células de peixes pelo ensaio cometa (Kammann *et al.* 2001; Akcha *et al.* 2003). Estudos *in vivo* utilizando a espécie *Anguilla anguilla* foram realizados para investigar a susceptibilidade ao estresse oxidativo em condições de laboratório a diferentes contaminantes como Benzo(a)Pireno (BaP), beta-nafto flavona

(β -NF), Arochlor 1254 e 2,3,7,8-tetraclorodibenzo p-dioxina (TCDD). Quebras ao DNA só foram observadas quando os peixes foram expostos aos hidrocarbonetos não halogenados como o BaP e β -NF (Regoli *et al.*, 2003). Além disso, o processo de biotransformação dos HPA é freqüentemente associado com uma elevação intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), onde se destaca radicais hidroxilas que são altamente agressivos ao DNA. A alta prevalência de danos não reparados ao DNA pode induzir lesões que podem interferir nos processos celulares normais, na inibição do crescimento, no envelhecimento, no funcionamento do sistema imune etc (Woo *et al.* 2006), podendo afetar potencialmente o ecossistema (Kurelec, 1993).

A avaliação de biomarcadores utilizando peixes pode ser questionada devido à mobilidade dos peixes que poderia não permitir a obtenção com exatidão do tempo de exposição aos contaminantes em casos de eventos esporádicos como, por exemplo, um derramamento ou outro tipo de acidente ambiental. Por outro lado, devido à exposição crônica a uma mistura de contaminantes os organismos provavelmente desenvolvem mecanismos compensatórios podendo expressar um nível basal de danos como observados em nosso estudo e ser de grande utilidade no monitoramento e na percepção de alterações do ambiente para que medidas sejam realizadas de forma preventiva a respostas biológicas irreversíveis.

As diferenças entre as amostragens durante o monitoramento verificadas em ambos os ensaios (teste de micronúcleo e ensaio cometa), parece não estar relacionada a efeitos sazonais. Comparando-se os dados obtidos para os meses de Julho/2006 e Dezembro/2006 que correspondem respectivamente às estações de inverno e verão onde se registram as maiores variações de temperatura que por sua vez, poderiam interferir tanto nas propriedades físico químicas dos contaminantes como na fisiologia dos organismos (Udroiu, 2006), não mostraram correlação em nosso estudo. Para o teste de micronúcleo e para o ensaio cometa, os valores variaram de 0,90% a 1,0% na porcentagem de micronúcleos e de 320 a 380 unidades arbitrárias (escores de danos) para peixes coletados no canal de Piaçaguera nos meses de Julho/2006 e Dezembro/2006 respectivamente. Para a potência mutagênica os valores obtidos variaram de 8200 a 3900 rev/mg de BR para a linhagem YG1041 com S9. Apesar da diferença observada entre as potências mutagênicas nos meses de Julho/2006 e Dezembro/2006, estes valores são diferentes dos observados na literatura. Estudos indicam uma variação sazonal para danos ao DNA (quebras) em peixes, com aumento nas quebras durante o mês mais quente de amostragem (Buschini *et al.*, 2003 e 2004) e

Bolognesi *et al.* (2004) e Andrade *et al.* (2004) encontraram aumento nos danos de DNA durante o ano, com os valores mais baixos no inverno. Em nosso estudo o mês mais quente corresponderia à amostragem de Dezembro/2006 em que observamos uma redução na potência mutagênica com relação a Julho/2006 e não um aumento como descrito na literatura. As comparações, neste caso, devem ser realizadas com cautela visto que os dados da literatura são de estudos de peixes coletados em rios e para estuários comportamento pode ser diferenciado. Desde modo, as variações observadas em nossas amostragens podem estar associadas à provável entrada de contaminantes no ambiente de forma aleatória (ex.: acidentes ambientais), a intensificação de navegação e a processos de dragagem do canal ou por fatores endógenos dos organismos.

A utilização do ensaio cometa e o teste de micronúcleo em conjunto têm sido sugeridos por alguns autores visto que estes exibem uma capacidade diferenciada de detectar efeitos adversos ao material genético e os resultados observados poderiam ser complementares (Buschini *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2004; Vanzella *et al.*, 2007). Embora em nosso estudo ambos os testes tenham se mostrado sensíveis e possibilitado a diferenciação das regiões de estudo, evidenciando um maior nível de exposição para os peixes coletados no canal de Piaçaguera, estes não apresentaram uma correlação direta. Os picos de danos observados nos diferentes testes foram evidenciados em diferentes amostragens durante o monitoramento, nos levando a acreditar que diferentes compostos possam ser responsáveis pelos danos observados e foram detectados diferentemente pelo teste de micronúcleo e ensaio cometa. De toda forma, ambos os testes apresentaram sensibilidade adequada para o monitoramento ambiental como evidenciado em outros estudos utilizando peixes (Deguchi *et al.*, 2007, Russo *et al.*, 2004, Santos, 2003, Vanzella *et al.*, 2007, Andrade *et al.*, 2004) reforçando a viabilidade da utilização destes biomarcadores em estudos de monitoramento.

Figura 13 A-F: Resultados das análises estatísticas realizadas pelo teste t para os escores de danos (0 – 800) do ensaio cometa no canal de Bertioga e de Piaçaguera. Dados estatisticamente significativos (desvio padrão σ , média $\oplus$, mediana — e valores máximo e mínimo $|$) calculado com Índice de Confiança (IC) de 95%.

4.3 Teste de mutagenicidade em amostras de Bile extraídas por Blue rayon e análise de metabólitos equivalentes de HPA.

Estudos relatam que os HPA podem ser acumulados nos tecidos dos peixes (Hellou *et al.*, 2002; Hellou e Leonard, 2004), porém a biotransformação é rápida e a exposição dos peixes a HPA torna-se difícil de detectar por análise química dos tecidos ou de outros órgãos (van der Oost *et al.*, 1994; Aas *et al.*, 2000, Richardson *et al.* 2004). Relações causais entre a ocorrência de neoplasia e tumores de fígado de peixe e da concentração de HPA em sedimentos também tem sido apresentada na literatura (Varanasi, 1989; Hoffman, 2003; Ariese *et al.*, 2005). A técnica de cromatografia líquida de alta performance, método de fluorescência para detecção de metabólitos de HPA em bile de peixe na espécie *Mugil Liza* foi utilizada por Neves *et al.*, 2007 para avaliação da contaminação da baía de Guanabara, RJ-Brasil. Um dos problemas observados neste tipo de análise é a grande variação entre as amostras de bile de peixes. A fim de evitar essa variação, alguns pesquisadores têm tentado normalizar os dados utilizando a concentração de biliverdina e proteínas para indicação do status alimentar. Contudo, pesquisas demonstraram que esta estratégia não é bem sucedida (Ariese *et al.*, 1997; Aas *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2004) e não a adotamos em nosso estudo. Esta variação pode estar associada ao volume de bile, que tem sua concentração reduzida ou aumentada de acordo com a fase de alimentação (Richardson *et al.*, 2004). Durante a inanição, a vesícula recebe seu volume máximo e acomoda um influxo contínuo de bile fresca e a água é eliminada da vesícula resultando num efeito de concentração (Diamond, 1962). Para minimizar esses efeitos, em nosso trabalho, preparamos um pool de bile contendo um mínimo de 7 e um máximo de 15 vesículas de peixes correspondentes a cada amostragem.

A sensibilidade e a especificidade do teste de *Salmonella*/microsoma têm sido aumentadas utilizando técnicas de microsuspendição aliada ao desenvolvimento de novas linhagens bacterianas como a YG1041 e YG1042. Essas linhagens superexpressam nitroredutases e O-acetiltransferases apresentando maior sensibilidade que suas correspondentes TA98 e TA100 a nitroarenos e a aminas aromáticas. (Kado *et al.*, 1983; Hagiwara *et al.*, 1993).

Atividade mutagênica negativa ou muito baixa foi obtida para a linhagem TA98 com e sem ativação metabólica para os extratos de bile de peixes coletados no canal de

Bertioga. No canal de Piaçaguera, 4 das 6 amostras apresentaram atividade mutagênica positiva para a TA98 (Tabela 8). Um aumento da mutagenicidade foi observado para a linhagem YG1041 com e sem S9 em comparação com a TA98, indicando a presença de nitroaromaticos na bile. As amostras correspondentes aos peixes de ambas as regiões de estudo responderam de forma semelhante para a linhagem YG1041 sem S9, porém uma grande diferença foi evidenciada na presença de S9 (Tabela 8). No canal de Piaçaguera a atividade mutagênica foi elevada mostrando-se de 3 a 9 vezes superiores as observadas para a YG1041 com S9, quando comparadas com o canal de Bertioga, indicando que os peixes desta região estão mais expostos a compostos policíclicos mutagênicos (Tabela 8), corroborando com os dados observados para a água (Kummrow *et al.*, 2006b) e sedimentos (Umbuzeiro *et al.*, 2006) em estudos anteriores. Umbuzeiro *et al.* (2008) também mostrou que, em amostras do ar, as frações contendo o nitro e oxi-HPA foram mais mutagênica para a linhagem YG1041.

As respostas obtidas variaram ao longo do tempo, mas a maior variação foi observada no canal de Piaçaguera. O valor mais elevado (14.000 rev./mg BR) foi observado em Maio/2006. É interessante observar que esta amostra foi a mais mutagênica para todas as linhagens e condições testadas, indicando que os compostos mutagênicos estão relacionados à mesma fonte poluidora.

A mutagenicidade para a linhagem YG1041 com S9, observados para os peixes coletados no canal de Piaçaguera, foi de 1,7 a 4,5 vezes maiores em comparação a mutagenicidade em ausência de S9 (Tabela 8). Este aumento sugere a presença de compostos que exigem metabolização via S9 para ser ativado. Em Bertioga, nenhum aumento foi observado em presença S9. Viganò *et al.* (2002), também observaram maiores respostas mutagênicas na presença de S9 nas regiões mais contaminadas do rio Pó - Itália.

Para a linhagem TA100 com S9 observamos respostas semelhantes para os peixes de ambas as regiões estudadas, indicando que eles estão expostos a compostos que causam mutações por substituição de pares de bases e exigem metabolização para ser ativado como, por exemplo, benzo(a)pireno. Esta resposta não era esperada, tendo em vista que os peixes metabolizam eficientemente HPA e a resposta esperada seria a presença de atividade mutagênica sem S9 o que não foi o caso.

Tabela 8: Resultados do ensaio *Salmonella*/microsoma em microsusensão expressos em número de revertantes/mg de Blue rayon para o pool de amostras de bile analisadas de Fevereiro a Dezembro de 2006 utilizando as linhagens TA98, TA100 e YG1041.

Canal de Piaçaguera (Ponto 1)						
Amostragens	TA98		YG1041		TA100	
	sem S9	com S9	sem S9	com S9	sem S9	com S9
Feb/06	ND	360	5100	8700	ND	3100
Mai/06	ND	420	5900	14000	800	3400
Jun/06	ND	ND	ND	8300	ND	ND
Ago/06	ND	240	1700	7600	ND	1600
Out/06	ND	290	1900	7200	ND	1500
Dez/06	ND	ND	1100	3900	ND	1200

Canal de Bertioga (Ponto 2)						
Amostragens	TA98		YG1041		TA100	
	sem S9	com S9	sem S9	com S9	sem S9	com S9
Feb/06	ND	ND	990	2100	ND	1600
Mai/06	ND	ND	ND	1600	ND	1100
Jun/06	ND	ND	1700	2500	ND	1200
Ago/06	ND	ND	1800	1200	ND	790
Out/06	ND	ND	2000	2300	1400	1600
Dez/06	ND	ND	1600	ND	ND	ND

ND: Não detectado.

Os níveis de metabólitos equivalentes de benzo(a)pireno, naftaleno e fenantreno na bile bruta foram mais elevados nos peixes coletados no canal de Piaçaguera em comparação com o canal de Bertioga (Tabela 9). As quantidades dos metabólitos foram, em média, 4,2 (fenantreno), 2,3 (benzo(a)pireno) e 3,3 (naftaleno) vezes maior no canal de Piaçaguera. Porém não apresentaram correspondência com as respostas mutagênicas (Tabela 8). A amostra referente à amostragem de Maio/2006 não foi avaliada quanto ao nível de metabólitos HPA equivalentes.

Tabela 9: Metabólitos equivalentes de HPA em ng/g para as amostras dos pools de bile bruta analisadas para o canal de Piaçaguera e Bertioga.

Amostragens	Canal de Piaçaguera			Canal de Bertioga		
	Benzo(a)Pireno metabólitos equivalentes	Naftaleno metabólitos equivalentes	Fenantreno metabólitos equivalentes	Benzo(a)Pireno metabólitos equivalentes	Naftaleno metabólitos equivalentes	Fenantreno metabólitos equivalentes
Fevereiro/2006	7,9	920	130	0,98	210	18
Junho/2006	8,3	850	140	3,6	19	29
Agosto/2006	1,1	100	17	3,4	190	20
Outubro/2006	5,1	13	13	4,6	170	20
Dezembro/2006	5,1	760	96	0,85	190	15
Média (DP)	5,5 (2,88)	528,6 (435,76)	79,2 (60,84)	2,686 (1,68)	155,8 (77,77)	20,4 (5,22)

A quantidade de metabólitos de HPA na bile é um bom indicador de exposição recente (Lin *et al.*, 2001; Johnson-Restrepo *et al.*, 2008) e os seus níveis na bile são associadas às concentrações encontradas no sedimento (Yang e Baumann, 2006; Inzunza *et al.*, 2006). Meador *et al.* (1995) concluiu que a biodisponibilidade destes compostos é dependente do tempo de exposição, da concentração na água ou sedimentos e do conteúdo lipídico dos peixes. É esperado que os metabólitos de HPA na bile diminuam após redução da exposição (Brumley *et al.*, 1998).

Johnson-Restrepo *et al.* (2008) mostraram que a soma de metabólitos de HPA em peixes (*Mugil incilis*) coletados na Colômbia foi maior em locais contaminados, como na baía de Cartagena, Colômbia. Silva *et al.* (2006), estudando HPA em *Porichthys porosissimus*, *Prionotus nudigula* e *Cylichthys spinosus* no Canal de São Sebastião, São Paulo, Brasil obteve valores de 290 mg/g de NAF, 18 mg/g de FEN e 0,97 mg/g de BaP metabólitos equivalentes. A soma dos três metabólitos equivalentes foram 309 mg/g, portanto, duas vezes menor do que o quantificado na bile dos peixes coletados no canal de Piaçaguera, e duas vezes maior comparado com os valores quantificado para os peixes do canal de Bertioga. Esta comparação é muito interessante, mas deve ser interpretada com cautela, pois os peixes analisados não pertencem à mesma espécie e diferenças metabólicas e capacidades de excreção devem ser consideradas. No nosso estudo, a relação entre os três metabólitos equivalentes de HPA (BaP: NAF: FEN) foi de 1:10:100, similares aos obtidos por Silva *et al.* (2006) e Viganò *et al.* (2002).

Em áreas altamente contaminadas, tais como o canal de Piaçaguera, com múltiplas fontes de contaminantes, os peixes podem ser expostos a diferentes classes de compostos. Oxidação de HPA por enzimas CYP450 é o primeiro passo para a produção de espécies mutagênica. Nikoyan *et al.* (2007) utilizou várias combinações de linhagens de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de mistura S9 para avaliar a atividade mutagênica de alguns HPA, nitroarenos e aminas aromáticas em extratos de urina humana. Das combinações analisadas a linhagem YG1041 com S9 foi mais sensível para a detecção de aminas aromáticas.

Shailaja e Rodrigues (2003) mostraram que, em zonas altamente contaminadas por HPA, pode ocorrer um processo de adaptação, resultando na diminuição da produção de enzimas CYP e diminuição na produção de metabólitos. Shailaja *et al.* (2006) também demonstraram que o metabolismo de BaP aumenta quando os peixes são expostos a HPA e nitritos simultaneamente.

Para ambos os biomarcadores de exposição (mutagenicidade bile/BR e metabolitos equivalentes de HPA) analisados neste estudo, os peixes do canal de Piaçaguera demonstram ser mais expostos a compostos aromáticos policíclicos. Outros compostos presentes na água e/ou sedimentos parecem induzir o aumento da atividade mutagênica observada para a linhagem YG1041 em relação a TA98 visto que esta resposta não é esperada para HPA não substituídos como o BaP (Kummrow *et al.*, 2006b).

Nitroarenos na água e sedimentos poderiam ser responsáveis pela atividade mutagênica detectada na linhagem YG1041 com S9 encontrada na bile dos peixes analisados neste estudo devido a uma possível redução nos tecidos dos peixes a aminas aromáticas. Uma vez na bile, tais compostos poderiam ser adsorvidos pelas fibras de Blue rayon no processo de extração e, em seguida, oxidado pela mistura do homogenado de fígado de rato (fração S9) utilizada no ensaio de *Salmonella*/microsoma e posteriormente N-acetilada pelas linhagens bacterianas portadoras de O-acetil transferases. A menor mutagenicidade observada em ausência de S9 pode ser explicada pela acetilação direta de aminas aromáticas, como demonstrado por Kummrow *et al.* (2006b). Fracionamento dos extratos seguido por bioensaios, como de AED (Análises de efeito direto), de acordo com os procedimentos descritos por Brack (2003) poderia ajudar na identificação de compostos que estão presentes na bile dos peixes analisados neste estudo.

De fato, outros compostos podem estar promovendo, de forma direta, indireta ou em associação com inúmeros compostos, a mutagenicidade de regiões contaminadas por HPA. Lundstedt *et al.* (2007) demonstraram que os oxi-HPA são mais móveis que os HPA e apresenta uma elevada persistência devido a sua polaridade. Estes compostos, bem como os nitro-HPA, por exemplo, possuem grande relevância toxicológica. Compostos como os oxi-HPA têm sido identificados e extraídos de solos contaminados por HPA. A indução de proteínas envolvidas no processo de fosforilação e no ciclo celular de células HepG2, bem como a persistência de danos ao DNA foi atribuída a frações semi-polares contendo oxi-HPA. As variações observadas, ainda neste estudo, quanto à indução de diferentes proteínas para as diferentes frações, sugere que ocorre uma interação dos HPA, em especial com os oxi-HPA, visto que não foram observadas correlações para os resultados obtidos para o BaP sozinho e as frações contendo oxi-HPA mostraram maior potência de indução (Mattsson *et al.*, 2009). Estes compostos

também apresentam respostas positivas para o ensaio de *Salmonella*/microsoma (Lemieux *et al.*, 2008).

Sendo assim, o acompanhamento da mutagenicidade de bile de *Mugil curema* após extração com Blue rayon pode fornecer informações importantes sobre a qualidade ambiental de regiões com diferentes níveis de contaminação por HPA. A mutagenicidade de extratos de bile/BR de peixes mostra-se ser um promissor biomarcador para exposição a compostos policíclicos mutagênicos presentes no ambiente aquático e em conjunto com análises de determinados metabólitos equivalentes de HPA podem corroborar para uma avaliação ambiental mais abrangente bem como a avaliação mais criteriosa de compostos resultantes de sua biotransformação como os oxi-HPA, que podem ter suas concentrações aumentadas no meio ambiente em virtude da degradação dos HPA prioritários e contribuírem efetivamente para a toxicidade do ambiente. Os peixes coletados na região contaminada apresentaram aumentos na mutagenicidade, metabólitos equivalentes de HPA, frequência de micronúcleos e quebras no DNA em comparação com a região de referência. Embora os testes não tenham apresentado uma correlação positivas entre eles para as diferentes amostragens realizadas, todos mostraram boa sensibilidade, detectando que os peixes do canal de Piaçaguera estão mais expostos a compostos genotóxicos e mutagênicos que os peixes do canal de Bertioga.

4.4 Desenvolvimento do protocolo para amplificação dos genes p53 e ras em fígado de peixes da espécie *Mugil curema*.

Para o desenvolvimento de um protocolo para amplificação de genes relacionados ao processo carcinogênico em *Mugil curema* foram testadas diferentes metodologias para as diferentes etapas. Obtivemos eficiência na metodologia de extração em fígado adotada, resultando em boas concentrações de RNA com alta qualidade apresentando baixa contaminação por DNA genômico (Tabela 10). Foram realizados testes com várias combinações de “primers” e condições de PCR para obtenção da amplificação do gene *ras* e *p53*, o trabalho foi intenso e complicado visto que não há protocolo padronizado para amplificação desses genes para a espécie em estudo e que dispúnhamos de pouco tempo. Foram testados 12 pares de primers diferentes, bem como diferentes tempos e temperatura de anelamento dos primers, concentrações de MgCl₂ entre outras. Não obtivemos amplificação do gene *p53* em

nenhuma das amostras testadas para os peixes das duas regiões em estudo. Porém, obtivemos melhores resultados na amplificação do gene *ras* utilizando o programa de PCR com 35 ciclos com dois (2) minutos a 94°C para a desnaturação inicial seguido de quarenta e cinco (45) segundo de desnaturação durante o ciclo a mesma temperatura, cinquenta (50) segundos a 50°C para anelamento dos primers e extensão inicial de trinta (30) segundos a 72°C seguido da extensão final de cinco (5) minutos também a 72°C (Tabela 11) com a combinação de “primers” Ex1for/E2R (Tabela 12). O gene *ras* tem se mostrado um bom biomarcador por apresentar uma maior expressividade em peixes e por fazer parte da cascata de carcinogênese tal como o gene da proteína *p53*. Para realização do seqüenciamento as amostras foram concentradas (Tabela 13) em “speed vac” que consiste na retirada da água dos produtos de PCR por vácuo.

Analizamos as seqüências obtidas de diferentes espécimes coletados em regiões com alta contaminação por HPA e outros contaminantes comparadas com as obtidas de espécimes coletadas na região de referência. Os exemplares analisados não apresentaram diferenças nas seqüências nucleotídicas em nenhum dos casos avaliados, não apresentando polimorfismos ou mutações. Foram analisados apenas 10 indivíduos por região de estudo e devido à raridade do evento será requerido um maior número de espécimes para confirmação dos resultados obtidos quanto à presença ou ausência de mutações. As seqüências analisadas mantiveram homogenias para os peixes da espécie *Mugil curema* de ambas as regiões estudadas não apresentando mutações. A seqüência parcial do gene *ras* com 226pb (pares de bases) para a espécie *Mugil curema* foi publicada no GeneBank com número de acesso FJ232920 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/209573506>) conforme quadro abaixo (Figura 14). A seqüência encontrada para a espécie *Mugil curema* apresentou maiores homologias com as espécies *Platichthys flesus* e *Oryzias latipes* com 92% e com as espécies *Pleuronectes vetulus*, *Kryptolebias marmoratus* com 91%. O alinhamento da seqüência bem como seus “scores” é observado na figura 15. Estudos utilizando peixes coletados em regiões costeiras sob influência urbana e industrial tem observado a presença de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas (Mix, 1986; Harshbarger *et al.*, 1993) e diversos poluentes como HPA, PCBs (bifenilas policloradas) tem sido relacionados ao desenvolvimento de tumores em peixes (Malins *et al.*, 1985; Malins *et al.*, 1987; Varanasi *et al.*, 1987; Baumann *et al.*, 1995; Rotchell *et al.*, 2001). A presença de metabolitos de HPA em bile (Khran *Et al.*, 1986) também tem sido relacionada ao aumento de radicais livres e de diferentes modificações no DNA (Varanasi *et al.*, 1989;

Stein *et al.*, 1990; Vincent *et al.*, 1998; Vicent *et al.*, 1998; Malins *et al.*, 1990), sendo os HPA fortemente relacionados no processo de carcinogênese hepática de peixes.

A verificação da ativação do gene *ras* em peixes já tem sido utilizada em estudos ambientais (Rotchell *et al.*, 2001). A análise de possíveis mutações no gene *ras*, a partir da sequência determinada neste estudo, pode ser utilizada como biomarcador de efeito em indivíduos expostos a diversos contaminantes e auxiliar no diagnóstico ambiental.

Tabela 10: Resultado da extração e quantificação de RNA de fígado da espécie *Mugil curema*.

Local	Número da Amostra	Quantificação *(µg/µl)	Volume (µl) correspondente a 2.0µg de RNA	Verificação de Contaminação por DNA genômico
Canal de Bertioga	65	1700	1,176
	66	856	2,336	
	67	1200	1,66	
	68	1192	1,67	
	69	1104	1,81	
	70	2248	0,89	
	71	1196	1,67	
Canal de Piaçaguera	80	1300	1,538
	81	708	2,824	
	82	1700	1,176	
	83	3368	0,59
	84	2568	0,79	
	85	3812	0,52	
	86	2844	0,7	
	87	3780	0,53	

* Método Quant-it

Tabela 11: Resultado do teste do programa de PCR e do conjunto de primers para amplificação do gene *ras* para a espécie *Mugil curema*.

Primers	Resultados	Programa de PCR (35 ciclos)	Amplificação
28S for/28S rev	+	94°C - 2'
Ex1for/E2R	+	94°C - 45"	
Ex1for/E2R	+	50°C - 50"	
Ex1for/E2R2	-	72°C - 30"	
Ex1for/E2R	+	72°C - 5'	

Tabela 12: Sequências nucleotídicas dos primers utilizados para amplificação do gene *ras* em *Mugil curema*.

Primers	Sequência Nucleotídica
Ex1For	ATGACNGAATATAGCTGG
E2R	CCTGTCCTCATGTACTG

Tabela 13: Resultado da concentração das amostras para sequenciamento.

Kit Invitrogen	µl/amostra	Programa de PCR (35 ciclos)	Resultados
10X PCR Buffer minus Mg	5
MgCl ₂ 50 mM	3,5	94°C - 2'	
dNTP mix 10mM	3	94°C - 45"	
Taq DNA pol.	0,4	50°C - 50"	
Ex1for	2	72°C - 30"	
E2R	2	72°C - 5'	
cDNA	2,5		
H2O	31,6		

```

1 atgacggaat ataagctggt tgtggttagga gctggagggtg ttggcaagag
tgcacttact
61 attcagctca tccagaatca ctttgtggac gaatatgacc ccacaattga
ggactcctac
121 agaaagcagg tagttattga cggagagacg tgtctgttgg acatcctaga
cactgcaggt
181 caagaggagt acagcgccat gagggatcag tacatgagga caggac

```

Figura 14: Sequência parcial do gene *ras* da espécie *Mugil curema* depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank).

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score%
=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
1	Mugil	226	2	Mullet	477	91
1	Mugil	226	3	Platichthys	711	92
1	Mugil	226	4	Oryzias	692	92
1	Mugil	226	5	Pleuronectes	810	91
1	Mugil	226	6	Kryptolebias	570	91
1	Mugil	226	7	Mullus	236	89
1	Mugil	226	8	Oncorhynchus	236	88
1	Mugil	226	9	Cyprinus	1705	87
1	Mugil	226	10	K. marmoratus	881	86
1	Mugil	226	11	Xenopus	1752	84
1	Mugil	226	12	X. laevis	638	84
1	Mugil	226	13	Limanda	1175	48
1	Mugil	226	14	R. marmoratus	392	48
1	Mugil	226	15	Carassius	984	47
1	Mugil	226	16	O. mykiss	413	46
1	Mugil	226	17	Ictalurus	133	78
1	Mugil	226	19	Psetta	256	12
2	Mullet	477	3	Platichthys	711	92
2	Mullet	477	4	Oryzias	692	90
2	Mullet	477	5	Pleuronectes	810	92
2	Mullet	477	6	Kryptolebias	570	89
2	Mullet	477	7	Mullus	236	89
2	Mullet	477	8	Oncorhynchus	236	86
2	Mullet	477	9	Cyprinus	1705	86
2	Mullet	477	10	K	881	83
2	Mullet	477	11	Xenopus	1752	81
2	Mullet	477	12	X	638	80
2	Mullet	477	13	Limanda	1175	35
2	Mullet	477	14	R	392	43
2	Mullet	477	15	Carassius	984	64
2	Mullet	477	16	O	413	43
2	Mullet	477	17	Ictalurus	133	74
2	Mullet	477	18	C	258	8
2	Mullet	477	19	Psetta	256	82

Figura 15: Alinhamento e “Score” obtido pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

5. CONCLUSÕES

- A análise de danos genotóxicos da espécie *Mugil curema* utilizando o teste de micronúcleo e o ensaio cometa em sangue total mostrou-se sensível e viável para estudos de monitoramento ambiental sendo possível verificar que os peixes coletados no canal de Piaçaguera estão mais expostos a compostos mutagênicos em comparação com o canal de Bertioiga.
- O número de 1000 células/indivíduo no teste de micronúcleo para a espécie *Mugil curema* se mostrou suficiente para obtenção de resultados confiáveis contribuindo para a otimização de estudos ambientais.
- A combinação do ensaio de *Salmonella*/microsoma em extratos de bile de peixes por Blue rayon com a linhagem YG1041 sugere que a atividade mutagênica observada seja resultado da presença de nitroarenos no ambiente. Compostos resultantes da transformação dos HPA como os oxi-HPA também podem estar contribuindo efetivamente para a mutagenicidade observada na região de Piaçaguera.
- A mutagenicidade de extratos de bile/BR em peixes da espécie *Mugil curema* mostra-se um promissor biomarcador de exposição para compostos policíclicos mutagênicos presentes no ambiente aquático e em conjunto com análises complementares de determinação de metabólitos equivalentes de HPA podem corroborar para uma avaliação ambiental mais adequada.
- O protocolo de amplificação desenvolvido permitiu obter a sequência parcial do gene *ras* para a espécie *Mugil curema* que fornecerá subsídios para futuros estudos podendo ser utilizado como biomarcador de efeito na detecção de mutações do gene *ras* em peixes expostos a diversos contaminantes.

6. RECOMENDACÕES PARA FUTUROS ESTUDOS

- Realizar novas amostragens em outros locais mais protegidos para tentar estabelecer o nível basal de danos genotóxicos para a espécie *Mugil curema*.
- Realizar análises químicas dos extratos de Blue rayon para identificar os compostos ou classe de compostos causadores da alta atividade mutagênica observada no estudo.
- Utilizar um número maior de exemplares de peixes para verificar a incidência de mutação no gene *ras* para a espécie *Mugil curema* nas regiões de estudo.

7. REFERÊNCIAS

- Aas E, Beyer J, Goksøyr A. *PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence*. Mar Environ Res 46 (1-5):225-228. 1998.
- Ahmad W, Ali MN, Farah MA, Ateeq B. *Computerized automated morphometric assay including frequency estimation of pentachlorophenol induced nuclear anomalies (micronucleus) in catfish *Heteropneustes fossilis**. Chromosoma. 110(8):570-4. 2002
- Akcha F, Vincent Hubert F, Pfohl-Leszkowicz A. *Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds*. Mutat Res. 534(1-2):21-32. 2003
- Al-Sabti K. *Chlorotriazine reactive Azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish*. Ecotoxicol Environ Saf. 47(2):149-55. 2000.
- Al-Sabti K, Metcalfe CD. *Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water*. Mutat. Res. 343:121-135. 1995.
- Amado LL, da Rosa CE, Leite AM, Moraes L, Pires WV, Pinho GL, Martins CM, Robaldo RB, Nery LE, Monserrat JM, Bianchini A, Martinez PE, Geracitano LA. *Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects*. Mar Pollut Bull. 52(2):199-206. 2006.
- Ames B, Lee FD, Durston W. *An improved bacterial system for the detection and classification of mutagens and carcinogens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70:782-786. 1973.
- Andrade VM, Silva J, Silva FR, Heuser VD, Dias J.F, Yoneama ML, Freitas TR. *Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test*. Environ Mol Mutagen. 44(5):459-68. 2004.
- Ariese F, Beyer J, Wells D. *Two fish bile reference materials certified for PAH metabolites*. J Environ Monit. 7(9):869-76. 2005.
- Ariese F, Burges I, Oudhoff K, Rutten T, Stroomborg G, Vethaaj D. *Comparison of analytical approaches for PAH metabolites in fish bile samples for marine and*

- estuarine monitoring*. Vrije Universiteit, Institute for Environmental Studies, p.29. 1997.
- Ateeq B, Abul farah M, Niamat Ali M, Ahmad W. *Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish Clarias batrachus by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor*. Mutat Res. 518(2):135-44. 2002.
- Barsiene J, Lazutka J, Syvokiene J, Dedonyte V, Rybakovas A, Bagdonas E, Bjornstad A, Andersen OK. *Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas*. Environ Toxicol. 19(4):365-71. 2004.
- Baumann PC, Harshbarger JC. *Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after coking plant closes and environmental PAHs plummet*. Environ Health Perspect. 103(2):168-70. 1995.
- Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. *Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish*. Mutat Res. 415(3):167-84. 1998.
- Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsch-Volders M. *Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (Salmo trutta fario) using the micronucleus test and the alkaline comet assay*. Mutagenesis. 11(5):485-92. 1996.
- Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC. *An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test*. Mutat. Res. 97, 267-287. 1982.
- Bícego MC, Medeiros PM. *Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP-Brazil*. Marine Pollution Bulletin. 49:761-769. 2004.
- Bjelogrić NM, Mäkinen M, Stenbäck F, Vähäkangas K. *Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts and increased p53 protein in mouse skin*. Carcinogenesis. 15(4):771-4. 1994.
- Bodin N, Burgeot T, Stanisière JY, Bocquené G, Menard D, Minier C, Boutet I, Amat A, Cherel Y, Budzinski H. *Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel Mytilus galloprovincialis transplanted into the northwest Mediterranean Sea*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 138(4):411-27. 2004.
- Bolognesi C, Buschini A, Branchi E, Carboni P, Furlini M, Martino A, Monteverde M, Poli P, Rossi C. *Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for*

- genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants*. Sci Total Environ. 333(1-3):127-36. 2004.
- Bolognesi C, Perrone E, Roggieri P, Pampanin DM, Sciutto A. *Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions*. Aquat Toxicol. 1:S93-8. 2006.
- Bolognesi C, Perrone E, Roggieri P, Sciutto A. *Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study*. Mar Environ Res. 62 Suppl:S287-91. 2006.
- Bomd V, Haughton M, Blaydes J, Gire V, Wynford-Thomas D, Wylie F. *Evidence that transcriptional activation of p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence*. Oncogene. 13:2097-2104. 1996.
- Brack W. *Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures*. Anal Bioanal Chem 377:397-407. 2003.
- Brumley CM, Haritos VS, Ahokas JT, Holdway DA. *The effects of exposure duration and feeding status on fish bile metabolites: implications for biomonitoring*. Ecotoxicol Environ Saf 39:147-153. 1998.
- Brusseau ML, Pepper IL, Artiola JF. *Environmental Monitoring and Characterization*. Department of soil, water & Environmental Science. Elsevier. 410 pages. 2004.
- Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C. *Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of Dreissena polymorpha*. Mutat Res. 537(1):81-92. 2003.
- Buschini A, Martino A, Gustavino B, Monfrinotti M, Poli P, Rossi C, Santoro M, Dörr AJ, Rizzoni M. *Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of Cyprinus carpio specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization*. Mutat Res. 557(2):119-29. 2004.
- Buschini A, Martino A, Gustavino B, Monfrinotti M, Poli P, Rossi C, Santoro M, Dörr AJ, Rizzoni M. *Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of Cyprinus carpio specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization*. Mutat Res. 557(2):119-29. 2004.
- Campbell C, Quinn AG, Angus B, Farr PM, Rees JL. *Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation*. Cancer Res. 15:53(12):2697-9. 1993.

- Cavalcante DGSM, Martinez CBR, Sofia SH. *Genotoxic effects of Roundup® on the fish Prochilodus lineatus*. Mutat Res 655:41–46. 2008.
- Cavas T, Ergene-Gözükara S. *Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment*. Environ Mol Mutagen. 46(1):64-70. 2005a.
- Cavas T, Ergene-Gözükara S. *Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in Oreochromis niloticus following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents*. Aquat Toxicol. 74(3):264-71. 2005b.
- Cavas T, Garanko NN, Arkhipchuk VV. *Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate*. Food and Chemical Toxicology. 43:569-574. 2005.
- Cavas T, Ergene-Gözükara S. *Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining*. Environmental Toxicology and Pharmacology 19:107-111 .2005.
- CETESB. *Avaliação Preliminar da contaminação por metais pesados na água, sedimentos e organismos aquáticos do rio Cubatão (SP)*. Relatório Técnico CETESB. 28 p. 1989.
- CETESB. *Contaminantes na Bacia do rio Cubatão e seus Reflexos na Biota Aquática*. Relatório Técnico CETESB. 81p. mais anexos e mapas. 1990.
- CETESB. *Metais pesados na Baía de Santos e Estuários de Santos e São Vicente*. Relatório Técnico CETESB. 231 p. 1981.
- CETESB. *Poluição das Águas no Estuário e Baía de Santos*. Relatório Técnico CETESB. Volume I. 71p. 1979.
- CETESB. *Sistema Estuarino de Santos e São Vicente*. Relatório Técnico CETESB. www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua_geral.asp/2001.
- Chen G, White PA. *The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review*. Mutat. Res. 567:151-225. 2004.
- Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska H, Petrovska S, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N. *Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications*. Environ. Mol. Mutagen. 30:139-146.1997.
- Da Silva J, De Freitas TR, Heuser V, Marinho JR, Erdtmann B. *Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent Ctenomys torquatus by Comet*

- assay and micronucleus test*. Environ Mol Mutagen. 35(4):270-8. 2000.
- Da Silva Souza T, Fontanetti CS. *Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent*. Mutat Res. 605(1-2):87-93. 2006.
- Dailianis S, Domouhtsidou GP, Raftopoulou E, Kaloyianni M, Dimitriadis VK. *Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of Mytilus galloprovincialis (L.), in pollution monitoring*. Mar. Environ. Res. 56:443–470. 2003.
- Deguchi Y, Toyozumi T, Masuda S, Yasuhara A, Mohri S, Yamada M, Inoue Y, Kinai N. *Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish*. Mutat Res. 627(2):178-85. 2007.
- DI Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. *DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts*. Genes Dev. 1:8(21):2540-51. 1995.
- Diamond JM. *The reabsorptive function of the gall-bladder*. J. Physiol. 161:442-473. 1962.
- Dixon DR, Pruski AM, Dixon LRJ, Jha AN. *Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview*. Mutagenesis 17:495–507. 2002.
- ENVIRONMET CANADA. *Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Summary tables*. <http://www.ec.gc.ca>. 1999a.
- ENVIRONMET CANADA. *Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Summary tables*. <http://www.ec.gc.ca>. 1999b.
- Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA. *The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (Mugil cephalus) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary, Portugal*. Mar Environ Res 61:326-338. 2006.
- Fischer U, Ototake M, Nakanishi T. *Life span of circulating blood cells in gibelio crucian carp (Carassius auratus langsdorffii)*. Fish & Shellfish Immunol. 8:339-349. 1998.
- Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP. *The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments*. Mutat Res. 681(1):80-92. 2009.

- Frenzilli G, Scarcelli V, Del Barga I, Nigro M, Förlin L, Bolognesi C, Sturve J. *DNA damage in eelpout (Zoarces viviparus) from Göteborg harbour*. Mutat Res. 552(1-2):187-95. 2004.
- Fritsche M, Haessler C, Brandner G. *Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents*. Oncogene. 8(2):307-18. 1993. Erratum in: Oncogene. 8(9):2605. 1993.
- Gontijo AMMC. *Teste do Cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas*, Mutagênese Ambiental, (Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. eds). Editora da Ulbra, Canoas, pp.247-279. 2003.
- Grisolia CK, Cordeiro CMT. *Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish*. Genet. Mol. Biol. 23:253–259. 2000.
- Grisolia CK. *A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides*. Mutat Res. 518(2):145-50. 2002.
- Guttman SI. *Population genetic structure and ecotoxicology*. Environ. Health Perspect. 102 (Suppl.12). pp 97-100. 1994.
- Hagiwara Y, Watanabe M, Oda Y, Sofuni T, Nohmi T. *Specificity and sensitivity of Salmonella typhimurium YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity*. Mutat Res 291:171-180. 1993.
- Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. *High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin*. Oncogene. 8(1):203-7. 1993.
- Harshbarger JC, Spero PM, Wolcott NM. *Neoplasms in wild fish from the marine ecosystem emphasizing environmental interactions*, in: Couch JA, Fournie JW (Eds), *pathobiology of Marine and Estuarine Organisms*. CRC Press. New York. 157-176. 1993.
- Hartwell LH, Kastan MB. *Cell cycle control and cancer*. Science. Review.16:266(5192):1821-8. 1994.
- Hayatsu H, Toshiko H, Arimoto S, Sakamoto H. *A short-column technique for concentrating mutagens/carcinogens having polycyclic structures*. Anal. Biochem, Orlando, 235:185-190. 1996.

- Hayatsu H. *Cellulose bearing covalently linked copper phtalocyanine trisulphonate as an adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens*. J Chromatogr 597:37-56. 1992.
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys PH, Macgregor JT. *Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future*. Environ Mol Mutagen 18:277-291. 1991.
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, Macgregor JT, Newell GW, Salamone MF. *The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. U.S. Environmental Protection Agency Report. Gene-Tox Program. Mutat. Res.* 123:61-118. 1983.
- Hellou J, Leonard J, Anstey C. *Dietary exposure of finfish to aromatic contaminants and tissue distribution*. Arch Environ Contam Toxicol. 42(4):470-6. 2002.
- Hellou J, Leonard J. *Polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation and biotransformation products in trout exposed through food pellets*. Polycyclic Aromatic Compounds. 24:697-712. 2004.
- Hess R, Plaumann B, Lutum AS, Haessler C, Heinz B, Fritsche M, Brandner G. *Nuclear accumulation of p53 in response to treatment with DNA-damaging agents*. Toxicol Lett. 72(1-3):43-52. 1994.
- Hevesy G, Lockner D, Sletten K. *Iron metabolism and erythrocyte formation in fish*. Acta Physiol. Scand. 60:256-266. 1964.
- Hoffaman DJ. Handbook of Ecotoxicology. CRC Press, Boca Raton, Florida. 2003.
- Hoshina MM, de Franceschi de Angelis D, Marin-Morales MA. *Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (Oreochromis niloticus) by a petroleum refinery effluent*. Mutat Res. 656(1-2):44-8. 2008.
- Inzunza B, Orrego R, Peñalosa M, Gavilán JF, Barrsa R. *Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in Oncorhynchus mykiss exposed to Biobío River sediments, Central Chile*. Ecotoxicol Environ Saf 65:242-251. 2006.
- Ishizeki K, Nawa t, Tachibana T, Sakakura Y, Lida S. *Hematopoietic sites and development of eosinophil granulocytes in the loach, Misgurnus anguillicaudatus*. Cell Tissue Res. 235:419-426. 1984.
- Jha AN, Cheung VV, Foulkes ME, Hill HJ, Depledge MH. *Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach*

- using the larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutat. Res.* 464:213–228. 2000.
- Jha AN. *Ecotoxicological applications and significance of the comet assay*. *Mutagenesis*. 23(3):207-21. Review. 2008.
- Johnscher-Fornasaro G. & Zagatto PA. *Utilização da comunidade bentônica como indicador da qualidade de rios da região de Cubatão*. Anais do 13º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental N 105.8p. 1985.
- Jonhson-Restrepo B, Olivero-Verbel J, Lu S, Guette-Frenández J, Baldiris-Avila R, O'Byrne-Hoyos I, Aldous KM, Addink R, Kannan K. *Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia*. *Environ Pollut* 151:452-459. 2008.
- Kado NY, Langley D, Eisenstadt E. *A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay*. *Mut. Res.* 121:25-32.1983.
- Kalpaxis DL, Theos C, Xaplanteri MA, Dinos GP, Catsiki AV, Leotsinidis M. *Biomonitoring of gulf of Patras, Peloponnesus N, Greece. Application of a biomarker suite including evaluation of translation efficiency in Mytilus galloprovincialis cells*. *Environ. Res.* 94:211-220. 2004.
- Kamb A. *Cell-cycle regulators and cancer*. *Trends Genet.* Review. 11(4):136-40. 1995.
- Kammann U, Bunke M, Steinhart H, Theobald N. *A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay*. *Mutat Res.* 498(1-2):67-77. 2001.
- Kastan M.B, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. *Participation of p53 protein in cellular response to DNA damage*. *Cancer Res.*, **51**, 6304–6311. 1991.
- Kataoka H, Hayatsu T, Hietsch G, Steinkellner H, Nishioka S, Narimatsu S, Knasmüller S, Hayatsu H. *Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AalphaC) in the water of the Danube river*. *Mutat Res.* 466(1):27-35. 2000.
- Kennish MJ. *Practical handbook of Estuarine and Marine Pollution*. CRC Press. Boca Raton. 524p. 1997.
- Kilemade M, Hartl MG, Sheehan D, Mothersill C, van Pelt FN, O'Brien NM, O'Halloran J. *An assessment of the pollutant status of surficial sediment in Cork Harbour in the South East of Ireland with particular reference to polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Mar Pollut Bull.* 49(11-12):1084-96. 2004.

- Kira S, Taketa K, Nogami Y, Hayatsu H. *A simple technique for monitoring mutagenicity and benzo(a)pyrene contents in mussels and their ambient water.* Environ. Toxicol. Water Qual. 167-172.1995.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. *The comet assay: mechanisms and technical considerations.* Mutat Res. 12;363 (2):89-96. 1996.
- Krahn MM, Kittle Jr, L.J, Macleod Jr, W.D. *Evidence for exposure of fish to oil spilled into the Columbia River.* Mar. Environ. Res. 20:291-298. 1986.
- Krahn MM, Myers MS, Burrows DG, Malins DC. *Determination of metabolites of xenobiotics in bile of fish from polluted waterways.* Xenobiotica 14:633-646. 1984.
- Kranendonk M, Laires A, Rueff J, Estabrook RW, Vermeulen NPE. *Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity test bacteria: an update and practical considerations.* Crit. Rev. Toxicol, Clevenland, 30:287-306.2000.
- Kranendonk M, Laires A, Rueff J, Estabrook WR, Vermeulen NP. *Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity tester bacteria: an update and practical considerations.* Crit Rev Toxicol. 30(3):287-306. Review. 2000.
- Kummrow F, Magalhães D, Franco A, Umbuzeiro Gde A. *Blue rayon and Salmonella/microsome assay in the evaluation of coastal water quality* (Article in Portuguese) Rev Saúde Pública. 40 (5):890-7. 2006a.
- Kummrow F, Rech CM, Coimbrão CA, Roubicek DA, Umbuzeiro GA. *Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and Blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples.* Mutat Res 541:103-113. 2003.
- Kummrow F, Rech CM, Coimbrão CA, Umbuzeiro GA. *Blue rayon-anchored technique/Salmonella microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary.* Mutat Res. 10:609(1):60-7.2006b.
- Kurelec B. *The genotoxic disease syndrome.* Mar. Environ. Res. 35:341–348. 1993.
- Kusamran WR, Wakabayashi K, Oguri A, Tepsuwan A, Nagao M, Sugimura T. *Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters.* Mutat Res. 325(2-3):99-104. 1994.

- Lamparelli MC; Quinágua GA; Oliveira E; Tominaga MY; PE Santos, Rech CM, Umbuzeiro GA, Sato MIZ, Bevilacqua JE. *Bertioga as a possible reference region for studies in the Baixada Santista for carcinogenic metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity*. Brazilian Journal of Toxicology. ISSN 14415-2983. 20: 1.2007.
- Lemieux CL, Lambert IB, Lundstedt S, Tysklind M, White PA. *Mutagenic hazards of complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in contaminated soil*. Environ Toxicol Chem. 27(4):978-90. 2008.
- Lemos CT, Iranço Fde A, Oliveira NC, Souza GD, Fachel JM. *Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of Astyanax jacuhiensis (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence*. Sci Total Environ. 406(1-2):337-43. 2008.
- Lemos CT, Milan RP, Regina TN, Cristina D'Avila ON, Erdtmann B. *River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes*. Ecotoxicol Environ Saf. 66(3):391-401. 2006.
- Lemos CT, Rödel PM, Terra NR, Erdtmann B. *Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes*. Environ Toxicol Chem. 20(6):1320-4. 2001.
- Lemos CT, Rodel PM, Terra NR, Erdtmann B. *Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalente chromium effects in fish erythrocytes*. Environmental Toxicology and Chemistry. 20(6): 1320-1324. 2000.
- Lin ELC, Neiheisel TW, Flotemersch J, Subramanian B, Williams DE, Millward MR, Cormier SM. *Historical monitoring of biomarkers of PAH exposure of brown bullhead in the remediated Black River and the Cuyahoga River, Ohio*. J Great Lakes Res. 27:191–198. 2001.
- Liu, D, Aoyama I, Okamura H, Dutka BJ. *Enhancement of toxicant release from sediment by sonication and sodium ligninsulfonate*. Environ. Toxicol. And Water Quality. 11:195-203. 1996.
- Livingstone DR. *Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment*. J.Chem. Tech. Biotechnol. 57:195–211. 1993.
- Livingstone DR. *Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates*. Adv. Comp. Environ. Physiol. 7:45–185. 1991.

- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. *p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents*. Cell. 24:74(6):957-67. 1993.
- Lundstedt S, White PA, Lemieux CL, Lynes KD, Lambert IB, Oberg L, Haglund P, Tysklind M. *Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites*. Ambio. 36(6): 475-85. 2007.
- Lyons BP, Stewart C, Kirby M.F. *32P-postlabelling analysis of DNA adducts and EROD induction as biomarkers of genotoxin exposure in dab (Limanda limanda) from British coastal waters*. Mar. Environ. Res. 50:575–579. 2000.
- Mailling HV. *Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes*. Mutat. Res. Amsterdam. 12: 425-429. 1971.
- Malins DC, Krahn MM, Myers MS, Rhodes LD, Brown DW, Krone CA, McCain BB, Chan SL. *Toxic chemicals in sediments and biota from a creosote-polluted harbor: relationships with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (Parophrys vetulus)*. Carcinogenesis. (10):1463-9. 1985.
- Malins DC, McCain BB, Myers MS, Brown DW, Krahn MM, Roubal WT, Schiewe MH, Landahl JT, Chan SL. *Field and laboratory studies of the etiology of liver neoplasms in marine fish from Puget Sound*. Environ Health Perspect. Review. 71:5-16. 1987.
- Malins DC, Ostrander GK, Haimanot R, Williams P. *A novel DNA lesion in neoplastic livers of feral fish: 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine*. Carcinogenesis. 11(6):1045-7. 1990.
- Mano H, Yamamoto M, Kinebuchi H, Araki K, Ohta T. *Geographical variations in mutagenicity of blue rayon extracts of Japanese human bile*. Mutat Res. 341(3):225-34. 1995.
- Mar Pollut Bull. 52(2):199-206. 2006.
- Maron DN, Ames BN. *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. Mutat. Res. 113, 173-215. 1983.
- Marvin CH, McCarry BE, Villella J, Allan LM, Bryant DW. *Chemical and biological profiles of sediments as indicators of sources of genotoxic contamination in Hamilton Harbour. Part I: analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and thia-arene compounds*. Chemosphere. 41(7):979-88. 2000.

- Matsumoto FE, Cólus IMS. *Micronucleus frequencies in Astyanax bimaculatus (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate*. Genet. Mol. Biol. 23:489–492. 2000.
- Mattsson A, Lundstedt S, Stenius U. *Exposure of HepG2 cells to low levels of PAH-containing extracts from contaminated soils results in unpredictable genotoxic stress responses*. Environ and Mol Mutagen. 50:337-348. 2009.
- Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U. *A review of bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms*. Rev Environ Contam Toxicol 143:79–165. 1995.
- Medeiros PM, Bícigo MC. *Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbons inputs in sediment using geochemical markers. Part I. Santos, SP-Brazil*. Mar. Pollut. Bull. 49 (11) 761-769.2004.
- Mitchelmore LL, Chipman JK. *Detection of DNA strand breaks in brown trout (Salmo trutta) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay*. Aquat. Toxicol. 41: 161–182. 1998.
- Mix MC. *Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical literature review*. Mar. Environ. Res. 20:1-171.1986.
- Miyamae Y, Yamamoto M, Sasaki YF, Kobayashi H, Igarashi Soga M, Shimol K, Hayashi M. *Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by nve laboratories*. Mutat. Res. 418:131-140. 1998.
- Mortelmans K, Zeiger E. *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. Mutat Res. 20:455(1-2):29-60. 2000.
- Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W, Grosse F. *p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity*. Cell. 28:85(7):1089-99. 1996.
- Murad A, Houston AH. *Maturation of the goldfish (Carassius auratus) erythrocyte*. Comp. Biochem. Physiol. 102A:107-110. 1992.
- Mure K, Takeshita T, Takeuchi T, Morimoto K. *Urinary Mutagens and Lifestyle Factors*. Preventive Medicine 25: 569–574. 1996.
- Myers MS, Landahl JT, Krahn MM, McCain BB. *Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast*. Environ Health Perspect. 90:7-15. Review. 1991.

- Neves RLS, Oliveira TF, Ziolli RL. *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish bile (Mugil liza) as biomarkers for environmental monitoring in oil contaminated areas*. Mar Pollut Bull 54: 1813-1838. 2007.
- Nikoyan A, De Méo M, Sari-Minodier I, Chaspoul F, Gallice P, Botta A. *Evaluation of a battery of Salmonella typhimurium tester strains for biomonitoring of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons, nitroarenes and aromatic amines*. Mutat Res. 626(1-2):88-101. 2007.
- Nipper M. *Current approaches and future directions for contaminant-related impact assessments in coastal environments: Brazilian perspective*. Aquatic Ecosystem Health & Management. 3:433-447. 2000.
- Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*. Exp Cell Res. 211(1):90-8. 1994.
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. *Mutagens in surface waters: a review*. Mutat. Res. 567:109-149.2004.
- Oliveira IR, Soares LSH. *Alimentação da tainha Mugil platanus Günther, 1880 (pisces: Mugilidae), da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil*. B Inst. Pesca 23:95-104. 1996.
- Ostling O & Johanson K. *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochem. Biophys. Res. Com., 123:1,291-298. 1984.
- Otsu R, Horikawa K, Min BY. *Mutagenicity of river water in Korea*. Bull Environ Contam Toxicol. 60(4):615-9. 1998.
- Pandrangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M. *Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp*. Environ Mol Mutagen. 26(4):345-56. 1995.
- Pantaleão Sde M, Alcântara AV, Alves Jdo P, Spanó MA. *The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil*. Environ Mol Mutagen. 47(3):219-24. 2006.
- Pelroy RA, Stewart DL, Tominaga Y, Iwao M, Castle RN, Lee ML. *Microbial mutagenicity of 3- and 4-ring polycyclic aromatic sulfur heterocycles*. Mutat Res. 117(1-2):31-40. 1983.

- Porto JI, Araujo CS, Feldberg E. *Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species*. Environ Res. 97(3):287-92. 2005.
- Quinaglia, G. A. *Caracterização dos Níveis Basais de Metais no Sistema Estuarino da Baixada Santista*. Tese de doutorado. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 2006.
- Rank J, Jensen K. *Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis**. Ecotoxicol Environ Saf. 54(3):323-9. 2003.
- Regoli F. *Total; oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress*. Aquat. Toxicol. 50:351-361. 2000.
- Regoli F. *Total; oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress*. Aquat. Toxicol. 50:351-361.2000.
- Richardson DM, Gubbins MJ, Davies IM, Moffat CF, Pillard OM. *Effects of feeding status on biliary PAH metabolite and biliverdin concentrations in plaice (*Pleuronectes platessa*)*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 17:79-85.2004.
- Rotchell JM, Lee JS, Chipman JK, Ostrander GK. *Structure, expression and activation of fish ras genes*. Aquat Toxicol. 55(1-2):1-21. Review. 2001.
- Roubicek DA, Umbuzeiros GA. *Teste de mutagenicidade – Ensaio Salmonella/microsoma (Teste de Ames) em Microsuspensão*. Cap 4. Parte III: *Avaliação Ecotoxicológica da Qualidade de Sedimentos de Ecossistemas Aquáticos. Projeto Qualised. Métodos de Coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce*. São Carlos: Cubo Multimídia. Pp 173-181. 2006.
- Roubicek DA. *Estratégias para avaliação da genotoxicidade de sedimentos*. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 1-125. 2003.
- Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. *Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments*. Ecotoxicol Environ Saf. 57(2):168-74.2004.

- Sakai T, Niwaguchi T, Kimura R, Murata T. *Distribution and excretion of methamphetamine and its metabolites in rats. III. Time-course of concentrations in blood and bile, and distribution after intravenous administration.* Xenobiotica. 15(1):31-40. 1985.
- Sakamoto H, Hayatsu H. *A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo river system, Kyoto-Osaka.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. New York, 44:521-528. 1990.
- Salvatori DMF, Ribeiro LR, Fenech M. *Teste do micronúcleo em células humanas in vitro.* Mutagênese Ambiental. 201-223. (Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. eds). Editora da Ulbra, Canoas, pp.201-233. 2003.
- Santos PE, Umbuzeiro GA. *Comparação preliminar dos níveis de danos genotóxicos em peixes coletados na Bacia de Evolução do Canal de Piaçaguera e no Canal de Bertioga – SP utilizando o ensaio cometa.* In: IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, São Pedro. Anais do IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. São Paulo: Vida e Consciência. 156-156. 2006a.
- Santos PE, Umbuzeiro GA. *Ocorrência de Micronúcleos em eritrócitos de Parati Mugil sp (Mugilidae, Perciformes) coletados na Bacia de Evolução do Canal de Piaçaguera e no Canal de Bertioga - SP.* In: I International Congress of Fish Genetics and XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics, São Carlos - SP. 2006b.
- Santos PE. *Análise da genotoxicidade das águas superficiais do rio Potengi Natal/RN.* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil. 2004.
- Sayato Y, Nakamuro K, Ueno H, Goto R. *Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in mutagenic adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water.* Mutat Res. 300(3-4):207-13. 1993.
- Shailaja MS, Rajamanickam R, Wahidulla S. *Formation of genotoxic Nitro-PAH compounds in fish exposed to ambient nitrite and PAH.* Toxicol Sci 91 (2):440-447. 2006.
- Shailaja MS, Rodrigues A. *Nitrite-induced enhancement of toxicity of phenanthrene in fish and its implications for coastal waters.* Estuar Coast Shelf Sci 56:1107–1110. 2003.
- Sharma S, Nagpure NS, Kumar R, Pandey S, Srivastava SK, Singh PJ, Mathur PK. *Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish*

- Mystus vittatus* using the comet assay. Arch Environ Contam Toxicol. 53(4):617-23. 2007.
- Silva DAM, Buzitis J, Krahn MM, Bicego MC, Pires-Vanin AMS. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. Mar Pollut Bull 52:175-183. 2006.
- Singh NP, Stephens RE. Microgel eletrophoresis: sensitivity, mechanisms and DNA eletrostretching. Mutat. Res. 383:167-175. 1997.
- Skog K. Blue cotton, Blue Rayon and Blue Chitin in the analysis of heterocyclic aromatic amines—a review. Journal of Chromatography B, 802:39–44. 2004.
- Soldatov AA. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. J. Evol. Biochem. Physiol. 41:272-281. 1995.
- Stegeman JJ, Lech JJ. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. Environ. Health Perspect. 90:93–100. 1991.
- Stein JE, Reichert WL, Nishimoto M, Varanasi U. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound; evidence for a xenobiotic chemical etiology. II: Biochemical studies. Sci Total Environ. 94(1-2):51-69. 1990.
- Sullivan C, Mitchelmore CL, Hale RC, Van Veld PA. Induction of CYP1A and DNA damage in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to biosolids. Sci Total Environ. 384(1-3):221-8. 2007.
- Sumathi M, Kalaiselvi K, Palanivel M, Rajaguru P. Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay. Bull Environ Contam Toxicol. 66(3):407-14. 2001.
- Tavares-Dias M, Moraes FR. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (*Osteichthyes: Cichlidae*) capturada em “Pesque-Pague” de Franca, São Paulo, Brasil. Bioscience J. 19(1):103-110. 2003.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen. 35(3):206-21. 2000.
- Tommasi LR. Considerações ecológicas sobre o sistema estuarino de Santos (SP). Tese

- de Livre-Docência. USP, Inst. Oceanográfico. 2V. 489p. 1979.
- Torres MA, Barros MP, Campos SC, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT, Colepicolo P. *Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review*. Ecotoxicol Environ Saf. 71(1):1-15. Review. 2008
- Udroiu I. *The micronucleus test in piscine erythrocytes*. Aquat Toxicol. 79(2):201-4. Review. 2006.
- Umbuzeiro GA, Franco A, Martins MH, Kummrow F, Carvalho L, Schmeiser HH, Leykauf J, Stiborova M, Claxton LD. *Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil*. Mutat Res. 652(1):72-80. 2008.
- Umbuzeiro GA, Freeman H, Warren SH, Kummrow F, Claxton LD. *Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay*. Food Chem. Toxicol. Oxford 43:49-56. 2005.
- Umbuzeiro GA, Kummrow F, Roubicek DA, Tominaga MY. *Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges*. Environ Int 32:359-364. 2006.
- Umbuzeiro GA, Roubicek DA, Stoppe NC, Rodrigues PF, Rech CM, Coimbra CA, Sato MIZ. *Caracterização de amostras de sedimento hídrico do estuário de Santos utilizando análises de toxicidade aguda e genotoxicidade e quantificação de bactérias dos ciclos biogeoquímicos*. Mundo Saúde 28 (4) 436-442. 2004.
- Uno S, Koyama J, Kokushi E, Monteclaro H, Santander S, Cheikyula JO, Miki S, Añasco N, Pahila IG, Taberna HS Jr, Matsuoka T. *Monitoring of PAHs and alkylated PAHs in aquatic organisms after 1 month from the Solar I oil spill off the coast of Guimaras Island, Philippines*. Environ Monit Assess. [Epub ahead of print] 2009.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. Environ Toxicol Pharmacol 13:57-149. 2003.
- Vanzella TP, Martinez CB, Cólus IM. *Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species*. Mutat Res. 631(1):36-43. 2007.
- Varanasi U, Reichert WL, LE Eberhart B, Stein J. *Formation and persistence of benzo(a)pyrene diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (Parophrys*

- vetulus*). Chem. Biol. Inter. 69:203-216. 1989.
- Varanasi U, Stein JE, Nishimoto M. *Biotransformation and disposition of PAH in aquatic environment. In: Varanasi U. (ed.). Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environmental.* CRC Press, Florida, 93-150. 1989.
- Varanasi, U., Brown, D.W., Chan, S.-L., Landahl, J.T., McCain, B.B., Myers, M.S., Schiewe, M.H., Stein, J.E. and Weber, D.D. *Etiology of tumors in bottom-dwelling marine fish: A final report submitted to the National Cancer Institute.* Available from Environmental Conservation Division, Northwest Fisheries Science Center, NMFS/NOAA, 2725 Montlake Blvd. E., Seattle, Wa 98112.p250. 1987.
- Vethaak AD, Wester PW. Diseases of flounder *Platichthys flesus* in Dutch coastal and estuarine waters, with particular reference to environmental stress factors. II. Liver histopathology. Aquat Org. 26:99–116. 1996.
- Viganò L, Camoirano A, Izzotti A, D'Agostini F, Polesello S, Francisci C, De Flora S. *Mutagenicity of sediments along the Pó River and genotoxicity biomarker in fish from polluted areas.* Mutat Res 515:125-134. 2002.
- Vincent F, de Boer J, Pfohl-Leszkowicz A, Cherrel Y, Galgani F. *Two cases of ras mutation associated with liver hyperplasia in dragonets (Callionymus lyra) exposed to polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons.* Mol Carcinog. 21(2):121-7. 1998.
- Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, Taffe BG, *et al.* *p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity.* Nat Genet. 10(2):188-95. 1995.
- Woo S, Kim S, Yum S, Yim UH, Lee TK. *Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (Paralichthys olivaceus) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons.* Mar Pollut Bull. 52(12):1768-75. 2006.
- Yang X, Baumann PC. *Biliary PAH metabolites and the hepatossomático index of brown bullheads from Lake Erie tributaries.* Ecol Indicators 6:567-574. 2006.
- Yoxall V, Wilson J, Ioannides C. *An improved method for the extraction of mutagens from human urine and cooked meat using Blue rayon.* Mutat Res 599:121-130. 2004.

- Zhan Q, Carrier F, Fornace AJ JR. *Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest*. Mol Cell Biol. 13(7):4242-50. 1993. Erratum in: Mol Cell Biol 13(9):5928. 1993.
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. *Sunburn and p53 in the onset of skin cancer*. Nature. 22-29; 372(6508):773-6. 1994.

8. ANEXOS

ANEXO I: Autorização do IBAMA nº 02027.002996/2005-38.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS - DIFAP

E-mail: romulo.mello@ibama.gov.br

SCEN Av. L-4 - Ed. Sede do IBAMA - Bloco "B" - Subsolo - CEP: 70818-900 - Brasília-DF - C. Postal 09870.

Fone: (61) 3316-1650/3316-1669/3316-1668 - Fax: (61) 3316-1200

DESTINATÁRIO: Gisela de Aragão Umbuzeiro - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB - Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 – CEP 05459-900 – São Paulo/SP - TELEFONE/FAX: (11) 3030-6000 / (11) 3030-6402.

FAX: 070 /2006

REFERÊNCIA: Processo IBAMA/MMA Nº 02027.002996/2005-38

ASSUNTO: Comunica a assinatura da Autorização nº 063 – DIFAP/IBAMA, de 26 de maio de 2006.

DATA: 29/maio/2006.

MENSAGEM/TEXT

Senhora Gerente,

Comunicamos a assinatura da Autorização nº 063 – DIFAP/IBAMA, de 26 de maio de 2006, para essa Companhia coletar e transportar material biológico, visando à execução do Projeto de Pesquisa: "Biomarcadores de Genotoxicidade em peixes (*in situ*) na Avaliação da Qualidade de Águas Estuarinas e Marinhas".

Informamos, na oportunidade, que estamos providenciando a remessa de via original da referida Autorização, por meio da Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos.

Atenciosamente.

Romulo José Fernandes Barreto Mello
Diretor

C.c. ao Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste/Sul – **CEPSUL/IBAMA** e à Superintendência do IBAMA no Estado de São Paulo – **SUPES/SP**.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA
DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS - DIFAP
 COORDENAÇÃO GERAL DE GESTÃO DE RECURSOS PESQUEIROS - CGREP
 COORDENAÇÃO DE ESTUDOS E PESQUISAS PESQUEIRAS - COPES
AUTORIZAÇÃO PARA COLETA/TRANSPORTE DE PEIXES E INVERTEBRADOS AQUÁTICOS

NÚMERO DA AUTORIZAÇÃO 063/2006 – DIFAP/IBAMA	VALIDADE 02 (dois) anos e 06 (seis) meses a partir da data da assinatura.	PROCESSO IBAMA 02027.002996/2005-38
OBJETO: ☒ COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO ☒ TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO ☐ TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS ☐ EXPOSIÇÃO DE RECURSOS PESQUEIROS ☐ MANUTENÇÃO DE ANIMAIS EM CATIVEIRO ☐ OUTROS:		FAVORECIDO: ☒ INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA ☐ EXPOSITOR ☐ CRIADOURO COMERCIAL ☐ CRIADOURO CIENTÍFICO ☐ OUTROS:

RESPONSÁVEL PELA COLETA/TRANSPORTE/EXPOSIÇÃO: Gisela de Aragão Umbuzeiro.

EQUIPE DE COLETA/TRANSPORTE/EXPOSIÇÃO: Gisela de Aragão Umbuzeiro, Patrícia Esteves dos Santos, Marta Condé Lamparelli e Carlos Alberto Coimbra.

INSTITUIÇÃO: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB.

ENDEREÇO: Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 – CEP 05459-900 – São Paulo/SP.

TELEFONE/FAX: (11) 3030-6000 / (11) 3030-6402.

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: "Biomarcadores de Genotoxicidade em peixes (*in situ*) na Avaliação da Qualidade de Águas Estuarinas e Marinhas".

PETRECHOS DE COLETA: Rede de espera e/ou tarrafa com malha de 07 cm.

PROCEDÊNCIA/LOCAL DA COLETA: Estuário de Santos e São Vicente e área marinha adjacente, litoral sul do estado de São Paulo.

DESTINO DO MATERIAL: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB e Universidade de São Paulo – USP.

MATERIAL BIOLÓGICO A SER COLETADO:

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	QUANTIDADE
bagre	<i>Cathrops spixii</i>	150
tilápia	<i>Oreochromis sp</i>	150
tainha / parati	<i>Mugil spp</i>	150
robalo	<i>Centropomus spp</i>	150
acará	<i>Geophagus brasiliensis</i>	150
enxada	<i>Chaetodipterus faber</i>	150
bagre	<i>Netuma barba</i>	150
corvina	<i>Micropogonias furnieri</i>	150

OBSERVAÇÕES E CONDICIONANTES:

- O cultivo de espécies em águas de domínio público da União, com finalidade científica ou não, é regulamentado pela Instrução Normativa Interministerial Nº 06, de 31 de Maio de 2004. E, portanto, para exercer tais atividades, se faz necessário solicitar, junto à Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca – SEAP/PR, autorização para a execução do projeto.
- Esta Autorização não exime o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória Nº 2186-16/01, que trata sobre o acesso ao patrimônio genético, e Decretos nº 3.945/2001 e nº 4.946/2003.
- Esta Autorização não exime o pesquisador estrangeiro de cumprir a legislação pertinente expedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, que regulamenta a participação de estrangeiro em pesquisa científica.
- A Instituição, representada pelos pesquisadores ora autorizados, deverá apresentar relatório final à Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros - DIFAP/IBAMA e relatórios semestrais e final às seguintes Unidades do IBAMA:
☒ Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste/Sul – CEPESUL; e
☒ Superintendência do IBAMA no Estado de São Paulo – SUPES/SP.

LOCAL E DATA DE ASSINATURA:

Brasília (DF), 26 de maio de 2006.

AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA):

Rômulo José Fernandes Barreto Mello
 Diretor/DIFAP

ESTA AUTORIZAÇÃO NÃO PERMITE:

- COLETA DE RECURSOS PESQUEIROS EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO DO PROPRIETÁRIO, ARRENDATÁRIO, POSSEIRO OU MORADOR DA ÁREA;
- COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES DE RECURSOS PESQUEIROS EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE;
- EXPORTAÇÃO DE MATERIAL ZOLÓGICO OU REMESSA (PARA O EXTERIOR) DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO.

AUTORIZAÇÃO DIFAP/IBAMA: 1ª VIA (INTERESSADO) E 2ª VIA (PROCESSO/IBAMA)

ANEXO II: Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA/FCF-USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA/FCF/52 /2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **“Biomarcadores de Genotoxicidade em peixes (in situ) na avaliação da qualidade de águas estuarinas e marinhas”** (Protocolo nº 78), de responsabilidade da pesquisadora **Patrícia Estevam dos Santos** sob a orientação da Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, 1º de agosto de 2005.

São Paulo, 17 de junho de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

ANEXO III: Mutagenicity of Blue rayon extracts of fish bile as a biomarker in a field study.

Mutagenicity of Blue rayon extracts of fish bile as a biomarker in a field study

Patrícia Estevam dos Santos, ¹ Fábio Kummrow, ² Ana Cecília Rizzatti de Albergaria-Barbosa, ³ Márcia Caruso Bicego, ³ Gisela de Aragão Umbuzeiro^{1,4 *}

¹ *Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, 05508-900 São Paulo, Brazil*

² *Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal Alfenas - UNIFAL, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000 Alfenas - MG*

³ *Laboratório de Química Orgânica Marinha - Instituto Oceanográfico - Universidade São Paulo, 05508-120, São Paulo, Brazil*

⁴ *Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP –Rua Paschoal Marmo, 188, 13484-332 Limeira, SP, Brazil*

* Corresponding author: Gisela de Aragão Umbuzeiro

Tel/Fax: +55-19-21133347 E-mail: giselau@usp.br or giselau@ceset.unicamp.br

Abstract

Blue rayon (BR) in combination with the *Salmonella/microsome* assay was used to evaluate the mutagenicity of fish bile samples. Specimens of *Mugil curema* from two sites were collected during one year period. Piaçaguera Channel, presents high concentrations of total PAHs and other contaminants, and Bertioga Channel, considered in this study as a reference site. The bile was extracted with BR and tested with TA98, TA100, and YG1041 strains with and without S9 in dose response experiments. The PAH metabolites equivalents were analyzed using a reverse-phase HPLC/fluorescence. Higher mutagenic responses were observed for the contaminated site and YG1041 with S9 were the most sensitive strain/condition. At the contaminated site mutagenicity ranged from 3,900 to 14,000 rev./mg and the reference sited from 1,200 to 2,500 rev./mg of BR. The responses of YG1041 were much higher in comparison to the TA98 indicating the presence of polycyclic compounds from the class of the aromatic amines that cause frameshift mutation. TA100 with S9 also showed positive responses, especially with S9, suggesting the presence of polycyclic compounds that cause base pair substitution and require rat liver S9 to be activated. Metabolites equivalents of benzo(a)pyrene, naphthalene, phenanthrene were also higher in the bile of fishes collected at the contaminated site. It was not possible to correlate the PAHs metabolites quantities with the mutagenic potency. The combination of the *Salmonella/microsome* assay with YG1041 with S9 and BR extraction of bile seems to be an adequate biomarker to monitor the exposure of fishes to mutagenic polycyclic compounds.

Key words: bile mutagenicity; fish bile; Blue rayon; PAH metabolites; *Salmonella/microsome* assay, biomarker.

Introduction

Coastal areas, particularly docklands and harbors are typical locations where sediment-associated pollutants accumulate due to anthropogenic activities [Vilela et al., 2004]. Marine ports are major hubs of economic activity and environmental pollution in coastal urban areas [Bailey and Solomon, 2004]. In Brazil the port of Santos, located in the Piaçaguera Channel is one of these examples. It is the major and most important port of the country.

Several studies showed that the sediment of some areas of this channel presented high levels of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) along with other toxicants [Nishigima et al., 2001; CETESB, 2001; Medeiros and Bícigo, 2004; Bícigo et al., 2006; Umbuzeiro et al., 2006; Cesar et al., 2007; Martins et al., 2007]. Mutagenic activity was also detected at high levels in the sediment of the most contaminated site [Roubicek, 2003] and water [Kummrow et al., 2006a,b]. Bertioga Channel, located in the same region, is not a pristine area but the contaminants are present in much lower amounts [Hortellani et al., 2008] when compared to Piaçaguera Channel. The sediment and water presented low levels of metals [Quinaglia, 2006], PAHs and mutagenic activity [Lamparelli et al., 2007]. In Piaçaguera channel PAHs are the contaminants of major concern. The PAHs as well as their transformation products can be transferred from the aquatic environment to fish and other marine biota through the body surface, gills, particle intake, and diet [Silva et al., 2006; Fragoso et al., 2006; Hylland, 2006; Vuorinen et al., 2006]. PAHs biotransformation can occur in several aquatic organisms but in fish it is more effective [Van der Oost et al., 2003]. Some studies show that PAHs can accumulate in fish tissues, but because of their rapid biotransformation PAHs are hard to find in fish tissues even in highly polluted sites [Varanasi et al., 1989; Neves et al., 2007].

PAHs metabolites produced in the fish liver are secreted into the bile, concentrated and stored in the gallbladder before excretion [Aas et al., 1998; Ferreira et al., 2006; Neves et al., 2007]. The gallbladder bile is a major excretion route for PAHs in fish [Aas et al., 1998]. Analysis of PAH metabolites in fish bile have been used as a PAHs exposure biomarker and can be determined as global fluorescent aromatic compounds equivalents (FACs) [Budzinski et al., 2004; Silva et al., 2006]. These measurements are limited to the compounds analyzed and may not reflect the total exposure to polycyclic aromatic compounds, especially to the substituted PAHs such as nitro and oxy PAHs.

Blue rayon is a selective adsorbent for polycyclic compounds with three or more fused rings in the molecular structure [Hayatsu, 1992] and has been efficiently used for the extraction of mutagenic polycyclic aromatic compounds present in the aquatic environment [Kira et al., 1994; Kira et al., 1998; Ohe et al., 2004; Kummrow et al., 2006a,b], biological samples such as human bile [Mano et al., 1995; Mano et al., 1996] and urine [Yoxall et al., 2004]. If combined with mutagenicity tests such as the *Salmonella*/microsome assay can provide indirect estimation of the total amount of mutagenic polycyclic compounds that the organism is exposed.

Fishes from the Mugilidae family has been widely used in estuary field studies. They are commonly found along the coast of several countries of South America and Europe [Ferreira et al., 2006; Neves et al., 2007; Johnson-Restrepo et al., 2008]. They are euryhaline, inhabit inshore marine waters and estuaries. Their feeding behavior includes ingesting benthic invertebrates, microorganisms, detritus [Oliveira and Soares, 1996].

The objective of this study was to verify if the levels of mutagenic activity of Blue rayon bile extracts could be used as a biomarker of exposure to polycyclic

compounds. PAHs metabolites were also measured in the same bile samples for comparison with the levels of mutagenicity.

Material and methods

Sampling sites and fish collection

Two sites were selected for the fish catchment (Figure 1). Piaçaguera Channel (23° 52693' S and 46° 22625' W) is located in the in the Santos Estuary. It is a highly contaminated area. The major Latin American port is located in this estuary and the largest industrial park of Brazil, installed in the 50s, producing steel mill, fertilizers and chemicals. The port has heavy ship traffic and dredging activates are frequently required for the harbor maintenance.

FIGURE 1

Bertioga Channel (23° 53875' S and 46° 11667' W) is a leisure area, with small boat traffic and receives mainly domestic discharge. No dredging activity is required. Although this site is impacted with some domestic sewage input it does not receive industrial discharges, presents low levels of contaminants as already stated therefore can be considered a reference site in comparison to the Piaçaguera Channel.

Six fish samplings were performed during 2006 in the months of February, May, June, August, October and December. Specimens of *Mugil curema* (Parati) were captured in both collection sites using a drag net and transported to the laboratory on ice for gallbladder removal. A total of seventy one specimens were captured ($27.17 \text{ cm} \pm 0.53$ and $215.35\text{g} \pm 11.57$) at Piaçaguera and seventy nine specimens ($28.21 \text{ cm} \pm 2.15$

and $205.16 \text{ g} \pm 9.13$) at Bertioga. The gallbladders were stored at -70°C until extraction with Blue rayon or the direct injection in the high-performance liquid chromatography.

Blue rayon washing and blank testing

Blue rayon fibers were washed as described by Kummrow et al. [2003] with the following modifications: after the overnight step, the Blue rayon fibers were ultrasonicated for 15 minutes with methanol/ammonium (50:1 v/v). The last step was performed according to the original protocol and the extracts obtained after the washing procedure were tested for mutagenicity with TA98, TA100, and YG1041. Only the washed fibers showing negative results were used [Kummrow et al., 2003].

Bile removal and Blue rayon extraction

Bile was removed from the resected gallbladders obtained from the specimens of *Mugil curema* collected at both sites using a sterile needle and stored in 1.5 mL-tubes. Because bile volume is small and highly variable depending on feeding rates [Richardson et al., 2004] we analyzed pooled bile samples from 7 to 15 specimens of fish collected from each of the six samplings. We prepared six pooled bile samples from Piaçaguera Channel and six pooled samples from Bertioga Channel. Volumes of 1 mL of each pool were diluted 100-fold with ultra pure water. The resultant solution was sterilized by filtration with an acetate cellulose membrane $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore) and stored at -20°C until extraction.

The resultant bile solution (100 mL) was extracted with 200 mg Blue rayon fibers twice totality 400 mg of BR. The mixture was shaken for 30 minutes at room temperature. After removal of the Blue rayon, a fresh batch of Blue rayon was added, and the extraction was repeated. Both fresh BR batches (400 mg) were washed with ultra pure water, wiped with a paper towel and eluted with 1 mL/mg of BR concentrated

methanol/ammonium hydroxide (50:1 v/v) by stirring the mixture for 30 minutes at room temperature. The combined eluates were evaporated using a rotary evaporator and dissolved in methanol. One aliquot was evaporated to dryness with a gentle stream of pure nitrogen and dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) just before the mutagenicity testing.

***Salmonella*/microsome microsuspension assay**

The Blue rayon organic extracts of the pooled fish bile were assayed for mutagenicity using the *Salmonella typhimurium* strains TA98 (*his*D3052, *rfa*, Δ bio, Δ *uvr*B, pKM101) [Maron and Ames, 1983], YG1041 (a derivative of TA98, able to produce high levels of nitroreductase and O-acetyltransferase) [Hagiwara et al., 1993], and TA100 (*his*G46, *rfa*, Δ bio, Δ *uvr*B, pKM101) [Maron and Ames, 1983] with and without S9 metabolic activation, using the microsuspension protocol developed by Kado et al. [1983]. Overnight cultures of the strains (around 10^9 cells/mL) concentrated 5-fold by centrifugation (10,000 g at 4°C, for 10 min) were resuspended with 0.015 M sodium phosphate buffer. 50 μ L of cell suspension, 50 μ L of 0.015 M sodium phosphate buffer or S9 mix, and 5 μ L of the sample were added to a tube and incubated at 37°C for 90 min without shaking. After incubation, 2 mL of molten agar was added, and the mixture was poured onto a minimal agar plate. Colonies were counted after 66 hours of incubation at 37°C using an automatic colony counter. The metabolic activation was provided by Aroclor 1254 induced Sprague Dawley rat liver S9 mix (MolTox, Boone, NC), which was prepared at a 4% v/v concentration, according to Maron and Ames [1983], and maintained on ice during the experiment. For TA98 and TA100, the positive controls were 0.125 μ g/plate of 4-nitroquinoline-oxide (4NQO) (Acros), and 0.625 μ g/plate of 2-aminoanthracene (2AA) (Sigma-Aldrich), both dissolved in

dimethylsulfoxide (DMSO). For YG1041 the positive controls were 10 µg/plate of 4-nitro-o-phenylenediamine (4NOP) (ICN Biomedicals Inc), and 5 µg/plate of benzo[a]pyrene (BaP).

The assays were performed using duplicate plates in the presence and absence of S9 and the doses tested were 10, 20, and 40 µg of Blue rayon per plate. Samples were considered positive when there was a significant statistical difference between the tested doses and the negative control (ANOVA), and a positive dose response. The potency of each sample was calculated based on the slope of the dose response curve using the Bernstein model [Bernstein et al., 1982] and expressed as number of revertants per milligram of Blue rayon.

Analyses of biliary PAHs metabolites

The pooled samples of crude bile were analyzed for two, four and five ring-PAH metabolites by a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with fluorescence detection. The analysis was performed according Krahm et al. [1984] with some modifications. Aliquots of 5 µL of bile were injected into the HPLC (Agilent Technologies 1200) system equipped with a reversed-phase analytical column 4.6 x 150 mm, C18 Synergi 4 µm Hydro-RP 80Å (Phenomenex), a 2 µm, 0.84 µL (internal volume) stainless-steel pre-column filter (Upchurch Scientific) and a 2 x 20 mm, C18 dry packed guard-column (Upchurch Scientific). The system was coupled to three UV-F detectors (Agilent 1200 series) and the chromatograms were recorded at excitation/emission wavelengths pairs for each detector as metabolites equivalent of benzop[a]pyrene (BaP), naphtalene (NPH) and phenantrene (PHN) respectively: 380/430 nm, 290/335 nm and 249/364 nm. Acetic acid/water (5 µL/L) (solvent A) and methanol (solvent B) were used, starting with a 0.8 mL/min flow from 90% solvent A,

passing in 5 min to 100% solvent B; 7 min at 100% solvent B; 0.5 min to increase the flow to 1.5 mL/min, 3.5 min in 100% solvent B at 1.5 mL/min, 0.5 min to return to 100% solvent A and decrease the flow to 0.9 mL/min. The column temperature was 50°C. Peaks area eluting after 1 min were integrated, summed and quantified as NPH, PHN, or BaP metabolites equivalents. These peaks represent all compounds present in the bile samples that fluoresce at each wavelength pair. The detection limit for each group of metabolite equivalent was determined as three times the standard deviation of the mean of six replicate analyses, which were: 0.12 µg/g for PHN; 0.09 µg/g for BaP; 0.33 µg/g to NPH metabolites equivalents. The control material for quality assurance used in the biliary PAHs metabolites was bile from an Atlantic Salmon (*Salmo salar*) exposed to Monterey Bay crude oil for 48 h (ASMBC). This material was donated by Northwest Fisheries Science Center (NWFSC).

3. Results and discussion

The results for the negative and positive controls were all in the expected range for our laboratory (data not shown). Negative results were observed for TA98 strain of *Salmonella* with and without S9 for the bile of the fishes collected in Bertioga Channel. In Piaçaguera Channel, the contaminated site, 4 of the 6 pooled samples were mutagenic for TA98 (Table I).

The mutagenicity increased with YG1041 in relation to TA98 with and without S9, indicating presence of nitroaromatics in the bile. The fishes collected in both sites responded in a similar way with YG1041 the absence of S9, but a great difference was seen in the presence of S9 (Table I). Higher responses for YG1041 with S9 were observed in the Piaçaguera Channel (3 to 9 times), indicating that the fishes from this area are more exposed to mutagenic polycyclic compounds (Table I).

The responses obtained varied along time, but the greatest variation was observed in Piaçaguera Channel. The highest value (14,000 rev./mg BR) was observed in May of 2006. It is also interesting to observe that this samples was the most mutagenic samples for all strains/conditions tested, indicating that the mutagenic compounds are related to the same source. Some authors showed increased responses in DNA damage in Summer (Buschini et al, 2003 e 2004) but May corresponds to Spring in Brazil. This increase could be related to the intensification of port activities but we do not have any data to support this hypothesis. More studies would be required to confirm this pattern of response.

The mutagenicity (YG1041 with S9) observed for the fishes collected at Piaçaguera Channel was 1.7 to 4.5 times higher compared to the absence of S9 (Table I), which suggests the presence of compounds that require rat S9 metabolism to be activated. At Bertioga Channel no increase with S9 was observed. Viganò et al. [2002] also observed higher mutagenic responses in the presence of S9 in the more contaminated site in Po River, Italy.

For TA100 bile of fishes from both sites presented similar responses, indicating that they are exposed to compounds that cause base-pair substitutions and require rat liver S9 to become mutagenic, such as Benzo[a]pyrene. This response is not expected taking into consideration that the fishes efficiently metabolize PAHs and the expected response would be mutagenic activity without S9, with was not the case.

TABLE I

The metabolite equivalents of Benzo[a]pyrene (BaP), Naphtalene (NPN) and Phenantrene (PHN) levels in the crude bile were higher in the fishes collected at Piaçaguera Channel in comparison to Bertioga Channel (Table II). The amounts of

metabolites were, in average, 4.2 (PHN); 2.3 (BaP) and 3.3 (NPH) times higher in Piaçaguera Channel. But for but no correlation were observed with the mutagenic responses (TABLE I and II). Unfortunately the sample that presented the highest level of mutagenicity (May/2006 from Piaçaguera Channel) was not analyzed for the PAHs metabolites. Some authors recently studied responses of soil extracts containing PAHs and observed unexpected responses as well [Mattsson et al, 2009]. Umbuzeiro et al. [2008], also showed that in air samples, the fractions containing the nitro and oxy PAHs were the most mutagenic for YG1041.

TABLE II

Johnson-Restrepo et al. [2008] showed that the sum of PAHs metabolites in fish (*Mugil incilis*) collected in Colombia was greater in the most contaminated sites such as Cartagena bay, Colombia. The same observation was made by Silva et al. [2006] in São Sebastião Bay, São Paulo, Brazil. In our study the relationship among the BaP; PHN and NPH metabolites equivalent, was 1:10:100 (Table III), similar to the ones obtained by Silva et al. [2006] and Viganò et al. [2002].

For both biomarkers, bile BR mutagenicity with YG1041/S9 and PAHs metabolites equivalents, fishes from Piaçaguera channel are more exposed to polycyclic aromatic compounds than the ones collected in Bertioga. It is seems other compounds besides the PAHs, are present in the environment because of the increased mutagenic response obtained for YG1041 in relation to TA98 in the presence of S9. This type of response is not expected for non substituted PAHs such as BaP [Kummorw et al. 2006b].

Nitroarenes in the aquatic environment could be responsible for the type of mutagenic activity detected with the YG1041 with S9. They could have been reduced in

fish tissues to aromatic amines that were adsorbed by the Blue rayon fibers during the bile extraction. Those aromatic amines have been oxidized by the rat S9 mix and subsequently N-acetylated by the bacterial acetyltransferases. The lower mutagenicity observed without S9 could be explained by the direct acetylation of the same aromatic amines as demonstrated for 2-aminoanthracene by Kummrow et al. [2006b]. Extract fractionation followed by bioassays, such as in EDA (Effect Direct Analysis) according to the procedures described by Brack [2003] could help in the identification of which compounds are present in the bile of the fishes analyzed in this study.

Biomarkers of effect such as DNA damage measured with the Comet assay and micronuclei frequency were analyzed in blood of the same fishes and higher responses for both assays were observed in Piacaguera Channel corroborating the data obtained in this study [Santos and Umbuzeiro 2006a,b].

The mutagenicity of Blue rayon extracts of fish bile tested with YG1041 in the presence of S9 can be used as an exposure biomarker for mutagenic polycyclic compounds present in the aquatic environment and could give complementary information along with the analysis of specific PAHs metabolites in monitoring studies.

Acknowledgments

The authors thank Carlos A. Coimbra, Célia M. Rech, Osvaldo A. da Silva, Raquel Carnivale Silva and Flávia Mazzini from CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo for technical assistance and Thiago Sanna Freire Silva for the acquisition and edition of the satellite image. This work was fully funded by CETESB except for the chemical analysis. PhD fellowship for Patricia Estevam dos Santos was provided by Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

References

- Aas E, Beyer J, Goksøyr A. 1998. PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. *Mar Environ Res* 46 (1-5):225-228.
- Bailey D, Solomon G. 2004. Pollution prevention at ports: clearing air. *Environ. Impact Assess Rev* 24:749-774.
- Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC. 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res* 97:267-287.
- Bícego MC, Taniguchi S, Yogui GT, Montone RC, Silva DAM, Lourenço RA, Martins CC, Sasaki ST, Pellizari VH, Weber RR. 2006. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. *Mar Pollut Bull* 52:1804-1832.
- Brack W. 2003. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures. *Anal Bioanal Chem* 377:397-407.
- Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C. 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutat Res.* 537(1):81-92.
- Buschini A, Martino A, Gustavino B, Monfrinotti M, Poli P, Rossi C, Santoro M, Dörr AJ, Rizzoni M. 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutat Res.* 557(2):119-29.
- Budzinski H, Mazéas O, Tronczynski J, Désaunay Y, Bocquené G, Claireaux G. 2004. Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: Application to the “Erika” oil spill. *Aquat Living Resour* 17:329-334.
- Cesar A, Choueri RB, Riba I, Morales-Caselles C, Pereira CDS, Santos AR, Abessa DMS, DelValls TA. 2007. Comparative sediment quality assessment in different littoral ecosystems from Spain (Gulf of Cadiz) and Brazil (Santos and São Vicente estuarine system). *Environ Int* 33:429-435.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2001. Relatório Sistema Estuarino Santos São Vicente – Agosto de 2001. Available from: www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua_geral.asp/.
- Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA. 2006. The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary, Portugal. *Mar Environ Res* 61:326-338.
- Fragoso NM, Hodson PV, Zambon S. 2006. Evaluation of an exposure assay to measure uptake of sediment PAH by fish. *Environ Monit Assess* 116:481-511.

- Hagiwara Y, Watanabe M, Oda Y, Sofuni T, Nohmi T. 1993. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat Res* 291:171-180.
- Hayatsu H. 1992. Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulphonate as an adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens. *J Chromatogr* 597:37-56.
- Hylland K. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *J Toxicol Environ Health* 69:109-123.
- Hortellani MA, Sarkis JES, Abessa DMS, Sousa ECPM. 2008. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário Santos – São Vicente. *Quim Nova* 31 (1):10-19.
- Jonhson-Restrepo B, Olivero-Verbel J, Lu S, Guette-Frenández J, Baldiris-Avila R, O'Byrne-Hoyos I, Aldous KM, Addink R, Kannan K. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia. *Environ Pollut* 151:452-459.
- Kado NY, Langley D, Eisenstadt E. 1983. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. *Mutat Res* 121:25-32.
- Kira S, Ito T, Hayatsu H, Taketa K, Zheng Y, Li R, Holliday TL, Giam CS. 1994. Detection of water borne mutagens and characterization of chemicals in selected Galveston sites after an oil spill. *Bull Environ Contam Toxicol* 53:285-291.
- Kira S, Nogami Y, Ito T, Hayatsu H. 1998. Measurement of a Time-Weighted Average Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater: An improved procedure of Blue rayon hanging technique for monitoring Benzo(a)pyrene. *Mar Environ Res* 46, 267-271.
- Krahn MM, Myers MS, Burrows DG, Malins DC. 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica* 14:633-646.
- Kummrow F, Rech CM, Coimbra CA, Roubicek DA, Umbuzeiro GA. 2003. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and Blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. *Mutat Res* 541:103-113.
- Kummrow F, Magalhães D, Franco A, Umbuzeiro G.A. 2006a. Blue rayon e teste de *Salmonella*/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras. *Rev Saúde Publica* 40 (5): 890-897.
- Kummrow F, Rech CM, Coimbra CA, Umbuzeiro GA. 2006b. Blue rayon-anchored technique/*Salmonella* microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary. *Mutat Res* 609:60-67.
- Lamparelli MC, Quinágua GA, Oliveira E, Tominaga MY, Santos PE, Rech CM, Umbuzeiro GA, Sato MIZ, Bevilacqua JE. 2007. Bertioga as a possible referenceregion

for studies in the Baixada Santista for carcinogenic metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity. *Rev Bras Toxicol* 20 (s.2): 1.

Mano H, Yamamoto M, Kinebuchi H, Araki K, Ohta T. 1995. Geographical variations in mutagenicity of Blue rayon extracts of Japanese human bile. *Mutat Res* 341:225-234.

Mano H, Roa IE, Araya JC, Ohta T, Yoshida K, Araki K, Kinebuchi H, Ishizu T, Nakadaira H, Endoh K, Yamamoto M, Watanabe H. 1996. Comparison of mutagenic activity of bile between Chilean and Japanese female patients having cholelithiasis. *Mutat Res* 371:73-77.

Maron DN, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173-215.

Martins CC, Mahiques MM, Bícigo MC, Fukumoto MM, Montone RC. 2007. Comparison between anthropogenic hydrocarbons and magnetic susceptibility in sediment cores from the Santos Estuary, Brazil. *Mar Pollut Bull* 54:240-246.

Mattsson A, Lundstedt S, Stenius U. 2009. Exposure of HepG2 to low levels of PAH-containing extracts from contaminated soils results in unpredictable genotoxic stress responses. *Environ Mol Mutagen* 50:337-348.

Medeiros PM, Bícigo MC. 2004. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbons inputs in sediment using geochemical markers. I. Santos, SP-Brazil. *Mar Pollut Bull* 49 (11):761-769.

Neves RLS, Oliveira TF, Ziolli RL. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish bile (*Mugil liza*) as biomarkers for environmental monitoring in oil contaminated areas. *Mar Pollut Bull* 54: 1813-1838.

Nishigima FN, Weber RR, Bícigo MC. 2001. Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil. *Mar Pollut Bull* 42 (11):1064-1072.

Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res* 567:109-149.

Oliveira IR, Soares LSH. 1996. Alimentação da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (pisces: Mugilidae), da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. *B Inst. Pesca* 23:95-104.

Quinaglia GA. 2006. Caracterização dos Níveis Basais de Concentração de Metais nos Sedimentos do Sistema Estuarino da Baixada Santista. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 239p.

Richardson DM, Gubbins MJ, Daves IM, Moffat CF, Pollard PM. 2004. Effects of feeding status on biliary PAH metabolite and biliverdin concentration in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Environ Toxicol Pharmacol* 17:79-85.

Roubicek DA. 2003. Estratégias para avaliação da genotoxicidade de sedimentos, Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 125p.

Santos PE, Umbuzeiro GA. 2006a. Comparação preliminar dos níveis de danos genotóxicos em peixes coletados na Bacia de Evolução do Canal de Piaçaguera e no Canal de Bertioga – SP utilizando o ensaio cometa. In: IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, São Pedro. Anais do IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. São Paulo: Vida e Consciência. 156-156.

Santos PE, Umbuzeiro GA. 2006b. Ocorrência de Micronúcleos em eritrócitos de Parati *Mugil sp* (Mugilidae, Perciformes) coletados na Bacia de Evolução do Canal de Piaçaguera e no Canal de Bertioga - SP. In: I International Congress of Fish Genetics and XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics, São Carlos - SP.

Silva DAM, Buzitis J, Krahn MM, Bícigo MC, Pires-Vanin AMS. 2006. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. Mar Pollut Bull 52:175-183.

Umbuzeiro GA, Kummrow F, Roubicek DA, Tominaga MY. 2006. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. Environ Int 32:359-364.

Umbuzeiro GA, Franco A, Martins MH, Kummrow F, Carvalho L, Schmeiser HH, Leykauf J, Stiborova M, Claxton LD. 2008. Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. Mutat Res 652:72-80.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 13:57-149.

Varanasi U, Stein JE, Nishimoto M. 1989. Biotransformation and disposition of PAH in aquatic environment. In: Varanasi U. (ed.). Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. CRC Press, Florida, 93-150.

Viganò L, Camoirano A, Izzotti A, D'Agostini F, Polesello S, Francisci C, De Flora S. 2002. Mutagenicity of sediments along the Pó River and genotoxicity biomarker in fish from polluted areas. Mutat Res 515:125-134.

Vilela CG, Batista DS, Baptista-Neto JA, Crapez M, McAllister JJ. 2004. Benthic foraminífera distribution in high polluted sediments from Niterói Harbor (Guanabara Bay), Rio de Janeiro, Brasil. An Acad Bras Cienc 76 (1):161-171.

Vuorinen PJ, Keinänen M, Vuontisjärvi H, Baršienė J, Broeg K, Förlin L, Gercken J, Kopecka J, Köhler A, Parkkonen J, Pempkowiak J, Schiedek D. 2006. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. Mar Pollut Bull 53:479-487.

Yoxall V, Wilson J, Ioannides C. 2004. An improved method for the extraction of mutagens from human urine and cooked meat using Blue rayon. *Mutat Res* 599:121-130.

List of Tables:

Table I:

Results of the Salmonella/microsome microsuspension assay expressed in number of revertants per mg of Blue Rayon for the pooled bile samples analyzed from February to December of 2006.

Table II –PAH metabolites equivalents in ng/g of for the pooled bile samples analyzed from February to December of 2006

Table I:

Piaçaguera Channel (contaminated site)						
Samplings (number of fishes analysed)	TA98		YG1041		TA100	
	without S9	with S9	without S9	with S9	without S9	with S9
Feb/06 (8)	ND	360	5100	8700	ND	3100
May/06 (12)	ND	420	5900	14000	800	3400
Jun/06 (15)	ND	ND	ND	8300	ND	ND
Aug/06 (14)	ND	240	1700	7600	ND	1600
Oct/06 (15)	ND	290	1900	7200	ND	1500
Dec/06 (7)	ND	ND	1100	3900	ND	1200
Bertioga Channel (reference site)						
Samplings (number of fishes analysed)	TA98		YG1041		TA100	
	without S9	with S9	without S9	with S9	without S9	with S9
Feb/06 (11)	ND	ND	990	2100	ND	1600
May/06 (8)	ND	ND	ND	1600	ND	1100
Jun/06 (14)	ND	ND	1700	2500	ND	1200
Aug/06 (15)	ND	ND	1800	1200	ND	790
Oct/06 (15)	ND	ND	2000	2300	1400	1600
Dec/06 (15)	ND	ND	1600	ND	ND	ND

ND: not detected

Table II:

Samplings	Piaçaguera Channel			Bertioga Channel		
	Benzo(a)Pyrene metabolites equivalents (ng/g)	Naphthalene metabolites equivalents (ng/g)	Phenanthrene metabolites equivalents (ng/g)	Benzo(a)Pyrene metabolites equivalents (ng/g)	Naphthalene metabolites equivalents (ng/g)	Phenanthrene metabolites equivalents (ng/g)
Feb/06	7.9	920	130	0.98	210	18
Jun/06	8.3	850	140	3.6	19	29
Aug/06	1.1	100	17	3.4	190	20
Oct/06	5.1	13	13	4.6	170	20
Dec/06	5.1	760	96	0.85	190	15
Average	5.5	528.6	79.2	2.68	155.8	20.4
SD	± 2.88	± 435.7	± 60.84	± 1.68	± 77.77	± 5.22

List of Figures: Figure 1 - Imagem de satellite idem Figura 1 desta tese (1. Introdução - pg.24).

Figure 1: Location of the sampling sites at Piaçaguera Channel and reference site at Bertioga Channel – São Paulo, Brazil. Map Data: Landsat ETM+ image of 03/04/2000, R5G4B3 false color composition, obtained from www.glc.f.umd.edu.

ANEXO IV: Artigo em preparação – Environmental monitoring using the alkaline single-cell gel electrophoresis and micronucleus test in estuarine fish *Mugil curema*.

Título: Environmental monitoring using the alkaline single-cell gel electrophoresis and micronucleus test in estuarine fish *Mugil curema*.

Artigo em preparação a ser submetido para a Revista Mutation Research.

Autora: Patrícia Estevam dos Santos

Orientadora: Gisela de Aragão Umbuzeiro

RESUMO

Avaliação de danos genotóxicos em organismos aquáticos tem sido amplamente utilizada em estudos da qualidade ambiental. O ensaio cometa e o teste de micronúcleo foram realizados em sangue de peixes da espécie *Mugil curema* coletados *in situ* para avaliação de estuários com diferentes níveis de contaminação. Localizado na Baixada Santista – SP – Brasil, o canal de Piaçaguera apresenta alto nível de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) entre outros contaminantes. Já o canal de Bertioga, foi utilizado como região de referência, por apresentar baixos valores para HPA e metais, assim como baixa atividade mutagênica. Foram realizadas amostragens de Fevereiro/2006 a Julho/2007. A maior diferença encontrada quanto a frequência de micronúcleos foi de 6 vezes comparando o canal de Piaçaguera (1,42%) e a região de referência (0,23%) para a amostragem realizado em Maio/2006. O número total de células para a leitura da frequência de micronúcleos também foi avaliada para a espécie *Mugil curema* e não foram encontradas diferenças nos resultados após a análise de 1000 e 4000 células/indivíduo sugerindo que 1000 células são suficientes para gerar dados confiáveis para a espécie no local de estudo. Com este número de células/indivíduo é viável a realização da análise de um número maior de espécimes tendo em vista a grande variabilidade entre indivíduos. No ensaio cometa, o nível de dano de classe 1 aparece em ambas as regiões com um nível basal visto que as diferenças entre as regiões estudadas passam a ser evidentes a partir do aumento do nível de danos de classe 2, 3 e 4. Os danos mais elevados de classe 3 e 4 são predominantes nos peixes coletados no canal de Piaçaguera. Aumento de 20 vezes para a média do nível de danos de classe 3 foi observado durante a amostragem Outubro/2006 para os peixes coletados no canal de Piaçaguera em comparação com a região referência. Já a classe 4 de danos apresentou um aumento de 16 vezes durante a amostragem de Dezembro/2006 comparando a região contaminada com a de referência. A variação observada entre as amostragens para ambos os testes pode estar associadas à provável entrada de contaminantes no ambiente de forma aleatória, a intensificação de navegação e a processos de dragagem do canal ou por fatores endógenos dos organismos para os peixes coletados no canal de Piaçaguera, visto que no canal de Bertioga as amostragens apresentaram-se mais homogêneas durante o monitoramento. Os resultados demonstram que ambos os ensaios são bons biomarcadores de efeito genotóxicos para estudos ambientais, porém novas amostragens devem ser realizadas para tentar estabelecer o valor basal de danos genotóxicos para a espécie *Mugil curema*.

Palavras chave: Teste de micronúcleo, ensaio cometa, *Mugil curema*, biomarcadores, HPA.

ANEXO V: Dados brutos do ensaio cometa para o canal de Bertioga e Piaçaguera.

Amostragem Fevereiro/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Bertioga	165	35	0	0	0	35
	166	34	0	0	0	34
	161	39	0	0	0	39
	152	48	0	0	0	48
	171	29	0	0	0	29
	158	42	3	0	0	48
	170	30	0	0	0	30
	141	55	4	0	0	63
	162	38	0	0	0	38
Média (DP)	160,67 (9,43)	38,88 (8,43)	0,77 (1,56)	0	0	40,44 (10,85)

Amostragem Maio/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Bertioga	47	115	27	9	2	204
	56	138	5	1	0	151
	55	118	25	2	0	325
	33	146	18	3	0	187
	61	125	10	4	0	157
	53	137	7	3	0	160
Média (DP)	50,83 (9,84)	129,83 (12,35)	15,33 (9,39)	3,66 (2,80)	0,33 (0,81)	197,33 (65,75)

Amostragem Junho/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Bertioga	86	38	68	6	2	200
	71	44	75	8	2	226
	47	77	71	3	2	236
	53	71	70	4	2	231
	79	63	52	5	1	186
	52	65	75	7	1	240
	72	40	69	17	2	237
	35	83	78	3	1	252
	48	70	80	2	0	236
	52	45	99	4	0	255
	72	33	92	3	0	226
	64	57	74	5	0	220
Média (DP)	60,92 (15,28)	57,17 (16,73)	75,25 (11,89)	5,58 (4,01)	1,08 (0,9)	228,75 (19,72)

Amostragem Agosto/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Bertioga	107	78	15	0	0	108
	136	92	2	0	0	96
	112	84	4	0	0	92
	109	88	3	0	0	94
	97	84	19	0	0	122
	122	58	18	2	0	99
	128	69	3	0	0	75
	97	96	7	0	0	110
	101	87	12	0	0	111
	124	68	8	0	0	84
Média (DP)	113,3 (13,59)	80,4 (12,0)	9,1 (6,47)	0,2 (0,63)	0	99,1 (13,97)

Amostragem Outubro/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Bertioga	62	124	11	2	1	156
	73	64	62	1	0	191
	75	43	79	2	1	211
	53	82	59	4	2	220
	62	78	60	0	0	198
	89	57	52	1	1	168
	43	84	69	3	1	235
	52	64	78	3	3	241
	92	70	37	1	0	147
	96	89	14	1	0	120
	57	75	66	2	0	213
	67	71	60	2	0	197
	37	93	67	3	0	236
	56	77	66	1	0	212
	73	68	57	2	0	188
Média (DP)	65,8 (17,38)	75,93 (18,38)	55,8 (20,26)	1,86 (1,06)	0,6 (0,91)	195,53 (34,99)

Amostragem Dezembro/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Bertioga	62	114	16	7	1	171
	74	92	26	8	0	168
	64	76	53	6	1	204
	60	89	47	4	0	195
	54	77	66	2	1	219
	48	84	67	3	0	227
	63	81	50	5	1	200
	52	76	71	1	0	221
	47	79	70	3	1	232
	49	103	41	5	2	208
	58	97	34	7	4	202
	52	120	21	5	2	185
	54	99	45	2	0	195
	46	74	73	5	2	243
Média (DP)	55,92 (7,97)	90,07 (14,76)	48,57 (19,29)	4,5 (2,10)	1,07 (1,14)	205 (21,97)

Amostragem Fevereiro/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Piaçaguera	7	35	127	23	8	390
	4	31	154	5	6	378
	2	17	174	5	2	388
	4	12	170	9	5	399
	4	12	155	8	11	390
	30	76	55	39	0	303
	36	96	54	12	12	288
	34	64	73	24	5	302
Média (DP)	15,12 (15,2)	42,87 (31,94)	120,25(51,59)	15,62 (12,02)	6,12 (4,12)	354,75 (47,81)

Amostragem Maio/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Piaçaguera	38	47	74	39	2	320
	25	32	82	57	4	415
	22	19	76	81	2	422
	43	28	88	37	4	331
	31	30	86	48	5	366
	35	22	66	75	2	387
	41	26	120	11	2	307
	27	18	85	69	1	399
	29	21	57	83	10	424
	22	17	93	65	3	410
	24	40	53	78	5	400
Média (DP)	29,85 (6,54)	24,85 (8,05)	80 (23,39)	61,28 (24,89)	4 (3,05)	384,71 (38,760)

Amostragem Junho/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Piaçaguera	61	26	93	16	4	276
	42	35	114	7	2	292
	33	48	66	52	1	340
	24	18	103	53	2	391
	44	31	66	47	12	352
	47	32	108	10	3	290
	48	27	25	95	5	382
	50	26	100	22	2	300
	52	22	43	74	9	366
	42	19	82	56	1	355
	61	27	88	22	2	277
	44	31	79	42	4	331
	47	25	73	53	2	338
	64	42	63	28	3	255
Média (DP)	47,07 (10,77)	29,21 (8,29)	78,78 (25,13)	41,21 (25,28)	3,71 (3,14)	324,64 (42,86)

Amostragem Agosto/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Piaçaguera	53	82	57	7	1	221
	42	101	49	8	0	223
	48	94	54	3	1	215
	46	72	75	5	2	245
	52	83	61	3	1	218
	43	67	87	2	1	251
Média (DP)	47,33 (4,54)	83,16 (12,82)	63,83 (14,37)	4,66 (2,42)	1 (0,63)	228,93 (15,21)

Amostragem Outubro/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Piaçaguera	32	23	100	43	2	360
	39	47	81	30	3	311
	19	41	79	52	9	391
	23	33	103	37	4	366
	22	39	92	42	5	369
	44	37	83	32	4	315
	26	32	80	60	2	380
	35	39	93	29	4	328
	28	44	92	33	3	339
	17	66	94	22	1	324
	24	51	91	32	2	337
	41	34	79	43	3	333
	42	28	81	44	5	342
	28	40	100	29	3	339
	39	47	67	43	4	326
Média (DP)	30,6 (8,90)	40,06 (10,36)	87,66 (10,01)	38,06 (9,95)	3,6 (1,88)	344 (23,91)

Amostragem Dezembro/2006						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Piaçaguera	44	35	61	37	23	360
	33	47	36	60	24	395
	51	31	54	47	17	348
	42	40	61	46	11	487
	37	33	54	63	13	382
	34	51	68	32	15	343
	49	42	32	56	21	358
Média (DP)	41,42 (7,09)	39,85 (7,40)	52,28 (13,42)	48,71 (11,62)	17,71 (5,05)	381,85 (49,88)

Amostragem Junho/2007						
Amostragem	Classes					Escore de Danos 0 - 800
	0	1	2	3	4	
Canal de Piaçaguera	31	62	72	23	12	323
	41	53	84	17	5	292
	30	61	81	19	9	316
	29	55	87	18	11	324
	37	53	62	29	19	340
	37	45	54	27	37	382
	28	53	88	25	6	328
	38	64	71	18	9	296
	32	43	76	36	13	355
	24	59	72	28	17	355
	42	40	50	40	28	372
	31	43	87	27	12	346
	30	45	91	22	12	341
	36	44	90	23	7	321
Média (DP)	33,28 (5,25)	51,42 (8,08)	76,07 (13,32)	25,14 (6,75)	14,07 (8,87)	335,07 (26,01)

ANEXO VI: Dados Brutos do teste de Micronúcleos para o canal de Bertioga e Piaçaguera.

Amostragem Fevereiro/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Bertioga	4	16	0,4	0,4
	6	18	0,6	0,45
	2	9	0,2	0,22
	2	7	0,2	0,17
	2	11	0,2	0,27
	5	12	0,5	0,3
	3	7	0,3	0,17
	2	6	0,2	0,15
	6	12	0,6	0,3
	1	8	0,1	0,2
	5	17	0,5	0,42
	3	7	0,3	0,17
	1	1	0,1	0,02
Média (DP)	3,23 (1,78)	10,07 (4,88)	0,32 (0,17)	0,24 (0,12)

Amostragem Maio/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Bertioga	0	3	0	0,07
	1	2	0,1	0,05
	5	19	0,5	0,47
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	2	11	0,2	0,27
	7	22	0,7	0,55
	3	9	0,3	0,22
	4	13	0,4	0,32
	4	15	0,4	0,37
Média (DP)	2,6 (2,41)	9,4 (7,96)	0,26 (0,24)	0,23 (0,19)
Mediana	2,5	10	0,25	0,245

Amostragem Junho/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Bertioğa	3	11	0,3	0,27
	4	20	0,4	0,5
	0	1	0	0,02
	3	11	0,3	0,27
	4	19	0	0,47
	1	3	0,4	0,07
	5	20	0,5	0,5
	6	18	0,6	0,45
	4	15	0,4	0,37
	3	13	0,3	0,32
	4	17	0,4	0,42
	5	20	0,5	0,5
	3	13	0,3	0,32
	4	17	0,4	0,42
	3	16	0,3	0,4
Média (DP)	3,46 (1,5)	14,26 (5,86)	0,34 (0,16)	0,35 (0,14)
Mediana	4	16	0,4	0,4

Amostragem Agosto/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Bertioğa	4	19	0,4	0,47
	6	22	0,6	0,55
	3	12	0,3	0,3
	4	14	0,4	0,35
	2	14	0,2	0,35
	2	9	0,2	0,22
	5	15	0,5	0,37
	2	11	0,2	0,27
	3	17	0,3	0,42
	4	17	0,4	0,42
	2	10	0,2	0,25
	5	16	0,5	0,4
	4	13	0,4	0,32
Média (DP)	3,53 (1,33)	14,53 (3,68)	0,35 (0,13)	0,36 (0,09)
Mediana	4	14	0,4	0,35

Amostragem Outubro/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Bertioğa	4	16	0,4	0,4
	3	14	0,3	0,35
	5	17	0,5	0,42
	3	17	0,3	0,42
	3	16	0,3	0,4
	2	9	0,2	0,22
	5	18	0,5	0,45
	2	11	0,2	0,27
	2	10	0,2	0,25
	3	13	0,3	0,32
	4	16	0,4	0,4
	2	6	0,2	0,15
	4	10	0,4	0,25
	5	16	0,5	0,4
	0	7	0	0,17
Média (DP)	3,13 (1,40)	13,06 (3,93)	0,31 (0,14)	0,32 (0,09)
Mediana	3	13	0,3	0,32

Amostragem Dezembro/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Bertioğa	4	11	0,4	0,27
	11	41	1,1	1,02
	8	26	0,8	0,65
	8	33	0,8	0,82
	10	37	1	0,92
	7	37	0,7	0,92
	3	12	0,3	0,3
	5	20	0,5	0,5
	0	2	0	0,05
	7	27	0,7	0,67
	3	17	0,3	0,42
	1	3	0,1	0,07
	6	21	0,6	0,52
	3	5	0,3	0,12
	7	28	0,7	0,7
Média (DP)	5,53 (3,18)	21,33 (12,82)	0,55 (0,31)	0,53 (0,32)
Mediana	6	21	0,6	0,52

Amostragem Fevereiro/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Piaçaguera	2	12	0	0,3
	2	19	0,2	0,47
	4	22	0,4	0,55
	7	18	0,7	0,45
	3	19	0,3	0,47
	4	26	0,4	0,65
Média (DP)	3,66 (1,86)	19,33 (4,63)	0,33 (0,23)	0,48 (0,11)

Amostragem Maio/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Piaçaguera	7	27	0,7	0,67
	8	45	0,8	1,12
	14	64	1,4	1,6
	15	62	1,5	1,55
	10	36	1	0,9
	7	29	0,7	0,72
	4	19	0,4	0,47
	15	53	1,5	1,32
	16	66	1,6	1,6
	23	85	2,3	2,12
	11	43	1,1	1,07
	16	55	1,6	1,37
Média (DP)	12,16 (5,30)	48,66 (19,15)	1,21 (0,53)	1,21 (0,47)

Amostragem Junho/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Piaçaguera	5	34	0,5	0,85
	10	34	1	0,85
	6	23	0,6	0,57
	4	16	0,4	0,4
	8	32	0,8	0,8
	12	46	1,2	1,15
	10	36	1	0,9
	3	14	0,3	0,35
	18	79	1,8	1,97
	13	53	1,3	1,32
	16	60	1,6	1,5
	8	33	0,8	0,82
	7	28	0,7	0,7
Média (DP)	9,23 (4,54)	37,53 (18,10)	0,92 (0,45)	0,93 (0,45)

Amostragem Agosto/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Piaçaguera	13	54	1,3	1,35
	12	49	1,2	1,22
	19	76	1,9	1,9
	15	61	1,5	1,52
	12	52	1,2	1,3
	18	68	1,8	1,7
	15	54	1,5	1,35
	19	68	1,9	1,7
	12	51	1,2	1,27
	9	39	0,9	0,97
Média (DP)	14,4 (3,40)	57,2 (10,98)	1,44 (0,34)	1,42 (0,27)

Amostragem Outubro/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Piaçaguera	6	18	0,6	0,45
	12	45	1,2	1,12
	11	37	1,1	0,85
	10	34	1	0,85
	9	34	0,9	0,85
	11	37	1,1	0,92
	14	46	1,4	1,15
	11	36	1,1	0,9
	7	30	0,7	0,75
	12	40	1,2	1
	7	28	0,7	0,7
	11	40	1,1	1
	5	25	0,5	0,62
	11	36	1,1	0,9
Média (DP)	9,78 (2,60)	34,71 (7,56)	0,97 (0,26)	0,86 (0,18)

Amostragem Dezembro/2006				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Piaçaguera	11	50	1,1	1,25
	10	38	1	0,95
	12	44	1,2	1,1
	5	32	0,5	0,8
	6	30	0,6	0,75
	13	58	1,3	1,45
	6	28	0,6	0,7
Média (DP)	9 (3,26)	40 (11,19)	0,9 (0,32)	1 (0,27)

Amostragem Abril/2007				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Piaçaguera	5	20	0,5	0,5
	3	13	0,3	0,32
	4	14	0,4	0,35
	4	16	0,4	0,4
	7	23	0,7	0,57
	6	25	0,6	0,62
	3	17	0,3	0,42
	5	21	0,5	0,52
	3	15	0,3	0,37
Média (DP)	4,44 (1,42)	18,22 (4,20)	0,44 (0,14)	0,45 (0,10)

Amostragem Julho/2007				
Local de Estudo	nº de MN/1000	nº de MN/4000	% de MN (1000)	% de MN (4000)
Canal de Piaçaguera	5	19	0,5	0,47
	3	15	0,3	0,37
	6	19	0,6	0,47
	4	15	0,4	0,37
	7	22	0,7	0,55
	3	16	0,3	0,4
	5	20	0,5	0,5
	3	15	0,3	0,37
	6	20	0,6	0,5
	4	19	0,4	0,47
Média (DP)	4,6 (1,42)	18 (2,53)	0,46 (0,14)	0,44 (0,06)

ANEXO VII: Resultados das análises estatísticas pelo teste-F e teste-T para os escores de danos calculados a partir das classes de danos obtidas pelo ensaio cometa em sangue total de *Mugil curema* para o canal de Piaçaguera e região de referência (canal de Bertiooga) de Fevereiro a Dezembro/2006.

Dados Brutos		Análise Estatística		
Escore de Danos 0 - 800		Média	40,444	354,75
Bertiooga	Piaçaguera	Variância	117,7777778	2286,5
fev/06	fev/06	n	9	8
35	390	grau de liberdade (F)	8	7
34	378	Valor de F (calculado)	19,41367925	Fcrit < Fcalc = grupos diferentes
39	388	Valor Crítico de F	3,725725317	
48	399	Resultado	Variâncias	
29	390	Grau de liberdade (T)	8	Tcrit < Fcalc = médias diferentes
48	303	Variância amostral para	17,28869341	
30	288	variâncias diferentes (Sd)		
63	302	Valor T Calculado=	18,1798328	
38		Valor T Crítico =	2,364624251	

Dados Brutos		Análise Estatística		
Escore de Danos 0 - 800		Média	197,333	380,0909091
Bertiooga	Piaçaguera	Variância	4323,466667	1816,090909
maio/06	maio/06	n	6	11
204	320	grau de liberdade (F)	5	10
151	415	Valor de F (calculado)	2,380644408	Fcrit < Fcalc = grupos diferentes
325	422	Valor Crítico de F	4,73506307	
187	331	Resultado	Variâncias iguais	
157	366	Grau de liberdade (T)	15	Tcrit < Fcalc = médias diferentes
160	387	Variância amostral para	2651,882828	
	307	variâncias iguais (Sp)		
	399	Valor T Calculado=	6,992713421	
	424	Valor T Crítico =	2,131449536	

Dados Brutos		Análise Estatística		
Escore de Danos 0 - 800		Média	228,750	329,1818182
Bertioga	Piaçaguera	Variância	389,1136364	1837,478022
junho/06	junho/06	n	12	14
200	276	grau de liberdade (F)	11	13
226	292	Valor de F (calculado)	4,722214413	Fcrit < Fcalc = grupos diferentes
236	340	Valor Crítico de F	2,761417442	
231	391	Resultado	Variâncias	
186	352	Grau de liberdade (T)	19	
240	290	Variância amostral para		
237	382	variâncias diferentes (Sd)	12,79353612	
252	300	Valor T Calculado=	7,850200072	Tcrit < Fcalc = médias diferentes
236	366	Valor T Crítico =	2,100922037	
255	355			
226	277			
220	331			
	338			
	255			

Dados Brutos		Análise Estatística		
Escore de Danos 0 - 800		Média	99,100	228,8333333
Bertioga	Piaçaguera	Variância	195,4333333	231,3666667
agosto/06	agosto/06	n	10	6
108	221	grau de liberdade (F)	9	5
96	223	Valor de F (calculado)	1,183864916	Fcrit < Fcalc = grupos diferentes
92	215	Valor Crítico de F	4,772465613	
94	245	Resultado	Variâncias iguais	
122	218	Grau de liberdade (T)	14	
99	251	Variância amostral para		
75		variâncias iguais (Sp)	208,2666667	
110		Valor T Calculado=	17,40833869	Tcrit < Fcalc = médias diferentes
111		Valor T Crítico =	2,144786681	
84				

Dados Brutos		Análise Estatística		
Escore de Danos 0 - 800		Média	195,533	347,2727273
Bertioga	Piaçaguera	Variância	1224,552381	571,7142857
outubro/06	outubro/06	n	15	15
156	360	grau de liberdade (F)	14	14
191	311	Valor de F (calculado)	2,141895719	Fcrit < Fcalc = grupos diferentes
211	391	Valor Crítico de F	2,483725741	
220	366	Resultado	Variâncias iguais	
198	369	Grau de liberdade (T)	28	
168	315	Variância amostral para		
235	380	variâncias iguais (Sp)	898,1333333	
241	328	Valor T Calculado=	13,86623542	Tcrit < Fcalc = médias diferentes
147	339	Valor T Crítico =	2,048407115	
120	324			
213	337			
197	333			
236	342			
212	339			
188	326			

Dados Brutos		Análise Estatística		
Escore de Danos 0 - 800		Média	205,000	381,8571429
Bertioga	Piaçaguera	Variância	482,9230769	2488,47619
dezembro/06	dezembro/06	n	14	7
171	360	grau de liberdade (F)	13	6
168	395	Valor de F (calculado)	5,152945281	Fcrit < Fcalc = grupos diferentes
204	348	Valor Crítico de F	3,976362661	
195	487	Resultado	Variâncias	
219	382	Grau de liberdade (T)	7	
227	343	Variância amostral para		
200	358	variâncias diferentes (Sd)	19,74819243	
221		Valor T Calculado=	8,955611685	Tcrit < Fcalc = médias diferentes
232		Valor T Crítico =	2,364624251	
208				
202				
185				
195				
243				

ANEXO VIII: Resultado das análises estatísticas pelo teste-F e teste-T para a frequência de micronúcleos observada em 4000 células/indivíduo no teste de micronúcleo em sangue total de *Mugil curema* para o canal de Piaçaguera e região de referência (canal de Bertiooga) de Fevereiro a Dezembro/2006.

Dados Brutos		Análise Estatística		
4000 céls/indiv (%)		Média	0,249	0,481666667
Bertiooga	Piaçaguera	Variância	0,015191026	0,013456667
fev/06	abr/06	n	13	6
0,4	0,3	grau de liberdade (F)	12	5
0,45	0,47			
0,22	0,55	Valor de F (calculado)	1,128884739	
0,17	0,45			
0,27	0,47	Valor Crítico de F	4,677703792	
0,3	0,65			
0,17		Resultado	Variâncias iguais	
0,15				
0,3		Grau de liberdade (T)	17	
0,2		Variância amostral para		
0,42		variâncias iguais (Sp)	0,01468092	
0,17				
0,02		Valor T Calculado=	3,886843597	Tcalc > Tcrit =
		Valor T Crítico =	2,109815559	médias diferentes

Dados Brutos		Análise Estatística		
4000 céls/indiv (%)		Média	0,232	1,194545455
Bertiooga	Piaçaguera	Variância	0,03924	0,226244697
mai/06	mai/06	n	10	12
0,07	0,67	grau de liberdade (F)	9	11
0,05	1,12			
0,47	1,6	Valor de F (calculado)	5,76566506	
0	1,55			
0	0,9	Valor Crítico de F	3,102485408	
0,27	0,72			
0,55	0,47	Resultado	Variâncias	
0,22	1,32			
0,32	1,6	Grau de liberdade (T)	15	
0,37	2,12	Variância amostral para		
	1,07	variâncias diferentes (Sd)	0,15092291	
	1,37			
		Valor T Calculado=	6,377729232	Tcalc > Tcrit =
		Valor T Crítico =	2,131449536	médias diferentes

Dados Brutos		Análise Estatística		
4000 céls/indiv (%)		Média	0,353	0,969090909
Bertioga jun/06	Piaçaguera jun/06	Variância	0,021880952	0,204073077
0,27	0,85	n	15	13
0,5	0,85	grau de liberdade (F)	14	12
0,02	0,57	Valor de F (calculado)	9,326517117	
0,27	0,4	Valor Crítico de F	2,637123558	
0,47	0,8	Resultado	Variâncias	
0,07	1,15	Grau de liberdade (T)	14	
0,5	0,9	Variância amostral para variâncias diferentes (Sd)	0,130983431	
0,45	0,35	Valor T Calculado=	4,701034107	Tcalc > Tcrit = médias diferentes
0,37	1,97	Valor T Crítico =	2,144786681	
0,32	1,32			
0,42	1,5			
0,5	0,82			
0,32	0,7			
0,42				
0,4				

Dados Brutos		Análise Estatística		
4000 céls/indiv (%)		Média	0,361	1,428
Bertioga ago/06	Piaçaguera ago/06	Variância	0,008524359	0,076195556
0,47	1,35	n	13	10
0,55	1,22	grau de liberdade (F)	12	9
0,3	1,9	Valor de F (calculado)	8,938567203	
0,35	1,52	Valor Crítico de F	3,072947122	
0,35	1,3	Resultado	Variâncias	
0,22	1,7	Grau de liberdade (T)	11	
0,37	1,35	Variância amostral para variâncias diferentes (Sd)	0,090968541	
0,27	1,7	Valor T Calculado=	11,73186638	Tcalc > Tcrit = médias diferentes
0,42	1,27	Valor T Crítico =	2,228138842	
0,42	0,97			
0,25				
0,4				
0,32				

Dados Brutos		Análise Estatística		
4000 céls/indiv (%)		Média	0,325	0,867272727
Bertioga out/06	Piaçaguera out/06	Variância	0,009769524	0,03549011
0,4	0,45	n	15	14
0,35	1,12	grau de liberdade (F)	14	13
0,42	0,85	Valor de F (calculado)	3,632736926	
0,42	0,85	Valor Crítico de F	2,553618792	
0,4	0,85	Resultado	Variâncias	
0,22	0,92	Grau de liberdade (T)	19	
0,45	1,15	Variância amostral para variâncias diferentes (Sd)	0,056447404	
0,27	0,9	Valor T Calculado=	9,612595453	Tcalc > Tcrit = médias diferentes
0,25	0,75	Valor T Crítico =	2,09302405	
0,32	1			
0,4	0,7			
0,15	1			
0,25	0,62			
0,4	0,9			
0,17				

Dados Brutos		Análise Estatística		
4000 céls/indiv (%)		Média	0,530	1
Bertioga dez/06	Piaçaguera dez/06	Variância	0,1025	0,078333333
0,27	1,25	n	15	7
1,02	0,95	grau de liberdade (F)	14	6
0,65	1,1	Valor de F (calculado)	1,308510638	
0,82	0,8	Valor Crítico de F	3,955933943	
0,92	0,75	Resultado	Variâncias iguais	
0,92	1,45	Grau de liberdade (T)	20	
0,3	0,7	Variância amostral para variâncias iguais (Sp)	0,09525	
0,5		Valor T Calculado=	3,326968392	Tcalc > Tcrit = médias diferentes
0,05		Valor T Crítico =	2,085963441	
0,67				
0,42				
0,07				
0,52				
0,12				
0,7				

ANEXO IX: Dados brutos do teste de mutagenicidade (*Salmonella*/microsossoma em microssuspensão) para os extratos de bile por Blue rayon para os peixes coletados no canal de Bertioiga e Piaçaguera de Fevereiro a Dezembro/2006.

Fevereiro/2006 - Canal de Bertioiga												
Doses/placa (µg)	Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
	TA98				TA100				YG1041			
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle Negativo	23,4	4,09	20,8	2,16	121,6	12,17	109,6	10,35	129,8	11,86	123,6	10,45
10	28,5	10,61	21,5	0,71	136	15,56	149,5	10,61	146	8,49	154	0
20	21	1,41	ND	ND	128,5	7,78	147	5,66	155,5	0,71	171,5	26,16
40	22,5	2,12	26,5	3,54	145,5	2,12	171	21,21	167,5	14,85	202,5	3,54
Controle Positivo	592	7,07	49	14,14	2162	22,62	914,5	86,97	829	4,24	270	12,72

Maio/2006 - Canal de Bertioiga												
Doses/placa (µg)	Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
	TA98				TA100				YG1041			
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle Negativo	23,4	4,09	20,8	2,16	121,6	12,17	109,6	10,35	129,8	11,86	123,6	10,45
10	18	1,41	23	7,07	143,5	10,61	127,5	0,71	135,5	4,95	154,5	6,36
20	14,5	9,19	22,5	2,12	130,5	0,71	142	14,14	135,5	10,61	162,5	19,09
40	24,5	6,36	17	5,66	147	16,97	149,5	0,71	152,5	14,85	184,5	19,09
Controle Positivo	592	7,07	49	14,14	2162	22,62	914,5	86,97	829	4,24	270	12,72

Junho/2006 - Canal de Bertioiga												
Doses/placa (µg)	Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
	TA98				TA100				YG1041			
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle Negativo	23,4	4,09	20,8	2,16	121,6	12,17	109,6	10,35	129,8	11,86	123,6	10,45
10	24	1,41	17,5	2,12	125	1,41	140,5	16,26	158	1,41	160,5	9,19
20	22,5	3,54	20	1,41	129,5	16,26	142	14,14	187	1,41	172,5	10,61
40	23,5	4,95	22	2,83	128,5	16,26	152,5	6,36	190	4,24	225	7,07
Controle Positivo	592	7,07	49	14,14	2162	22,62	914,5	86,97	829	4,24	270	12,72

Agosto/2006 - Canal de Bertioga												
Doses/placa (µg)	Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
	TA98				TA100				YG1041			
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle Negativo	19,6	3,78	16,6	2,7	135,6	7,36	139	4,3	123,8	11,23	100	17,19
10	20,5	0,71	20,5	0,71	147	9,9	151	15,56	127	2,83	108,5	7,78
20	20	4,24	19,5	2,12	140,5	7,78	173,5	2,12	116	11,31	113	1,41
40	19	5,66	19,5	2,12	125,5	41,72	165,5	14,85	193	19,8	156	15,56
Controle Positivo	416,5	12,02	53,5	0,7	1375	579,1	960	14,14	649,5	6,36	246,5	13,43

Outubro/2006 - Canal de Bertioga												
Doses/placa (µg)	Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
	TA98				TA100				YG1041			
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle Negativo	19,6	3,78	16,6	2,7	135,6	7,36	139	4,3	123,8	11,23	100	17,19
10	20,5	2,12	20,5	2,12	168,5	16,26	157,5	10,61	127,5	17,68	124,5	2,12
20	19,5	7,78	17,5	0,71	159,5	4,95	169,5	4,95	158	1,41	138	9,9
40	21,5	7,78	20,5	2,12	165	1,41	165	5,66	206,5	2,12	195	9,9
Controle Positivo	416,5	12,02	53,5	0,7	1375	579,1	960	14,14	649,5	6,36	246,5	13,43

Dezembro/2006 - Canal de Bertioga												
Doses/placa (µg)	Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
	TA98				TA100				YG1041			
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle Negativo	19,6	3,78	16,6	2,7	135,6	7,36	139	4,3	123,8	11,23	100	17,19
10	18	1,41	16	7,07	174	15,56	151,5	16,26	135	2,83	86,5	3,54
20	18,5	2,12	24,5	0,71	157	8,49	147	7,07	152	11,31	125,5	6,36
40	16,5	2,12	21,5	3,54	157,5	3,54	160	18,38	191	7,07	124	2,83
Controle Positivo	416,5	12,02	53,5	0,7	1375	579,1	960	14,14	649,5	6,36	246,5	13,43

Fevereiro/2006 - Canal de Piaçaguera												
Doses/placa (µg)	Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
	TA98				TA100				YG1041			
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle Negativo	23,4	4,09	20,8	2,16	121,6	12,17	109,6	10,35	129,8	11,86	123,6	10,45
10	34	4,24	24	7,07	134	2,83	129,5	2,12	241,5	10,61	234,5	31,82
20	30	8,49	28,5	7,78	134	7,07	179	12,73	ND	ND	123,5	6,36
40	31	0	35	1,41	151,5	9,19	183,5	2,12	351,5	7,78	457,5	17,68
Controle Positivo	592	7,07	49	14,14	2162	22,62	914,5	86,97	829	4,24	270	12,72

Maio/2006 - Canal de Piaçaguera													
		Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
Doses/placa (µg)		TA98				TA100				YG1041			
		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle													
Negativo		23,4	4,09	20,8	2,16	121,6	12,17	109,6	10,35	129,8	11,86	123,6	10,45
10		26	1,41	25	1,41	136,5	0,71	156	2,83	188	2,83	273,5	3,54
20		32,5	14,85	30,5	0,71	129	1,41	172,5	10,61	239,5	24,75	406	2,83
40		42	4,24	37	8,49	157,5	3,54	177	16,97	372,5	43,13	542	48,08
Controle													
Positivo		592	7,07	49	14,14	2162	22,62	914,5	86,97	829	4,24	270	12,72

Junho/2006 - Canal de Piaçaguera													
Doses/placa (µg)		Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
		TA98				TA100				YG1041			
		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle													
Negativo	23,4	4,09	20,8	2,16	121,6	12,17	109,6	10,35	129,8	11,86	123,6	10,45	
10	25,5	10,61	26	2,83	108	15,56	128,5	3,54	137	18,38	232,5	27,58	
20	21,5	4,95	29,5	2,12	100	24,04	116	2,83	136	8,49	317	50,91	
40	20	2,83	27	7,07	109,5	7,78	127,5	20,51	158,5	6,36	425	70,71	
Controle													
Positivo	592	7,07	49	14,14	2162	22,62	914,5	86,97	829	4,24	270	12,72	

Outubro/2006 - Canal de Piaçaguera													
Doses/placa (µg)		Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
		TA98				TA100				YG1041			
		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle													
Negativo	19,6	3,78	16,6	2,7	135,6	7,36	139	4,3	123,8	11,23	100	17,19	
10	15	2,83	21,5	6,36	157	5,66	177	8,49	117,5	14,85	140,5	6,36	
20	17,5	2,12	22,5	2,12	162,5	20,51	167	4,24	155,5	19,09	234	4,24	
40	22,5	6,36	28,5	2,12	165	29,7	206	5,66	207	5,66	425,5	16,26	
Controle													
Positivo	416,5	12,02	53,5	0,7	1375	579,1	960	14,14	649,5	6,36	246,5	13,43	

Dezembro/2006 - Canal de Piaçaguera													
		Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)											
Doses/placa (µg)		TA98				TA100				YG1041			
		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle													
Negativo		19,6	3,78	16,6	2,7	135,6	7,36	139	4,3	123,8	11,23	100	17,19
	10	15,5	2,12	16	1,41	132	5,66	150,5	3,54	137,5	10,61	121,5	2,12
	20	19,5	0,71	20,5	3,54	142	9,9	157	2,83	148,5	19,09	172	21,21
	40	20,5	7,78	22,5	3,54	150,5	10,61	190,5	9,19	167	5,66	267	2,67
Controle													
Positivo		416,5	12,02	53,5	0,7	1375	579,1	960	14,14	649,5	6,36	246,5	13,43

Abril/2007 - Canal de Piaçaguera												
Média do número de revertentes/placa e Desvio Padrão (DP)												
Doses/placa (µg)	TA98				TA100				YG1041			
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle												
Negativo									122	5,19	88	7
10									138	0,71	199	1,41
20									182	10,6	245	26,3
40									193	2,12	322	19,1
Controle												
Positivo									640	4,477	350	15,6

ANEXO X: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profª. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO XI: Ficha do Aluno – Sistema FenixWeb - USP

Ficha Aluno	
Universidade de São Paulo	
Faculdade de Ciências Farmacêuticas	
Documento sem validade oficial	
9141 - 5508291/1 - Patricia Estevam dos Santos	
Email:	patriciaestevam@usp.br
Data de Nascimento:	10/04/1977
Cédula de Identidade:	RG - 1.558.519 - RN
Local Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - - Rio Grande do Norte - Brasil - 2003
Graduação:	Licenciado em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - - Rio Grande do Norte - Brasil - 2004
Mestrado:	Mestre em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - - Rio Grande do Norte - Brasil - 2005
Curso:	Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data da Matrícula:	07/07/2005
Início da Contagem de Prazo:	07/07/2005
Data Limite:	07/07/2009
Orientador(es):	Prof(a). Dr(a). Silvia Berlanga de Moraes Barros - 07/07/2005 a 13/06/2006 E.Mail: sbarros@usp.br Prof(a). Dr(a). Gisela de Aragão Umbuzeiro - 14/06/2006 a 23/10/2007 E.Mail: giselau@usp.br Prof(a). Dr(a). Gisela de Aragão Umbuzeiro - 24/10/2007 a -- E.Mail: giselau@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 05/01/2006
Exame de Qualificação:	Aprovado em 10/12/2007
Data do Depósito do Trabalho:	23/06/2009
Data máxima para aprovação da Banca:	
Título do Trabalho:	Biomarcadores genotóxicos no monitoramento de estuários com diferentes níveis de contaminação utilizando peixes coletados in situ.
Data de Aprovação da Banca:	24/06/2009
Data Máxima para Defesa:	22/09/2009
Data da Defesa:	31/07/2009
Resultado da Defesa:	Aprovado em 31/07/2009
Ocorrência:	Última matrícula em 07/02/2009

--

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
HSA5719-4	Controle de Poluição do Meio (Poluição das Águas)	02/08/2005	25/10/2005	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBC5771-6	Seminários Gerais em Toxicologia	03/08/2005	30/11/2005	30	2	75.00	A	N	Concluída
QBQ5741-4	Resposta Molecular de Organismos Aquáticos Expostos a Poluentes Ambientais. Regulação e Expressão de Proteínas, Danos Celulares e Biomarcadores	13/09/2005	08/11/2005	120	8	100.00	A	N	Concluída
IOB5732-4	Impactos Antrópicos nos Ecossistemas Marinhos	19/09/2005	11/12/2005	120	0	0.00	-	N	Turma cancelada
ENE5801-2	Ensaios Pedagógicos	06/06/2006	07/08/2006	45	3	90.00	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou do IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, com apresentação do trabalho "Comparação Preliminar nos Níveis de Danos Genotóxicos em Peixes Coletados na Bacia de Evolução do Canal de Piaçaguera e no Canal de Bertioga - SP, Utilizando o Ensaio Cometa", publicado em anais, v. 1, p. 156, 2006, São Pedro, São Paulo	04/07/2006	06/07/2006	-	1	0.00	-	-	-
Atividade do Programa	Participou do XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics e I International Congress of Fish Genetics, com apresentação do trabalho:	10/10/2006	13/10/2006	-	1	0.00	-	-	-

	"Ocorrência de micronúcleos em eritrócitos de Parati Mugil sp (Mugilidade, Perciformes) Coletados na Bacia de Evolução do Canal de Piaçaguera e no Canal de Bertioga - SP", publicado em anais, v. 1, p. 245, 2006, São Carlos, São Paulo								
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC-0401 Toxicologia Geral, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo	01/02/2007	30/06/2007	-	3	0.00	-	-	-
FBC5784-1	Seminários Gerais em Toxicologia II	30/07/2007	11/11/2007	30	2	90.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	20	20	Disciplinas:	24
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	20	20		24

Créditos Atribuídos à Tese : 167

Conceito até 31/12/1996:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R -

Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.

Situação em: 17/06/2009 20:55

ANEXO XII: Currículo do Sistema de Currículos Lattes (<http://lattes.cnpq.br/>).

Patrícia Estevam dos Santos

Possui graduação em Ciências Biológicas Bacharelado e Licenciatura Plena pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2003 e 2004), mestrado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2005). Atualmente desenvolve sua tese de Doutorado na Universidade de São Paulo no departamento de Toxicologia e Análises toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Tem experiência na área de Biologia Molecular e Genética, com ênfase em Mutagenese e Mutagenese Ambiental, atuando principalmente nos seguintes temas: genotoxicidade, mutagenicidade, ensaio cometa, análise de micronúcleos e teste de Ames.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 19/06/2009

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/0295246132037651>

Dados pessoais

Nome	Patrícia Estevam dos Santos
Nome em citações bibliográficas	SANTOS, Patrícia Estevam dos; Estevam-Santos P
Sexo	Feminino
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Av Lineu Prestes nº 580 Bloco 13A Cidade Universitária 05508-900 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913631 URL da Homepage: http://www.fcf.usp.br

Formação acadêmica/Titulação

2009	Doutora em Toxicologia e Análises Toxicológicas . Universidade de São Paulo, USP, Brasil. <i>Título:</i> Biomarcadores genotóxicos no monitoramento de estuários com diferentes níveis de contaminação utilizando peixes coletados in situ. <i>Orientador:</i> Gisela de Aragão Umbuzeiro. <i>Bolsista do(a):</i> Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, . . <i>Palavras-chave:</i> biomarcadores; ecotoxicidade; genotoxicidade; Teste de Ames; Teste de Micronúcleo; Teste Cometa. <i>Grande área:</i> Ciências Biológicas / <i>Área:</i> Genética / <i>Subárea:</i> Mutagenese.
2003 - 2005	Mestrado em Genética e Biologia Molecular . Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil. <i>Título:</i> Análise da genotoxicidade das águas superficiais do rio Potengi - RN, <i>Ano de Obtenção:</i> 2005. <i>Orientador:</i> Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros.

	<p><i>Bolsista do(a):</i> Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.</p> <p><i>Palavras-chave:</i> Extração XAD-4; Peixes como biomonitor; Teste Cometa; Teste de Ames; Teste de Micronúcleo.</p> <p><i>Grande área:</i> Ciências Biológicas / <i>Área:</i> Genética / <i>Subárea:</i> Mutagenese.</p> <p><i>Grande área:</i> Ciências Biológicas / <i>Área:</i> Genética.</p> <p><i>Setores de atividade:</i> Saúde humana; Cuidado à saúde das populações humanas; Outros.</p>
2003 - 2004	Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado e Licenciatura. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.
1998 - 2003	<p>Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado e Licenciatura. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.</p> <p><i>Título:</i> Avaliação do Potencial Citotóxico e Mutagênico do infuso de Cravo-da-Índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>).</p> <p><i>Orientador:</i> Lucymara Fassarella Agnez Lima.</p> <p><i>Bolsista do(a):</i> Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.</p>
Atuação profissional	
	Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Vínculo institucional	
2005 - Atual	Vínculo: Doutoranda, Enquadramento Funcional: doutoranda, Regime: Dedicação exclusiva.
	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB, Brasil.
Vínculo institucional	
2005 - 2008	Vínculo: Estagiária de Pós-Graduação, Enquadramento Funcional: Integrante de Projeto, Carga horária: 30
Atividades	
2005 - 2007	Atividades de Participação em Projeto, Setor de Mutagenese e Microbiologia Ambiental.
	<p>Projetos de pesquisa</p> <p>Atualização de metodologias para monitoramento ambiental</p>
	Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.
Vínculo institucional	
2004 - 2005	Vínculo: Intergrante do Projeto, Enquadramento Funcional: Intergrante do Projeto, Carga horária: 10
Outras informações	<p>Aprendendo o método científico através da genética Descrição: O Projeto visa formar alunos e professores de segundo grau na arte do raciocínio científico, para compreensão da natureza. Visa descobrir e incentivar novos talentos a seguir a carreira científica. Situação: Em Andamento Natureza: Outra Alunos envolvidos: Graduação (3); Especialização (0); Mestrado acadêmico (2); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1); Integrantes: Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros; Lucila Carmem Monte Egito; Lucymara Fassarella Agnez Lima (Responsável); Patrícia Esteves dos Santos; Fábio Teixeira Duarte; Michelle de Andreza Freitas; Kátia Castanho Scortecchi; Luciane Fentanes Moura de Melo; Leonam Gomes Coutinho; Taciana Coutinho Financiador(es): Fundação Vitae-VITAE, Fundação Vitae-VITAE</p>
Vínculo institucional	
2003 - 2004	Vínculo: pós-graduanda, Enquadramento Funcional: pós-graduanda, Carga

horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.	
Outras informações	<p>Projeto: Análise de genotoxicidade ambientais no Nordeste Brasileiro; Descrição: Os recursos hídricos sempre foram e sempre serão fontes de vida. Todavia, o crescimento das áreas urbanas e a industrialização levaram ao início de uma crise ambiental devido à degradação das condições de vida da população e dos sistemas naturais. Hoje, sabemos que a poluição das águas é uma das maiores preocupações mundiais, visto que atinge os oceanos, mares, rios, lagoas e até mesmo, lençóis freáticos, prejudicando a saúde humana e alterando o equilíbrio de diversos ecossistemas, fontes de vida no nosso planeta. Na cidade do Natal, RN, a deteriorização da qualidade dos seus recursos hídricos é cada vez maior, devido ao despejo de esgotos sanitários, dejetos industriais e de agrotóxicos. Assim, preocupados com a qualidade d'água muitos estudos, na sua grande maioria físico-químicos, são realizados para avaliar a potabilidade e/ou a contaminação da mesma, visto as inúmeras doenças de veiculação hídrica. Entretanto, pouca atenção é dada à presença de agentes genotóxicos e mutagênicos no nordeste brasileiro. Sendo assim, o objetivo do presente projeto é avaliar o potencial genotóxico de diferentes recursos hídricos do estado do RN. Para tanto serão realizados análises ao nível de DNA (teste de Ames e cometa), cromossômico (<i>Allium cepa</i>, AgNORs, micronúcleo) e morfológico (assimetria flutuante). Da realização deste projeto espera-se, além de levantar informações quanto à presença de agentes mutagênicos nos recursos hídricos do estado do RN, contribuir para o esclarecimento de uma vasta comunidade (governamental, industrial, ribeirinha e população em geral) dos perigos que a poluição acarreta a vida, bem como auxiliar na tomada de medidas de conservação e manejo auto-sustentável. Além disto, o projeto contribuirá com o fortalecimento da área de Mutagênese Ambiental do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRN e na formação de pessoal qualificado nesta área.</p>
Vínculo institucional	
2002 - 2003	Vínculo: Integrante do Projeto, Enquadramento Funcional: Integrante do Projeto, Carga horária: 40
Outras informações	<p>Contribuição da análise de genotoxicidade para a determinação do impacto ambiental em recursos hídricos da região da grande Natal, RN./ O crescimento das áreas urbanas e a industrialização levaram ao início de uma crise ambiental devido à degradação das condições de vida da população e dos sistemas naturais. Hoje, sabemos que a poluição das águas é uma das maiores preocupações mundiais, visto que atinge os oceanos, mares, rios, lagoas e até mesmo lençóis freáticos. Na cidade do Natal, RN, a deteriorização da qualidade dos seus recursos hídricos é cada vez maior. O rio Potengi constitui uma importante fonte de renda para inúmeros pescadores, alimenta uma grande parte da população e abriga uma vasta área de manguezal. Entretanto, inúmeras são as indústrias ao longo deste curso d'água. Preocupados com a qualidade d'água muitos estudos são realizados para avaliar a potabilidade e/ou a contaminação da mesma, visto as inúmeras doenças de veiculação hídrica. Entretanto, nenhuma atenção é dada à presença de agentes genotóxicos e/ou mutagênicos na região nordeste do Brasil, em contraste à preocupação crescente em países do primeiro mundo como Canadá e Estados Unidos. A importância em identificar poluentes capazes de lesar o material genético é a possibilidade destes alterarem a estrutura genética das espécies que ali vivem. Assim, o impacto ambiental provocado por agentes mutagênicos traz consequências drásticas a médio e longo prazo e ainda são, infelizmente, sub-estimados. O objetivo do presente projeto é então, avaliar a qualidade das águas dos Rios Potengi, Pitimbú e do lençol freático (RN), quanto à presença de poluentes com potencial genotóxico. Para tal, diferentes testes bacterianos (SOS cromoteste e teste de Ames) e de eucariotos (Cometa), mundialmente reconhecidos, serão empregados para a detecção da genotoxicidade. Da realização deste projeto espera-se, principalmente, levantar informações quanto à presença de agentes mutagênicos nestes mananciais.</p>
Vínculo institucional	
1999 - 2002	Vínculo: Integrante do Projeto, Enquadramento Funcional: Integrante do Projeto, Carga horária: 20
Outras informações	<p>Descrição: É objetivo deste trabalho investigar, a nível molecular, o potencial mutagênico e antioxidante de derivados de diferentes plantas medicinais e de seus derivados, comumente usadas na região Nordeste do Brasil, visando obter informações a respeito não só da frequência, bem como dos tipos de lesões e</p>

	<p>mutações que possam ser induzidos, no caso de ser detectada atividade mutagênica, ou evitados devido a ocorrência de atividade antioxidante. Para realização deste trabalho foram selecionadas diversas plantas medicinais, as quais são temas de estudos de alunos de mestrado e de iniciação científica no laboratório de Mutagenese do Departamento de Biologia Celular e Genética - CB - UFRN. Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa Alunos envolvidos: Graduação (11); Especialização (0); Mestrado acadêmico (6); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (2); Integrantes: Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros; Maria das Graças Medeiros; Francisco Napoleão Túlio Varela Barca; Lucila Carmem Monte Egito; Lucymara Fassarella Agnez Lima (Responsável); Aline de Medeiros Leal; Keronninn Moreno de Lima; Maria Célia Ribeiro Dantas de Aguiar; Ana D'Arc Pessoa de Castro; Regina Célia Pereira Marques; Maria Cleide Ribeiro Dantas de Carvalho; Mateus da Silva Pereira; Tírzah Braz Petta; Patrícia Estevam dos Santos; Livia Margarete Bezerril Luz; Fabíola Marques de Carvalho; Maria Beatriz Mesquita Cansação Felipe; Sheila Figueiredo Soares; Tereza Neuma de Castro Dantas; Tereza Maria Dantas de Medeiros; Alessandra Fernanda de Oliveira Lima; Hugo Ascendino Fernandes Barbalho; Francisco Carlos de Moura Financiador(es): Núcleo de Produção de Medicamentos e Alimentos da Ufrn-NUPLAM, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ</p>
--	---

Atividades	
07/2005 - Atual	Pesquisa e desenvolvimento , CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, .
	<p>Linhas de pesquisa</p> <p>Desenvolvimento de metodologias para monitoramento ambiental.</p>
1/2004 - 5/2005	Atividades de Participação em Projeto, Centro de Biociências, Departamento de Biologia.
	<p>Projetos de pesquisa</p> <p>Aprendendo o método científico através da genética</p> <p>Contribuição da análise de genotoxicidade para a determinação do impacto ambiental em recursos hídricos da região da grande Natal- RN</p>
1/2003 - 5/2005	Atividades de Participação em Projeto, Centro de Biociências, Departamento de Biologia.
	<p>Projetos de pesquisa</p> <p>Análise da Genotoxicidade Ambiental no nordeste Brasileiro</p>
1/1999 - 5/2005	Atividades de Participação em Projeto, Centro de Biociências, Departamento de Biologia.
	<p>Projetos de pesquisa</p> <p>Avaliação do potencial mutagênico de produtos naturais e fármacos</p>

Linhas de Pesquisa

1.	Desenvolvimento de metodologias para monitoramento ambiental.
----	---

Projetos de Pesquisa

2005 - 2007	Atualização de metodologias para monitoramento ambiental
	<p><i>Descrição:</i> Realizado na CETESB.</p> <p><i>Situação:</i> Concluído; <i>Natureza:</i> Desenvolvimento.</p> <p><i>Integrantes:</i> Patrícia Estevam dos Santos</p>
2004 - Atual	Aprendendo o método científico através da genética
	<p><i>Descrição:</i> O Projeto visa formar alunos e professores de segundo grau na arte do raciocínio científico, para compreensão da natureza. Visa descobrir e incentivar novos talentos a seguir a carreira científica. .</p>

	<p><i>Situação:</i> Em andamento; <i>Natureza:</i> Extensão. <i>Alunos envolvidos:</i> Graduação (0) / Especialização (0) / Mestrado acadêmico (0) / Mestrado profissionalizante (0) / Doutorado (0) . <i>Integrantes:</i> Patrícia Estevam dos Santos</p>
2004 - Atual	<p>Contribuição da análise de genotoxicidade para a determinação do impacto ambiental em recursos hídricos da região da grande Natal- RN</p>
	<p><i>Descrição:</i> O crescimento das áreas urbanas e a industrialização levaram ao início de uma crise ambiental devido à degradação das condições de vida da população e dos sistemas naturais. Hoje, sabemos que a poluição das águas é uma das maiores preocupações mundiais. Na cidade do Natal, RN, a deteriorização da qualidade dos seus recursos hídricos é cada vez maior. O rio Potengi constitui uma importante fonte de renda para inúmeros pescadores, alimenta uma grande parte da população e abriga uma vasta área de manguezal. Entretanto, inúmeras são as indústrias ao longo deste curso d'água. Preocupados com a qualidade d'água muitos estudos são realizados para avaliar a potabilidade e/ou a contaminação da mesma, visto as inúmeras doenças de veiculação hídrica. Entretanto, nenhuma atenção é dada à presença de agentes genotóxicos e/ou mutagênicos na região nordeste do Brasil, em contraste à preocupação crescente em países do primeiro mundo como Canadá e Estados Unidos. A importância em identificar poluentes capazes de lesar o material genético é a possibilidade destes alterarem a estrutura genética das espécies que ali vivem. Para o homem, essa alteração pode provocar processos degenerativos, doenças hereditárias ou o câncer e para a fauna e a flora pode ocorrer o comprometimento do desenvolvimento normal dos organismos, podendo levar a variações na espécie e até mesmo a sua extinção. Assim, o impacto ambiental provocado por agentes mutagênicos traz consequências drásticas a médio e longo prazo e ainda são, infelizmente, sub-estimados. O objetivo do presente projeto é então, avaliar a qualidade das águas dos Rios Potengi, Pitimbu e do lençol freático (RN), quanto à presença de poluentes com potencial genotóxico utilizando teste em sistemas procariotos e eucariotos (teste de Ames, cometa e micronúcleo)..</p> <p><i>Situação:</i> Em andamento; <i>Natureza:</i> Pesquisa. <i>Alunos envolvidos:</i> Graduação (0) / Especialização (0) / Mestrado acadêmico (0) / Mestrado profissionalizante (0) / Doutorado (0) . <i>Integrantes:</i> Patrícia Estevam dos Santos</p>
2003 - Atual	<p>Análise da Genotoxicidade Ambiental no nordeste Brasileiro</p>
	<p><i>Descrição:</i> Descrição: Os recursos hídricos sempre foram e sempre serão fontes de vida. Todavia, o crescimento das áreas urbanas e a industrialização levaram ao início de uma crise ambiental devido à degradação das condições de vida da população e dos sistemas naturais. Hoje, sabemos que a poluição das águas é uma das maiores preocupações mundiais, visto que atinge os oceanos, mares, rios, lagoas e até mesmo, lençóis freáticos, prejudicando a saúde humana e alterando o equilíbrio de diversos ecossistemas, fontes de vida no nosso planeta. Na cidade do Natal, RN, a deteriorização da qualidade dos seus recursos hídricos é cada vez maior, devido ao despejo de esgotos sanitários, dejetos industriais e de agrotóxicos. Assim, preocupados com a qualidade d'água muitos estudos, na sua grande maioria físico-químicos, são realizados para avaliar a potabilidade e/ou a contaminação da mesma, visto as inúmeras doenças de veiculação hídrica. Entretanto, pouca atenção é dada à presença de agentes genotóxicos e mutagênicos no nordeste brasileiro. Sendo assim, o objetivo do presente projeto é avaliar o potencial genotóxico de diferentes recursos hídricos do estado do RN. Para tanto serão realizadas análises ao nível de DNA (teste de Ames e cometa), cromossômico (Allium cepa, AgNORs, micronúcleo) e morfológico (assimetria flutuante). Da realização deste projeto espera-se, além de levantar informações quanto à presença de agentes mutagênicos nos recursos hídricos do estado do RN, contribuir para o esclarecimento de uma vasta comunidade (governamental, industrial, ribeirinha e população em geral) dos perigos que a poluição acarreta a vida, bem como auxiliar na tomada de medidas de conservação e manejo auto-sustentável. Além disto, o projeto contribuirá com o fortalecimento da área de Mutagênese Ambiental do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRN e, conseqüentemente, na formação de pessoal qualificado nesta área. <i>Situação:</i> Em Andamento <i>Natureza:</i> Pesquisa <i>Alunos envolv.</i></p> <p><i>Situação:</i> Em andamento; <i>Natureza:</i> Pesquisa. <i>Alunos envolvidos:</i> Graduação (3) / Especialização (0) / Mestrado acadêmico (3) / Mestrado profissionalizante (0) / Doutorado (1) . <i>Integrantes:</i> Patrícia Estevam dos Santos</p>

	<i>Financiador(es):</i> Banco do Nordeste do Brasil S/A - Auxílio financeiro / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa..
1999 - Atual	Avaliação do potencial mutagênico de produtos naturais e fármacos
	<p><i>Descrição:</i> Descrição: É objetivo deste trabalho investigar, a nível molecular, o potencial mutagênico e antioxidante de derivados de diferentes plantas medicinais e de seus derivados, comumente usadas na região Nordeste do Brasil, visando obter informações a respeito não só da frequência, bem como dos tipos de lesões e mutações que possam ser induzidos, no caso de ser detectada atividade mutagênica, ou evitados devido a ocorrência de atividade antioxidante. Para realização deste trabalho foram selecionadas diversas plantas medicinais, as quais são temas de estudos de alunos de mestrado e de iniciação científica no laboratório de Mutagênese do Departamento de Biologia Celular e Genética - CB - UFRN. Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa .</p> <p><i>Situação:</i> Em andamento; <i>Natureza:</i> Pesquisa.</p> <p><i>Alunos envolvidos:</i> Graduação (0) / Especialização (0) / Mestrado acadêmico (0) / Mestrado profissionalizante (0) / Doutorado (0) .</p> <p><i>Integrantes:</i> Patrícia Estevam dos Santos</p>

Áreas de atuação

1.	<i>Grande área:</i> Ciências Biológicas / <i>Área:</i> Genética / <i>Subárea:</i> Mutagenese.
2.	<i>Grande área:</i> Ciências Biológicas / <i>Área:</i> Biologia Geral / <i>Subárea:</i> Biologia Molecular.
3.	<i>Grande área:</i> Ciências Biológicas / <i>Área:</i> Genética.
4.	<i>Grande área:</i> Ciências Biológicas / <i>Área:</i> Farmacologia / <i>Subárea:</i> Toxicologia.

Idiomas

Inglês	Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.
Espanhol	Lê Razoavelmente.

Prêmios e títulos

2008	Apresentação oral, SBMCTA.
2003	Prêmio Teclab Jovem Pesquisador do Centro de Biociências - UFRN, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
2007	Prêmio Jovem Cientista, Categoria de Ciência Aplicada - VIII Congresso Brasileiro da SBMCTA, 2007.

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica	
Trabalhos completos publicados em anais de congressos	
1.	Estevam-Santos P ; Kummrow F (Fábio Kummrow) ; UMBUZEIRO, G. A. . Mutagenic activity of blue rayon extracts of bile from fishes collected in Santos estuary - a possible exposure biomarker for polycyclic mutagenic compounds. In: VIII Congresso Brasileiro da SBMCTA, 2007, Mangaratiba - RJ. SBMCTA, 2007.
Resumos publicados em anais de congressos	
1.	Estevam-Santos P; UMBUZEIRO, G. A.; et al., . BERTIOGA AS A POSSIBLE REFERENCE REGION FOR STUDIES IN THE BAIXADA SANTISTA FOR CARCINOGENIC METALS, POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND MUTAGENICITY.. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MUTAGÊNESE, CARCINOGÊNESE E TERATOGÊNESE AMBIENTAL, 2007, Mangaratiba - RJ. SBMCTA, 2007.
2.	SANTOS, Patrícia Estevam dos ; UMBUZEIRO, G. A. . Comparação preliminar dos níveis de danos genotóxicos em peixes coletados na bacia de evolução do canal de Piaçaguera e no canal de Bertioiga - SP. In: IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2006, São Pedro - SP. Setac brasil, 2006.

3.	SANTOS, Patrícia Estevam dos ; UMBUZEIRO, G. A. . Ocorrência de Micronúcleos em eritrócitos de Parati Mugil sp (Mugilidae, Perciformes) coletados na Bacia de Evolução do Canal de Piaçaguera e no Canal de Bertioga - SP.. In: I International Congress of Fish Genetics and XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics, 2006, São Carlos - SP. I International Congress of Fish Genetics and XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics, 2006.
4.	★ SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Egito, LCM ; Molina, WF ; Agnez-Lima, LF ; Batistuzzo de Medeiros, SR . "Cathrops spixii" na Avaliação da Poluição no rio Potengi/RN-Brasil utilizando o teste de micronúcleo e o ensaio cometa.. In: VII Congresso Brasileiro de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal/RN. Genetics and Molecular Biology, 2005. v. 28. p. 154-154.
5.	Melo, LFM ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Egito, LCM ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; Agnez-Lima, LF . Análise da genotoxicidade das águas da Estação de Tratamento de Esgoto da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.. In: VII Congresso Nacional de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal/RN. Genetics and Molecular Biology, 2005. v. 28. p. 172-172.
6.	Egito, LCM ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; Agnez-Lima, LF . Teste de Micronúcleo utilizando "Crenicichlaspp." como biomarcador para avaliação genotóxica das águas de superfície do rio Pitimbú (Brasil/RN). In: VII Congresso Nacional de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal/RN. Genetics and Molecular Biology, 2005. v. 28. p. 210-210.
7.	Barbosa, JS ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Egito, LCM ; Agnez-Lima, LF ; Batistuzzo de Medeiros, SR . Análise da Genotoxicidade das águas superficiais da lagoa de extremoz/RN através do sistema "Allium cepa". In: VII Congresso Nacional de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal/RN. Genetics and Molecular Biology, 2005. v. 28. p. 225-225.
8.	Freitas, M A ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Egito, LCM ; et al., . Análise da atividade genotóxica das águas superficiais do rio Golandim do município de São Gonçalo do Amarante - RN. In: 50 Congresso Nacional de Genética, 2004, Florianópolis. Análise da atividade genotóxica das águas superficiais do rio Golandim do município de São Gonçalo do Amarante - RN, 2004.
9.	Melo, LFM ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Egito, LCM ; et al., . Estudo genotóxico das águas da estação de tratamento de esgoto da UFRN. In: 50 Congresso Nacional de Genética, 2004, 2004, Florianópolis. Estudo genotóxico das águas da estação de tratamento de esgoto da UFRN, 2004.
10.	Barbosa, JS ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Egito, LCM ; et al., . Genotoxicity Assessment in water sample from Extremoz lake, RN. In: 2nd International symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2004, Recife - PE. Genotoxicity Assessment in water sample from Extremoz lake, RN, 2004.
11.	★ SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; Molina, WF . Identificação de genotoxicidade no rio Potengi Natal/RN através de análises de frequência de micronúcleo (MN) em <i>Cathrops spixii</i> (Siluriformes). In: X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, 2004, Natal - RN. Identificação de genotoxicidade no rio Potengi Natal/RN através de análises de frequência de micronúcleo (MN) em <i>Cathrops spixii</i> (Siluriformes), 2004.
12.	★ SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; Agnez-Lima, LF . Evaluation of cytotoxic potential and mutagenic of the extract of clove <i>Eugenia caryophyllata</i> .. In: International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, 2003, Florianópolis - SC. Evaluation of cytotoxic potential and mutagenic of the extract of clove <i>Eugenia caryophyllata</i> ., 2003.
13.	SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; Agnez-Lima, LF . Avaliação preliminar da mutagenicidade do infuso de cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>) utilizando o teste de Ames.. In: XVI Encontro de Genética do Nordeste, 2002, São Luís - MA. Avaliação preliminar da mutagenicidade do infuso de cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>) utilizando o teste de Ames., 2002.
14.	SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Medeiros, MG ; et al., . Avaliação do potencial mutagênico do antineoplásico mitoxantrona em teste de Ames.. In: XVI Encontro de Genética do Nordeste, 2002, São Luís - MA. Avaliação do potencial mutagênico do antineoplásico mitoxantrona em teste de Ames., 2002.
15.	Soares, SF ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; et al., . Efeitos biológicos associados a sais de estanho: cloreto e fluoreto. In: XVI Encontro de Genética do Nordeste, 2002, São Luís - MA. Efeitos biológicos associados a sais de estanho: cloreto e fluoreto, 2002.
16.	SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; Agnez-Lima, LF . Estudo genotóxico do infuso de cravo -da-índia. In: V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagenese Carcinogênese e

	Teratogênese Ambiental, 2001, Gramado - RS. Estudo genotóxico do infuso de cravo -da-índia, 2001.
17.	Oliveira, ECA ; Lima, KM ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; Agnez-Lima, LF . Mutagenic effects of <i>Luffa operculata</i> . In: V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. In: V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2001, Gramado - RS. Mutagenic effects of <i>Luffa operculata</i> . In: V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2001.
18.	Petta, TB ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Agnez-Lima, LF ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; et al., . Estudo da possível ação genotóxica e mutagênica do óleo de coco saponificado. In: 46 Congresso Nacional de Genética, 2000, Águas de Lindóia - SP. Estudo da possível ação genotóxica e mutagênica do óleo de coco saponificado, 2000.
19.	Oliveira, ECA ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Petta, TB ; et al., . Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico da <i>Luffa operculata</i> . In: 46 Congresso Brasileiro de Genética, 2000, Águas de Lindóia - SP. Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico da <i>Luffa operculata</i> , 2000.
20.	SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Agnez-Lima, LF ; et al., . Análise preliminar do potencial genotóxico do infuso de cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i> L. Mirtáceae). In: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2000, Recife - PE. Análise preliminar do potencial genotóxico do infuso de cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i> L. Mirtáceae), 2000.
21.	SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Agnez-Lima, LF ; et al., . Análise Preliminar do Potencial Genotóxico da Infusão do Cravo-da-Índia.. In: XV Encontro de Genética do Nordeste, 2000, Fortaleza - CE. Análise Preliminar do Potencial Genotóxico da Infusão do Cravo-da-Índia., 2000.
Artigos aceitos para publicação	
1.	★ Estevam-Santos P ; Kummrow F (Fábio Kummrow) ; UMBUZEIRO, G. A. ; Bicego ; Albergaria-Barbosa ACR . Mutagenicity of Blue rayon extracts of fish bile as a biomarker in a field study. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2009.
2.	Egito, LCM ; Melo, LFM ; SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; Agnez-Lima, LF . Micronucleus test in <i>Crenicichla menezesi</i> (Ariidae) used for in situ surface water monitoring. Environmental Research (New York), 2008.
3.	★ SANTOS, Patrícia Estevam dos ; Egito, LCM ; Batistuzzo de Medeiros, SR ; Agnez-Lima, LF . <i>Eugenia caryophyllata</i> infusion induces oxidative DNA damage. Food and Chemical Toxicology, 2007.

Eventos

Participação em eventos	
1.	Universidade de Aveiro - Portugal. PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO E MUTAÇÕES DO GENE p53 EM PEIXES DA ESPÉCIE MUGIL CUREMA COLETADOS EM ÁREAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs). 2008. (Outra).
2.	VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. Mutagenic activity of blue rayon extracts of bile from fishes colleted in Santos estuary - A possible exposure biomarker for polycuclic mutagenic compounds. 2007. (Congresso).
3.	VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, carcinogênese e Teratogênese Ambiental. Bertioga as a possible reference region for studies in the Baixada Santista for carcinogenic metals, palycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity. 2007. (Congresso).
4.	IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Comparação preliminar dos níveis de danos genotóxicos em peixes coletados na bacia de evolução do canal de Piaçaguera e no canal de Bertioga - SP, utilizando o ensaio cometa.. 2006. (Congresso).
5.	I International Congress of Fish Genetics and XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics. Ocorrência de Micronúcleos em eritrócitos de PArati Mugil sp (Mugilidae, Perciformes) coletados na bacia de Evolução do Canal de Piaçaguera e no Canal de Bertioga - SP.. 2006. (Congresso).

6.	Workshop - Ictiologia no Rio Grande do Sul. 2006. (Outra).
7.	VII Congresso Nacional de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental.VII Congresso Nacional de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. 2005. (Congresso).
8.	X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. X Simpósio Nacional de Citogenética e Genética de Peixes. 2004. (Simpósio).
9.	2nd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules an Biotechnology - SBBq and VII Reunião Regional da SBBq. 2004. (Simpósio).
10.	X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. Curso: Métodos Genéticos em Peixes para Estudos da Ecotoxicidade. 2004. (Outra).
11.	4th International Conference on Environmental mutagens in Human populations (4th ICEMHP) e 6ºCongresso da Sociedade Brasileira de mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA)..4th International Conference on Environmental mutagens in Human populations (4th ICEMHP) e 6ºCongresso da Sociedade Brasileira de mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA).. 2003. (Congresso).
12.	Satellite Meeting: Fundamental aspectos of DNA Repair and Mutagenesis. 2003. (Congresso).
13.	II Simpósio e Mostra científica do Centro de Biociências. II Simpósio e Mostra científica do Centro de Biociências. 2003. (Simpósio).
14.	Curso Novas Fronteiras da Genética. 2003. (Outra).
15.	4 th ICEMHP e 6 SBMCTA.Minicurso: Como as Vitaminas e minerais podem contribuir para a estabilidade do genoma humano. 2003. (Outra).
16.	50 anos de DNA: Genética Mostra Genética. Curso: 50 anos de DNA: Genética Mostra Genética. 2003. (Outra).
17.	Seminários Integrados de Biologia III.Seminários Integrados de Biologia III. 2002. (Seminário).
18.	16º Encontro de Genética do Nordeste. 16º Encontro de Genética do Nordeste. 2002. (Encontro).
19.	16º ENGENSE - Encontro de Genética do Nordeste. 16º ENGENSE - Encontro de Genética do Nordeste - Co-autor do trabalho Análise dos efeitos associados a sais de estanho II (Cloreto e Fluoreto): Estudo de agentes codificadores da resposta em nível celular e molecular. 2002. (Encontro).
20.	47º Congresso Nacional de Genética. 47º Congresso Nacional de Genética - Co-autor do trabalho: Efeitos Biológicos associados a sais de estanho II: Cloreto e Fluoreto). 2002. (Encontro).
21.	Curso: Interações entre plantas e microorganismos. Curso: Interações entre plantas e microorganismos. 2002. (Outra).
22.	16º Encontro de Genética do Nordeste. Minicurso: Genotoxicidade Ambiental. 2002. (Outra).
23.	curso de treinamento em testes de mutagenicidade.curso de treinamento em testes de mutagenicidade. 2002. (Outra).
24.	Curso: Gerência de Rejeitos Radioativos aplicados às instituições de Pesquisa.Curso: Gerência de Rejeitos Radioativos aplicados às instituições de Pesquisa. 2002. (Outra).
25.	V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagenênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental.V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagenênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. 2001. (Congresso).
26.	XII Congresso de iniciação Científica da UFRN.XII Congresso de iniciação Científica da UFRN - apresentação Oral do Trabalho intitulado: Estudo do Potencial Mutagênico do infuso de Cravo-da-Índia. 2001. (Congresso).

27.	V Congresso Nacional da SBMCTA. V Congresso Nacional da SBMCTA - Co-Autor do trabalho: Effects of Luffa operculata. 2001. (Congresso).
28.	46º Congresso Nacional de Genética. 46º Congresso Nacional de Genética - Co - Autor do trabalho: Estudo da possível ação Genotóxica e Mutagênica do Óleo de Coco Saponificado. 2001. (Congresso).
29.	46º Congresso Nacional de genética..46º Congresso Nacional de genética. Co-autor do trabalho: Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico da Luffa operculata. 2001. (Congresso).
30.	Programa Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Programa Arquipélago de São Pedro e São Paulo. 2001. (Outra).
31.	Curso: Releitura dos conceitos básicos utilizados em Genética Clássica. Curso: Releitura dos conceitos básicos utilizados em Genética Clássica. 2001. (Outra).
32.	Dia Mundial da Água.Mesa Resonda: Água, Saúde e Qualidade de Vida. 2001. (Outra).
33.	I Forum Potiguar de Biossegurança e Avanços Tecnológicos. I Forum Potiguar de Biossegurança e Avanços Tecnológicos . 2001. (Outra).
34.	V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagenênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental.Curso: Genotoxicidade Ambiental: Estratégia de Trabalho. 2001. (Outra).
35.	XI Congresso de iniciação Científica da UFRN. XI Congresso de iniciação Científica da UFRN. 2000. (Congresso).
36.	Meio Ambiente e Qualidade de Água. Meio Ambiente e Qualidade de Água. 2000. (Simpósio).
37.	XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 2000. (Simpósio).
38.	XV ENGINE - Encontro de genética do Nordeste. XV ENGINE - A genética no desenvolvimento do Nordeste. 2000. (Encontro).
39.	VI Semana de Ciência, Tecnologia e Cultura - UFRN. VI Semana de Ciência, Tecnologia e Cultura - UFRN. 2000. (Outra).
40.	XV ENGINE - Encontro de genética do Nordeste. Mini curso: Técnicas de Genética molecular. 2000. (Outra).
41.	I Simpósio Água e Qualidade de Vida - Agua Millennium. I Simpósio Água e Qualidade de Vida - Agua Millennium. 1999. (Simpósio).
42.	IX EREB-NE.IX EREB-NE. 1999. (Encontro).
43.	I Simpósio Água e Qualidade de Vida - Agua Millennium. I Simpósio Água e Qualidade de Vida - Agua Millennium. 1999. (Encontro).
44.	IX EREB-NE.Mini curso: Utilização e impacto da Biotecnologia na Atualidade. 1999. (Outra).
45.	Curso Teórico - Prático: Biologia Molecular de Plantas. Curso Teórico - Prático: Biologia Molecular de Plantas. 1999. (Outra).

Outras informações relevantes

Realizou estágio de pós-graduação na CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, onde participou do projeto de Atualização de metodologias para monitoramento ambiental com desenvolvimento de biomarcadores em tecido sanguíneo de peixes e métodos de extração utilizando blue rayon em bile de peixes.